ÉRIKA MACHADO DE SALLES

**ESTUDO DO PAPEL DO ATP NA ATIVAÇÃO DO SISTEMA
IMUNE E NA PROTEÇÃO DURANTE A INFECÇÃO POR
*Plasmodium chabaudi***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de
São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

ÉRIKA MACHADO DE SALLES

**ESTUDO DO PAPEL DO ATP NA ATIVAÇÃO DO SISTEMA
IMUNE E NA PROTEÇÃO DURANTE A INFECÇÃO POR
*Plasmodium chabaudi***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de
São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria
Regina D'Império Lima
Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Salles, Érika Machado de.

Estudo do papel do ATP na ativação do sistema imune e na proteção durante a infecção por *Plasmodium chabaudi*. / Érika Machado de Salles. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Maria Regina D'Império Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia das parasitoses.

Versão do título para o inglês: Role of ATP in the immune response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria.

Descritores: 1. *Plasmodium* 2. Sistema imune I. Lima, Maria Regina D'Império II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0181/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Érika Machado de Salles.

Título da Dissertação: Estudo do papel do ATP na ativação do sistema imune e na proteção durante a infecção por *Plasmodium chabaudi*.

Orientador(a): Maria Regina D'Império Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091-7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@ich.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.050/2009

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 031/04/CEEA, datado de 20.04.04 e por solicitação da Profa. Dra. Maria Regina D'Imperio Lima, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Érika Machado de Salles** ao Projeto de Pesquisa "*Estudo da resposta imune inata e adquirida contra o plasmódium chabaudi*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 18 de agosto de 2009.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.036/2007

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 31/04/CEEA, sobre o Projeto: "Estudo da resposta imune inata e adquirida contra o *plasmodium chabaudi*", informo que sua validade será renovada por um período de três anos a contar de 20.04.07.

São Paulo, 29 de novembro de 2007

Atenciosamente,

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Parasitoses do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Regina D'Império Lima. O presente projeto recebeu auxílio financeiro do CNPq - projeto número 471869/2010-4 e FAPESP (Fundação de amparo à Pesquisa do estado de São Paulo) processo número - 05/51170-7 e bolsa - processo número 2009/ 06652-4.

Dedico este trabalho os meus pais queridos, Rozeval e Elizabeth, ao meu
irmão Rafael e ao meu namorado Eduardo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos bons caminhos traçados que resultaram na conclusão deste trabalho, aos meus pais e ao meu irmão Rafael pela confiança e compreensão de minha ausência durante períodos de dedicação ao laboratório, a toda a minha família que me incentivou e colaborou com esta conquista.

Agradeço imensamente ao meu namorado Eduardo Leal Rodrigues pelo grande apoio e dedicação durante este momento de minha vida. Amo você.

Agradeço imensamente a minha orientadora Maria Regina D'Império Lima pela total dedicação mesmo nos momentos mais difíceis, exemplo tão precioso que guardarei por toda a vida. Toda a minha admiração.

Ao professor Robson Coutinho, co-orientadora deste estudo, por toda dedicação, conhecimento e estímulo, realmente imprescindíveis para o desenvolvimento e a conclusão deste estudo.

Ao Prof. José Maria Alvarez Mosig (Pepe) pela contribuição neste trabalho e pelo convívio agradável.

A todos os amigos do laboratório, Eduardo, Sheyla, Claudia, Sandra, Henrique, Raquel, Christian, André, Genoilson, Fernanda, Letícia, Maria, Giovana, Rafael e Beatriz, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Imunologia das Parasitoses (LIP), Rogério, Meire, Danilo, Áurea e Mariana, meus sinceros agradecimentos por toda ajuda fornecida.

Aos meus amigos do Departamento, em especial a Lorena.

Aos funcionários dos Biotérios de Camundongos Isogênicos do

Departamento de Imunologia pela manutenção e fornecimento dos camundongos.

A todo o pessoal da secretaria do Departamento, Jotelma (Jô), Eny, Amanda e Amarildo (*in memoriam*), pela atenção, carinho e paciência.

Ao pessoal da portaria do ICB IV, que sempre me trataram com respeito e carinho durante todos esses anos de convivência.

Aos membros da banca examinadora por me concederem a honra de tê-los como avaliadores, e assim, poder enriquecer o meu trabalho e meu conhecimento.

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo"

Albert Einstein

RESUMO

Salles, EM. Estudo do papel do ATP na ativação do sistema imune e na proteção durante a infecção por *Plasmodium chabaudi*. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Estima-se que a malária seja responsável por um milhão de mortes anuais, atingindo principalmente crianças. O sistema imune participa tanto na proteção contra a infecção pelo plasmódio, como no desenvolvimento das síndromes associadas à malária (anemia, malária cerebral, acidose metabólica e choque sistêmico). Recentemente, tem sido mostrado que a imunidade inata é capaz de detectar sinais liberados por células ou tecidos danificados como o ATP e o ácido úrico. Esses sinais de perigo parecem ser importantes para promover a regulação da inflamação após o trauma ou injúrias ocasionadas pelos patógenos. Porém, a relevância fisiológica desses sinais na resposta imune e seu mecanismo de ação ainda não estão claros. Na malária, é provável que o ATP seja liberado no momento da ruptura dos eritrócitos, a partir de células danificadas do endotélio vascular ou de células do sistema imune mortas por ativação. Assim, neste estudo nós avaliamos o papel do ATP na ativação do sistema imune e no desenvolvimento da doença durante a infecção com *P. chabaudi*. Nossos resultados sugerem que, a concentração de ATP no soro e permeabilização de linfócitos do sangue é maior após a ruptura dos eritrócitos. Durante a infecção, as células T e as células dendríticas possuem uma capacidade exacerbada de resposta ao ATP, que pelo menos em parte depende do P2X7R. Além disso, a presença funcional de receptores purinérgicos parece ser importante para a fase inicial da resposta imune ao *P. chabaudi*. A inibição farmacológica do receptor reduziu o número de células, produção de IFN- γ e injúria hepática. Desta forma a utilização do antagonistas do P2X7R poderia ser benéfico na resolução de problemas ocasionados pelo aumento acentuado do sistema imune.

Palavra-chave: *P. chabaudi*; Sinais de dano; ATP; P2X7

ABSTRACT

Salles, EM. Role of ATP in the immune response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. [Masters Thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

It is estimated that malaria accounts for one million deaths annually, affecting mainly children. The immune system participates in both the protection against infection by the plasmodium, as in the development of the syndromes associated with malaria (anemia, cerebral malaria, metabolic acidosis and systemic shock). Recently, it has been shown that innate immune is able to detect signals released by damaged cells or tissues as ATP and uric acid. These danger signals appear to be important to promote the regulation of inflammation after trauma or injuries caused by pathogens. However, the physiological relevance of these signals in the immune response and its mechanism of action remain unclear. In malaria, it is likely that ATP is released upon rupture of erythrocytes, vascular endothelial cells damaged or dead cells of the immune system activation. In this study we evaluated the role of ATP in the activation of the immune system and the development of disease during infection with *P. chabaudi*. Our results suggest that ATP concentration serum and permeabilization of blood lymphocytes is higher after the rupture of erythrocytes. During infection T cells and dendritic cells have a heightened ability to respond to ATP which is partly dependent on P2X7R. Moreover, the presence of functional purinergic receptors appears to be important for the initial phase of the immune response to *P. chabaudi*. The pharmacological inhibition of the receptor reduced the number of cells, liver damage and IFN- γ , thus the use of the P2X7 receptor antagonists could be beneficial in solving problems caused by the sharp increase in the immune system.

Keywords: *P. chabaudi*; damage signals; ATP; P2X7

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ocorrência de Malária no Mundo -----	20
Figura 2 - Quantificação de ATP no soro e permeabilização de linfócitos do sangue antes e após o rompimento dos eritrócitos-----	41
Figura 3 - Permeabilização de linfócitos T CD4 ⁺ e DC de camundongos C57BL/6 e P2X7R ^{-/-} com o sobrenadante de eritrócitos parasitados e não parasitados lisados -----	43
Figura 4 - Permeabilização induzida por ATP de células do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R ^{-/-} infectados com <i>P. chabaudi</i> -----	45
Figura 5 - Permeabilização de linfócitos T CD4 ⁺ e DC tratados com BBG de camundongos infectados e não infectados -----	46
Figura 6 - Proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ mantidos em cultura com diferentes concentrações de ATP-----	48
Figura 7 - Proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ e TCD8 ⁺ tratados com BBG ou Apyrase-----	50
Figura 8 - Tamanho celular e expressão de CD69 em linfócitos do baço de camundongos C57BL/6 tratados com BBG em cultura.-----	51
Figura 9 - Influência do ATP na produção de citocinas e NO no sobrenadante de cultura de células do baço -----	53
Figura 10 - Parasitemia e número de células em camundongos C57BL/6, P2XR ^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG -----	55
Figura 11 - Número de linfócitos T produtores de IFN γ e linfócitos B produtores de anticorpos em camundongos C57BL/6, P2X7R ^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG -----	57
Figura 12 - Expressão de marcadores de superfície durante a fase aguda da infecção com <i>P. chabaudi</i> -----	59

Figura 13 - Expressão de marcadores de superfície em células esplênicas de camundongos C57BL/6, P2X7^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG, no dia 7 de infecção por *P. chabaudi* ----- **60**

Figura 14. Receptores P2X7 contribuem para o dano no fígado de camundongos infectados com *P. chabaudi*----- **62**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - eATP modula a resposta imune em vários tipos celulares através da ligação com receptores P2	29
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMP - 2-amino-2-metil-1-propanol
- APC- Célula apresentadora de antígeno
- APC-Cy7- Alofococianina-Cy7
- ATP – Adenosina Trifosfato
- BBG – *Brilliant Blue G*
- BSA - Albumina sérica Bovina
- CD – Grupos de diferenciação
- CFSE – *Carboxifluorescein Diacetate Succinimidil Ester*
- DC – Células dendríticas
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- EB - Brometo de Etídeo
- ELISA - Ensaio imunoenzimático
- EP – Eritrócito parasitado
- FITC- Fluoresceína
- GPI - glicosil-fosfatidil-inositol
- i.p - intraperitoneal
- IFN – Interferon
- Ig - Imunoglobulina
- IL- Interleucina
- LT - Linfotóxina
- mAb – Anticorpo monoclonal
- MHC – Complexo principal de Histocompatibilidade

- NFκB – Fator de transcrição nuclear kb
- NK – célula *Natural Killer*
- PAMP – Padrão molecular Associado a Patógenos
- PBS – Salina Tamponada com fosfato
- PE- Ficoeritrina (Phycoerythrin)
- PE-Cy7 - Ficoeritrina-Cy7
- PerCp - *Complexo proteína clorofila peridina*
- PLA2 - Fosfolipase A2
- PRR – Receptor de Reconhecimento padrão
- RNA – Ácido Ribonucléico
- RPMI – Meio McCoy de cultura modificado
- SFB – Soro fetal Bovino
- Th – Célula T helper
- TLR – Receptor tipo Toll
- TNF – Fator de Necrose Tumoral
- WT - *Wild Type*
- WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1	Introdução	19
1.1	Aspectos Gerais da malária humana	20
1.2	Modelo de infecção pelo <i>Plasmodium chabaudi</i>	24
1.3	Mecanismos de liberação de ATP	26
1.4	Função dos receptores purinérgicos na resposta imunológica	27
2	Objetivo	32
3	Material e Métodos	34
3.1	Camundongos e infecção	35
3.2	Tratamento <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	35
3.3	Suspensão de células do baço e sangue	35
3.4	Ensaio de permeabilização induzida por ATP	35
3.5	Deteção de ATP no soro	36
3.6	Análise fenotípica das células por citometria de fluxo	36
3.7	Ensaio de proliferação (marcação com CFSE)	36
3.8	Deteção de citocinas no sobrenadante de cultura	37
3.9	Deteção Intracelular de IFN- γ	37
3.10	Quantificação de NO pela Reação de Griess	37
3.11	ELISPOT para Células Secretoras de Ig	38
3.12	Análise histopatológica	38
3.13	Análise estatística	38
4	Resultados	39
4.1	Quantificação de ATP no soro e permeabilização de linfócitos T do sangue de camundongos antes e após a ruptura dos eritrócitos	40
4.2	Permeabilização de células esplênicas através da abertura de canais purinérgicos	42
4.3	Papel do ATP na proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ do baço de camundongos infectados	46
4.4	Produção de citocinas e NO no sobrenadante da cultura de células do baço na presença de diferentes concentrações de ATP	52
4.5	Parasitemia e número de células no baço de camundongos C57BL/6, P2X7R ^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG	54

4.6	Número de células produtoras de IFN- γ e anticorpos em camundongos C57BL/6, P2X7R ^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG ----	56
4.7	Expressão de marcadores de superfície durante a fase aguda da infecção com <i>P. chabaudi</i> -----	58
4.8	Análise histopatológica do fígado de camundongos C57BL/6 tratados e não tratados com BBG e P2X7R ^{-/-} infectados com <i>P. chabaudi</i> e controles -----	61
5	Discussão -----	63
6	Conclusão -----	72
	Referências -----	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da malária humana

A malária permanece um sério problema de saúde pública, com aproximadamente um terço da população exposta a regiões de transmissão estável. A Organização Mundial de Saúde (WHO) estimou 250 milhões de casos de malária com 900.000 mortes no ano de 2009, com mais de 90% dos casos encontrados na África sub-Saariana, principalmente crianças menores de cinco anos (Figura 1). Em 2009, foram confirmados no Brasil 306.908 casos de malária, com 97% dos casos concentrados em seis estados da região Norte: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima (Ministério da Saúde, 2011). A maioria dos casos ocorre em áreas rurais, mas há registro da doença em áreas urbanas.

Figura 1 - Ocorrência de Malária no Mundo. Adaptado de World Malaria Report, WHO. 2010

A malária é caracterizada como uma doença infecciosa aguda ou crônica causada por protozoários parasitos do gênero *Plasmodium*,

transmitidos por meio da picada de um mosquito *Anopheles* fêmea. Há cinco espécies de plasmódios que infectam humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlsei*. No Brasil, três espécies estão associadas à malária em seres humanos: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (Ministério da Saúde, 2011).

A infecção tem início quando os esporozoítos são introduzidos através da pele pela picada do vetor. Os esporozoítos atingem a corrente sanguínea e migram para o fígado, onde passam por uma fase assintomática de divisão rápida em hepatócitos (estágio pré-eritrocítico). Os parasitos, dentro de hepatócitos, multiplicam-se e dão origem a milhares de novos parasitos (merozoítos), que rompem a célula e caem diretamente na corrente sanguínea. No sangue, o parasito infecta eritrócitos maduros com alta taxa de expansão (Good e Doolan, 2010). Os ciclos eritrocíticos repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*.

O baço tem um papel importante na malária como sítio de remoção de eritrócitos parasitados, geração de imunidade e produção de novos eritrócitos (Engwerda et al., 2005). Os principais alvos para a resposta imune durante o ciclo eritrocítico são os merozoítos livres e parasitos intra-eritrocíticos. Na malária, a resposta imune é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias. A produção de IFN- γ (interferon-gama) representa um papel central na imunidade à malária. Células NK (do inglês *Natural killer*) estão entre as primeiras células a produzir IFN- γ após a exposição *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a eritrócitos infectados com *P. falciparum* (Artavanis-Tsakonas e Riley, 2002). As células T CD4⁺ e a produção de IFN- γ possuem um papel importante no controle da parasitemia durante a fase aguda da infecção (Angulo e Fresno, 2002). Durante a resposta imune inata, o reconhecimento imune de sinais de perigo liberados durante a infecção proporciona um aumento na resposta inflamatória. Dentre alguns receptores de sinais de perigo, os receptores do tipo toll (TLR, do inglês *Toll like receptors*) possuem uma importante função na indução de uma resposta pró-inflamatória na malária. Estudos com malária humana mostraram uma alta expressão de TLR em pacientes infectados com *P. falciparum* (McCall et al., 2007), que se mostram ainda funcionalmente mais ativas durante a fase aguda para a

indução de uma resposta pró-inflamatória (Franklin et al., 2009). Duas categorias de moléculas derivadas do plasmódio que induzem resposta inflamatória do hospedeiro têm sido caracterizadas: Moléculas ancoradas por GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) e o DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) do plasmódio (Hafalla et al., 2011). Mais precisamente, GPI de *P. falciparum* parece induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos através da interação de moléculas GPI com TLR1 e 2 (Ropert et al., 2008; Zhu et al., 2011). Outra molécula derivada do plasmódio extensamente estudada é a hemozoína, um resíduo insolúvel e cristalino que se origina da ingestão da hemoglobina pelo parasito. A hemozoína tem sido relacionada a um aumento da resposta imune inata por se ligar ao DNA do plasmódio capaz de induzir a ativação do TLR 9 (Parroche et al., 2007). Tais moléculas bioativas induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (do inglês *tumor necrosis factor-alpha*) e interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-12 (Ropert et al., 2008). Desta forma, embora a citocina TNF- α seja protetora contra o parasito, altas concentrações desta citocina estão associadas com maior gravidade da doença e morte (Clark et al., 2006). Citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- β (do inglês *transforming growth factor beta*), são importantes para controlar a exacerbação da resposta imunológica. Logo, alguns fatores relacionados à gravidade da doença, como a anemia severa, têm sido relacionados com quantidade insuficiente de IL-10 e altas concentrações de TNF- α (Kurtzhals et al., 1998). Por outro lado, o aumento da resposta anti-inflamatória está correlacionado com um crescimento rápido do plasmódio na infecção em humanos (Walter et al., 2005).

A ruptura de eritrócitos parasitados é tipicamente acompanhada pela febre, náusea, dores de cabeça e outros sintomas de uma resposta pró-inflamatória, na qual se acredita ser derivada de células do sistema imune inato (Stevenson e Riley, 2004). A produção de IFN- γ pelas células T e outras citocinas pró-inflamatórias podem facilitar a produção de TNF- α pelos monócitos (Scragg et al., 1999). TNF- α pode contribuir para o desenvolvimento de malária cerebral devido ao aumento de ICAM-1 (do inglês *inter-cellular adhesion molecule 1*) no endotélio vascular cerebral (Wassmer et al., 2011), e desta forma proporcionar o seqüestro de eritrócitos infectados nas vênulas capilares e pós-capilares. Os eritrócitos infectados aderidos ao endotélio

obstruem o fluxo sanguíneo, causam hipoxia no cérebro e aumentam a inflamação (Turner, 1997). Além da malária cerebral, outras complicações podem ser encontradas durante a infecção. A anemia grave em humanos ocorre devido ao aumento da retirada de eritrócitos da corrente sanguínea, que parece estar relacionado às mudanças na superfície ou estrutura de eritrócitos não infectados (Looareesuwan et al., 1991). Os eritrócitos parasitados também apresentam mudanças na membrana. O plasmódio é capaz de alterar a permeabilidade da membrana para sobreviver dentro dos eritrócitos, aumentando a expressão de transportadores e canais de íons (Merckx et al., 2009). A abertura de canais de íons induzida pelo *P. falciparum* em eritrócitos humanos é importante como uma via de liberação de ATP (adenosina trifosfato) (Akkaya et al., 2009).

Algumas complicações observadas no quadro clínico de pacientes com malária são provenientes do aumento das citocinas pró-inflamatórias (Clark et al., 2006). Sabe-se que alguns fatores derivados do parasito ou do hospedeiro são importantes sinais de dano reconhecidos pelas células do sistema imunológico e proporcionam o aumento da resposta pró-inflamatória. Um estudo recente mostra que eritrócitos infectados com *P. falciparum*, *P. berghei* e *P. yoelii* acumulam hipoxantina e xantina (Orengo et al., 2008). A formação do ácido úrico ocorre através da degradação de altas concentrações de hipoxantina e xantina dentro de eritrócitos infectados e a liberação acontece no momento da ruptura dos eritrócitos. O ácido úrico é considerado um sinal de dano liberado de células mortas e é capaz de induzir a secreção de TNF- α . Os eritrócitos infectados também possuem aumento na quantidade de ATP intracelular. O ATP é capaz de induzir o aumento de Ca^{++} no plasmódio e de ajudar na invasão do parasito a novos eritrócitos (Levano-Garcia et al., 2010). Desta forma, o ATP torna-se importante tanto para o ciclo do parasito como para o reconhecimento de dano pelas células do hospedeiro. Os sinais de dano liberados por células ativadas ou mortas durante a resposta imune são importantes mecanismos de aumento da resposta pró-inflamatória. Portanto o estudo dos mecanismos de interação dos sinais de dano com o sistema imunológico torna-se essencial para o desenvolvimento de novas terapias de redução da resposta pró-inflamatória exacerbada.

1.2 Modelo de infecção pelo *Plasmodium chabaudi*

Devido à dificuldade de se estudar a doença humana, a infecção de camundongos por plasmódios de roedores tem sido utilizada como modelo experimental da malária. Entre os diferentes modelos, a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* (cepa AS; aqui chamado de *P. chabaudi*) é bastante utilizada na compreensão da resposta imune contra o plasmódio durante a fase eritrocítica. O ciclo eritrocítico do *P. chabaudi* é síncrono e as hemácias infectadas com esquizontes são capazes de aderir em células endoteliais (sequestro) (Cox *et al.*, 1987) e em eritrócitos não infectados do hospedeiro (Mackinnon *et al.*, 2002). Esses dois fenômenos também ocorrem durante a infecção pelo *Plasmodium falciparum* (Bagnaresi *et al.*, 2009), e poderiam ser considerados características evolutivas convergentes que facilitariam a evasão do sistema imune.

Na fase inicial da doença causada pelo *P. chabaudi*, observa-se esplenomegalia associada a uma intensa ativação dos linfócitos T e B, caracterizada pela grande produção de moléculas efetoras do tipo 1, tais como IFN- γ e IgG2a (Falanga *et al.*, 1987; D'Império Lima *et al.*, 1991; D'Império Lima *et al.*, 1996 ; Sardinha *et al.*, 2002). Na malária, o baço tem uma importante participação na redução da parasitemia durante a infecção aguda. Camundongos que sofrem esplenectomia e são infectados com *P. chabaudi* possuem altos picos de parasitemia, que se prolonga como resultado de uma diminuição na capacidade de filtração do sangue e lento desenvolvimento de resposta imune contra o plasmódio (Yap e Stevenson, 1994).

Os linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ (Podoba e Stevenson, 1991) e NK (Mohan *et al.*, 1997) têm sido implicados no controle inicial da parasitemia, através de mecanismos efetores mediados pelo IFN- γ . Células T $\gamma\delta$ não são essenciais para o controle da parasitemia, no entanto a ausência de tais células prolonga a parasitemia e atrasa a eliminação do parasito (Seixas e Langhorne, 1999). Os anticorpos de fase aguda também contribuem para limitar a infecção (Mota *et al.*, 1998), ainda que a maioria deles possua especificidades não relacionadas ao parasita (D'Imperio Lima *et al.*, 1996). Conforme a doença progride, alguns linfócitos T e B ativados são eliminados por apoptose (Helmby, 2000) e a resposta imune específica é gerada, garantindo a destruição dos

parasitos e a proteção contra infecções subseqüentes. Paralelamente ao controle da infecção aguda, uma mudança de resposta do tipo 1 para o tipo 2 é observada, com produção predominante de IL-4 e IgG1, um padrão também característico da resposta de memória a uma segunda infecção com baixo inóculo de parasitos (Falanga et al., 1987, D'Imperio Lima et al., 1996). A resposta adquirida contra o *P. chabaudi* é mediada por linfócitos B, T CD4⁺ e CD8⁺ (Suss et al., 1988; Podoba e Stevenson, 1991).

Em relação às moléculas envolvidas na ativação do sistema imune decorrente da infecção pelo *P. chabaudi*, existem algumas evidências. O aumento da resposta inflamatória está diretamente relacionado com o reconhecimento de moléculas derivadas do patógeno e pouco se sabe sobre a participação de sinais de dano na malária. O adaptador MyD88, e possivelmente os TLR a ele associados, em células apresentadoras de antígeno (APC) tem um papel importante, ainda que parcial, na resposta pró-inflamatória, ativação de células T e patogenia da malária, mas não são críticas para o controle imunológico do estágio eritrocítico do *P. chabaudi* (Franklin et al., 2007; Seixas et al., 2009). Franklin e colaboradores (2007) mostraram que TLR9 e MyD88 são importantes para a indução de IL-12 e IFN- γ e favorecem o aumento de resposta a agonistas de TLR resultando em super produção de citocinas pró-inflamatórias e sintomas semelhantes a sepse durante a fase aguda da malária.

Podemos postular, no entanto, que a ruptura dos eritrócitos infectados com o plasmódio possa desencadear uma resposta inflamatória que poderia ser induzida tanto por fatores derivados do parasito como por fatores derivados do hospedeiro. Além do reconhecimento de moléculas do patógeno, o sistema imune possui receptores para o reconhecimento de sinais de dano. Todos os sinais de perigo liberados no momento da infecção devem ser importantes para o aumento ou redução da resposta inflamatória e poderiam contribuir na patologia induzida pela infecção.

1.3 Mecanismos de liberação de ATP

A molécula de ATP foi primeiramente identificada como uma fonte de energia livre utilizada para manutenção celular. Algumas décadas atrás, pesquisadores descobriram que células do sistema nervoso eram capazes de liberar ATP e, desta forma, este fenômeno foi denominado de “nervos purinérgicos” (Burnstock, 1972). Recentemente, inúmeras funções extracelulares foram descritas para os ácidos nucleicos. Dentre tais funções, tem sido mostrado que a imunidade inata é capaz de detectar sinais liberados por células ou tecidos danificados como o ATP e o ácido úrico (Ishii e Akira, 2008; Kono e Rock, 2008).

O ATP é conhecido como um sinal de dano ou padrão molecular associado ao dano (DAMP) (Di Virgilio, 2005). Uma vez liberado, o ATP contribui para o desencadeamento da resposta inflamatória juntamente com os padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) (Mariathasan e Monack, 2007). Esses sinais de perigo parecem ser importantes para promover a regulação da inflamação após o trauma ou injúrias ocasionadas pelos patógenos. Porém, a relevância fisiológica desses sinais na resposta imune e seu mecanismo de ação ainda não estão claros. Três modos de liberação de ATP têm sido descritos: (a) Decorrentes de dano celular devido à pressão osmótica, isquemia, inflamação, apoptose ou necrose, (b) liberação de ATP através de vesículas, e (c) liberação de ATP mediada por canais. A liberação de ATP e subsequente ativação de receptores P2 ajudam a estabelecer níveis basais de ativação para vias de transdução de sinais e regulam um amplo repertório de respostas que incluem o fluxo de sangue nos tecidos, transporte de íons, regulação do volume da célula, sinalização neuronal e interações patógeno-hospedeiro (Ross e Paul, 2010).

A liberação basal de ATP pode ser aumentada por uma perturbação mínima da célula através de estímulo físico ou químico. O ATP extracelular tem um importante papel no transporte de íons em diversos tipos celulares, em particular, em mudanças no meio osmótico (Schliess et al, 2007). Para manter o seu volume sob tais condições, as células aumentam a secreção de íons por um processo denominado RVD (do inglês *regulatory volume decrease*). O estresse osmótico promove a liberação de ATP que resulta na ativação de

receptores P2 e contribui para o RVD por desencadear um aumento dependente de Ca^{++} na secreção de íons (Wang et al., 1996).

Na malária, é provável que o ATP seja liberado no momento da ruptura dos eritrócitos infectados ou durante a invasão dos eritrócitos pelo plasmódio. A liberação de ATP também pode ocorrer durante a resposta imune dentro das sinapses imunológicas ou por células do endotélio vascular danificadas pela ação de moléculas efetoras do sistema imune. Eritrócitos e linfócitos T secretam ATP por canais de panexina-1 (Locovei et al., 2006). Canais de panexina-1 são responsáveis pela liberação de ATP, que atua como sinais “find-me”, e medeia a permeabilidade da membrana durante apoptose (Cheleni et al., 2010). Sob condições normais, as células são expostas a baixas concentrações de ATP extracelular. O ATP extracelular é rapidamente degradado pela ação combinada de ecto-nucleotidases (Zimmermann, 2000) formando ADP, AMP e adenosina. Portanto, o ATP e seus metabólitos exercem importante papel modulando a função celular de maneira autócrina ou parácrina através dos receptores purinérgicos.

1.4 Função dos receptores purinérgicos na resposta imunológica

Durante a infecção patogênica e injúria tecidual, ácidos nucleicos e seus metabólitos, tais como nucleotídeos, nucleosídeos e ácido úrico, podem ser liberados de células mortas do hospedeiro e modificar a resposta imune. Os ácidos nucleicos e seus metabólitos são, de fato, reconhecidos por receptores específicos do hospedeiro, tais como TLR, RLR (do inglês *RIG-like receptors*), NLR (*NOD-like receptors*) e receptores purinérgicos (Ishii e Akira, 2008).

Os receptores purinérgicos são divididos em duas classes principais: P1 (receptores de adenosina) e P2 (receptores de nucleotídeos extracelulares). Há quatro tipos de receptores P1 (A1, A2A, A2B e A3) (Fredholm et al., 2001). Os receptores P2 são divididos em duas subclasses: P2X e P2Y. Os receptores P2Y são acoplados à proteína G e sua família inclui 8 membros: P2Y1,2,4,6,11,12,13 e 14. Os receptores P2X (P2X1-7) proporcionam a abertura de canais de íons ativados pelo ATP extracelular e são seletivos para cátions monovalentes e divalentes (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) (North, 2002).

Todos os receptores P2X, com a exceção de P2X5, podem facilitar a

entrada de Ca^{2+} em resposta ao estímulo pelo ATP extracelular (eATP), desta forma sugerindo que receptores P2X podem regular a ativação de linfócitos T. A liberação de ATP e a ativação autócrina de receptores P2X1 e P2X4 têm funções importantes na amplificação de sinais do TCR (do inglês *T cell receptor*) e na comunicação intracelular nas sinapses imunológicas formadas entre células T e células apresentadoras de antígenos (Woehrle et al., 2010). Receptores P2X estão presentes em muitas células do sistema imune, tais como macrófagos, monócitos, neutrófilos, mastócitos, células dendríticas, linfócitos T e células NK, tendo sido vistos como importantes componentes da resposta imune inata contra infecções, podendo induzir diretamente a morte de patógenos em macrófagos e células epiteliais infectadas (Coutinho-Silva et al., 2001). Alguns receptores P2X são sensíveis a concentrações micromolares de eATP e a quantidade de eATP está diretamente relacionada com o tipo de resposta induzida na célula alvo (Tabela 1).

Tabela 1 – eATP modula a resposta imune em vários tipos celulares através da ligação com receptores P2.

Tipo de célula	Resposta - baixo [eATP]	Resposta - alto [eATP]
Eosinófilos	Quimiotaxia; Indução de secreção de IL-8	Indução de secreção de IL-8
Neutrófilos	Quimiotaxia; Degranulação aumentada e produção de ROS (do inglês <i>Reactive oxygen species</i>)	Adesão aumentada ao endotélio
Monócitos ou macrófagos	Quimiotaxia; Secreção induzida de citocinas inflamatórias	Secreção aumentada de citocinas inflamatórias
Células dendríticas imaturos	Quimiotaxia; Maturação	Maturação
Células dendríticas maduras	Secreção reduzida de citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α .	Secreção aumentada de citocinas inflamatória, incluindo IL-1 β , TNF- α e IL-23; Indução de células Th17
Células T e B	Coestimulação para estimulação antigênica	Coestimulação para estimulação antigênica; "Shedding" de L-selectina

Fonte: Adaptado de Trautmann (2009).

A resposta a baixas concentrações de eATP é mediada por receptores P2 com alta afinidade (P2X1, P2X3, P2Y2 e P2Y13) e afinidade intermediária (P2X2, P2X4, P2X5, P2Y1, P2Y4 e P2Y11). A resposta a altas concentrações de ATP é mediada por receptores P2X7 (Trautmann, 2009).

Os receptores P2X7 foram inicialmente descritos como receptores P2Z nas células do sistema imune (macrófagos e mastócitos) a partir do fenômeno de indução, por eATP, de permeabilização das membranas plasmáticas dessas

células e solutos de até 900 Da (Steinberg et al., 1990). O papel fisiológico dos receptores P2X7 ainda permanece pouco entendido. A sua participação nos mecanismos de morte celular tem sido proposta baseando-se principalmente no fenômeno da permeabilização e na indução de apoptose em alguns tipos de células como tímócitos e macrófagos (Matuano-Barradas et al., 2003; Bulanova et al., 2005). Estudos recentes sugerem que através do reconhecimento pelo receptor P2X7, a molécula de ATP ativa o complexo inflamossomo-NALP3, um conjunto de moléculas da imunidade inata que controla as caspases inflamatórias e induz a produção de IL-1 β e IL-18. Alguns trabalhos mostram que o ATP em doses milimolares estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias através de receptores P2X7 (Bours et al., 2006).

Mecanismos envolvidos na produção de IL-1 β mediada por ATP têm sido extensivamente estudados (Ferrari et al., 2006). O eATP parece ser um sinal crucial para desencadear a síntese e a liberação de IL-1 β através de um sinal inflamatório tal como lipopolissacarídeos. A IL-1 aumenta a síntese de iNOS (do inglês *inductible nitric oxide synthase*), sustenta a produção de NO (do inglês *nitric oxide*), aumenta a expressão de moléculas de adesão sobre células endoteliais, promove o extravasamento de leucócitos, modula o metabolismo muscular e induz febre. Ao contrário da IL-1 β , a IL-18 não é um pirógeno endógeno. A IL-18 se liga a um receptor heterodimérico $\alpha\beta$ induzindo a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, CD95L, diversas quimiocinas, ICAM-1 e VCAM-1 (do inglês *vascular cell adhesion protein 1*) sobre células endoteliais (Dinarello, 2002).

Em linfócitos, os receptores P2X7 têm sido associados com a regulação negativa de L-selectina e CD23 (Gu et al., 1998). A estimulação do TCR resulta em translocação de receptores P2X1 e P2X4 juntamente com hemicanais de panexina-1 para a sinapse imune, enquanto os receptores P2X7 estão uniformemente distribuídos na superfície dos linfócitos, de modo a interagir com as moléculas resultantes de dano celular. O ATP liberado de células T ativadas através de canais de panexina-1 ativa receptores P2X para sustentar a sinalização MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*) (Schenk et al., 2008). A remoção de eATP, inibição, mutação ou silenciamento de receptores P2X1 e P2X4 em linfócitos inibem a entrada de Ca⁺⁺, fatores nucleares de células T ativadas (NFAT) e indução de síntese de IL-2 (Woehrle et al., 2010).

Portanto, os receptores purinérgicos possuem grande importância na ativação de células T devido a necessidade de uma elevação sustentada de Ca^{++} intracelular. Assim, inúmeras evidências indicam a importância da sinalização purinérgica atuando em conjunto com o sistema imune tanto no combate à patógenos quanto na resolução de danos no organismo. Por outro lado, certos patógenos intracelulares parecem utilizar mecanismos envolvendo receptores de nucleotídeos em suas estratégias de escape. Assim, alguns patógenos podem proteger células infectadas contra a apoptose dependente do receptor P2X7 devido à produção de ATPases que consomem o eATP (Yilmaz *et al.*, 2008; Levano-Garcia *et al.*, 2010).

Desta forma, a participação dos receptores purinérgicos nos processos de morte e ativação celular pode ser relevante na indução da resposta aguda na malária, por meio de interações com sinais de dano decorrentes da infecção.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliar o papel do ATP na ativação do sistema imune, no desenvolvimento da doença e na proteção durante a infecção com *P. chabaudi*. O projeto subdivide-se em cinco partes que abordam cinco objetivos específicos:

1. Avaliar a concentração de ATP no soro e a permeabilização de linfócitos do sangue antes e após a ruptura dos eritrócitos.
2. Avaliar a funcionalidade de P2X7R , através da permeabilização induzida por ATP, em DC, linfócitos TCD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e B de camundongos C57BL/6 controles e infectados com *P. chabaudi*.
3. Comparar o estado de ativação de células dendríticas, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B, tratados com o antagonista P2X7R (BBG; do inglês *Brilliant blue G*) ou com Apyrase, de camundongos controle e infectados com *P. chabaudi*.
4. Quantificar a produção de citocinas e NO no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos infectados com *P. chabaudi*, tratados com BBG ou com Apyrase.
5. Analisar o perfil celular, os produtos de células efectoras e a patologia induzida pela doença em camundongos C57BL/6, P2X7R^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG infectados com *P. chabaudi*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos e infecção

Camundongos C57BL/6 (WT; do inglês *wild type*) fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo (Originalmente da The Jackson Laboratory) e mantidos em condição SPF (do inglês *specific pathogen-free*). O *P. chabaudi* cepa AS foi mantido como previamente descrito (Podoba e Stevenson, 1991). Camundongos foram inoculados via intraperitoneal (ip) com 10^6 eritrócitos parasitados (EP) por *P. chabaudi*. Os camundongos *knockouts* para P2X7R foram fornecidos pelo Dr. Robson Coutinho Silva (Universidade Federal do Rio de Janeiro). As parasitemias foram monitoradas através de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa.

3.2 Tratamento *ex vivo* e *in vivo*

Células esplênicas foram tratadas em cultura com um antagonista do receptor P2X7R (BBG; Sigma-Aldrich) ou com Apyrase (Sigma- Aldrich). O BBG foi diluído em PBS na concentração de 1 mM (estoque) e 35 μ M em cultura para 1×10^6 células. No tratamento *in vivo* com BBG, utilizamos 45,5 mg/Kg e a administração foi realizada a cada 48h. Para a hidrólise do ATP utilizamos 20 U/ml de Apyrase na cultura.

3.3 Suspensões de células do baço e sangue

As células foram lavadas e mantidas em RPMI 1640 gelado e suplementado com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml), 2-mercaptoetanol (50 μ M), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM) e 3-20% de soro fetal bovino inativado pelo calor. Todos os suplementos foram adquiridos da Life Technologies. Os eritrócitos do baço não foram lisados para evitar a exposição das células ao ATP liberado pelos eritrócitos e as células do sangue foram separadas através do gradiente de Percoll 70% (GE Health Care). O número de células foi contado utilizando a câmara de Neubauer (Sigma-Aldrich).

3.4 Ensaio de permeabilização induzida por ATP

As células foram marcadas com anticorpos monoclonais (mAb) anti-CD4, CD8, B220, IA^b e CD11c e mantidas em cultura na presença de ATP (25-500 μ M) por

15 minutos em estufa a 37 °C, nos 5 minutos finais, acrescentamos o corante brometo de etídeo (EB) na concentração de 2,5 μ M. O corante penetra na célula e a torna fluorescente apenas quando o receptor está presente e funcional. As células foram captadas em um citômetro de fluxo BD FACSCanto. Os dados foram analisados utilizando-se o programa FlowJo v.7.2.2 (Tree Star Inc)..

3.5 Detecção de ATP no soro

O ATP liberado no soro de camundongos infectados e controles foi determinado utilizando o kit ATP Bioluminescence Assay (Sigma-Aldrich). O soro (50 μ l/well) foi colocado em uma placa de 96 poços (Costar) e o reagente luciferase foi adicionado na mesma quantidade do soro (vol/vol). A leitura foi realizada em um luminômetro de microplaca Berthold com temperatura controlada, e a concentração de ATP foi determinada baseada em sinais de luminescência.

3.6 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo:

As células (1×10^6) foram marcadas com mAb anti-CD4, CD8, B220, CD11c, CD69, CD62L, CD80, CD86 e MHCII obtidos da BD Pharmingen, conjugados à fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofococianina (APC), complexo proteína clorofila peridina (PerCP), ficoeritrina-Cy7(PE-Cy7) e alofococianina-Cy7 (APC-Cy7). As células foram captadas em um citômetro de fluxo BD FACSCanto. Os dados foram analisados utilizando-se o programa FlowJo v.7.2.2 (Tree Star Inc).

3.7 Ensaio de proliferação (marcação com CFSE)

A resposta proliferativa de células T ao parasita foi medida como previamente descrito (Elias et al., 2005). Em resumo, 3×10^7 células esplênicas foram suspensas em PBS com 0,1% de BSA foram incubadas com 5,6-carboxy-fluorescein-succinimidyl-ester (**CFSE**; Molecular Probes) em uma concentração final de 5 μ M por 20 minutos em 37 °C. As células (1×10^6) foram cultivadas em placas de 96 poços (Costar) com 3×10^6 EP ou apenas em meio, por 72h, em 37°C com 5% de CO₂. A proliferação foi avaliada por citometria de fluxo,

considerando-se a redução da intensidade de fluorescência do CFSE.

3.8 Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura

Para detectarmos a presença das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-12, IL-17 no sobrenadante de culturas em proliferação estimuladas com EP, utilizamos o kit Fluorokine® MAP (*Bioplex*) e seguimos as recomendações do fabricante (R&D Systems).

3.9 Detecção Intracelular de IFN- γ

Esplenócitos (1×10^6 células/poço) foram colocados em cultura na presença ou ausência de anticorpos anti-CD3 (5 μ g/mL) e anti-CD28 (5 μ g/mL) solúveis, em meio contendo Stop Golgi (PharMingen) e mantidos por 12 horas à 37 °C e 5% de CO₂. As células foram marcadas com os anticorpos anti-CD4 e CD8 (PharMingen). A seguir, os esplenócitos foram fixados com tampão Cytofix/Cytoperm (BD PharMingen) e permeabilizados com PermWash (PharMingen). Os esplenócitos foram marcados internamente com os mAbs anti-IFN- γ marcados com fluorocromos (PharMingen). As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto e os dados foram analisados utilizando-se o programa FlowJo v.7.2.2 (Tree Star Inc).

3.10 Quantificação de NO pela Reação de Griess

Os sobrenadantes das culturas de células infectadas e controles foram coletados 72h após a infecção. A quantificação de NO foi feita pela reação de Griess (Green et al., 1982).

O volume de 50 μ l foi misturado com 50 μ l da solução A (2,5 ml de ácido fosfórico, 0,5 g de sulfanilamida, 47,5 ml de H₂O de milliQ) e solução B (0.05 g de N-1-naphitiletilenodiamida, 50 ml de H₂O de milliQ) de Griess (vol/vol) numa placa de 96 poços e incubado por 10 minutos na estufa a 37 °C. A leitura foi feita em leitor de microplacas (MR5000 Dynatech, USA), no comprimento de onda de 540/570 nm. A curva padrão foi feita utilizando diluições de NaNO₃ de 200 μ M a 1.56 μ M.

3.11 ELISPOT para Células Secretoras de Imunoglobulinas

O ensaio de ELISPOT (ELISA SPOT assay) foi realizado como descrito previamente (D'Império Lima et al., 1991). Em resumo, anticorpos de cabra anti-imunoglobulina (Ig) total de camundongo (10 µg/mL) foram adsorvidos “*overnight*” (4°C) em microplacas de 96 poços (Costar), bloqueado com gelatina 1% (Merck) diluída em PBS 1X, por 120 min. Células do baço diluídas (1×10^6 até 5×10^2 células/poço) foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 1% SFB, por 6 h, 37 °C em 5% CO₂. Os “spots” foram revelados adicionando os anticorpos goat anti-mouse IgM, IgG2a ou IgG1 biotinilados, posteriormente, adicionando a estreptoavidina conjugada à fosfatase alcalina (todos os anticorpos e conjugados são Southern Biotechnology Associates). Foi utilizado como substrato 5-Bromo-cloro-3-indolil fosfato (Sigma-Aldrich) diluído em tampão 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) (Merck). E, a partir das diluições (número de células plaqueadas vs “spots”) e o total do número de esplenócitos plaqueados, o número de células secretoras de Ig por baço foi calculado.

3.12 Análise histopatológica

O fígado foi coletado e fixado em formaldeído 10% tamponado por 48h para histopatologia e a patologia avaliada através microscopia dos cortes histológicos dos tecidos corados pelos métodos hematoxilina-eosina a fim de visualizar alterações celulares e teciduais.

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o teste “Two-way ANOVA”, seguido por análise do Teste de Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Prisma 4 (Graph Pad Software) e as diferenças entre os três grupos serão consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ (5%).

4 RESULTADOS

4.1 Quantificação de ATP no soro e permeabilização de linfócitos T do sangue de camundongos antes e após a ruptura dos eritrócitos.

De acordo com as hipóteses iniciais deste trabalho, analisamos a quantidade de ATP no soro de camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi* antes e após a ruptura dos eritrócitos. Primeiramente, acompanhamos a parasitemia em diferentes horários. Esfregaços sanguíneos de camundongos no 6º dia de infecção foram realizados entre os horários de 09h00 min as 14h00 min (Figura 2A) e os diferentes estágios do ciclo eritrocítico do plasmódio foram determinados. O principal objetivo neste experimento foi determinar o intervalo de tempo entre a queda das porcentagens de esquizontes maduros e a formação de trofozoítos jovens em forma de anel. Desta forma foi possível observar o período que ocorre o rompimento dos eritrócitos. A redução no número de esquizontes ocorreu após as 12h00 min e o aparecimento de trofozoítos em forma de anel após as 13h00 min. Assumimos o horário de 12h30 min como o melhor momento para a coleta do soro após a esquizogonia devido ao recente rompimento dos eritrócitos. Camundongos C57BL/6 foram infectados com *P. chabaudi* e 100 µl de sangue foram coletados no 6º dia de infecção (parasitemia 25 – 30%) antes e após a ruptura dos eritrócitos assim como controles não infectados. Escolhemos o 6º dia de infecção devido à alta parasitemia sem o risco de anemia. O soro foi coletado e devidamente armazenado em freezer -20 °C. Quantificamos o ATP nos soros armazenados e observamos que camundongos infectados possuem maior quantidade de ATP no soro que camundongos controle não infectados. Camundongos infectados possuem um aumento nos níveis de ATP no soro após o período de esquizogonia (Figura 2B).

Outro fator importante observado foi a permeabilização de linfócitos do sangue. Desta forma podemos quantificar a sensibilidade da célula em resposta ao ATP (300 µM). Portanto, nosso objetivo foi observar a capacidade de permeabilização da célula frente ao ATP antes e após a ruptura dos eritrócitos. Verificamos que os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue de camundongos no 4º dia de infecção (parasitemia 2 – 4%) com *P. chabaudi* são mais suscetíveis à ação do ATP em comparação com o controle (Figura 1C). Após a ruptura dos eritrócitos, os linfócitos T CD4⁺ apresentaram um aumento

da permeabilização induzida por ATP quando comparados com a permeabilização de linfócitos antes da ruptura. No entanto, os linfócitos T CD8⁺ apresentaram uma queda na permeabilização induzida por ATP após a ruptura dos eritrócitos no 5º dia de infecção. A permeabilização espontânea foi maior após a ruptura dos eritrócitos tanto nos linfócitos T CD4⁺ como nos linfócitos TCD8⁺ de camundongos infectados com *P. chabaudi*.

Figura 2 – Quantificação de ATP no soro e permeabilização de linfócitos do sangue antes e após o rompimento dos eritrócitos. A. Estágios do ciclo eritrocítico do *P. chabaudi* foram verificados em diferentes horários através de esfregaços sanguíneos de camundongos no 6º dia de infecção. B. Dosagem de ATP no soro de camundongos antes e após a ruptura dos eritrócitos no 6º dia de infecção e controles não infectados. C. Comparação da permeabilização espontânea ou induzida por 300 μM de ATP, de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ provenientes do sangue de camundongos infectados com *P. chabaudi* (■) e controles não infectados (□), antes e após a ruptura dos eritrócitos, durante os dias 4 e 5 de infecção. Os dados são representativos das médias ± desvio padrão (n=4) com 2 experimentos realizados em separado. *p<0.05 **p<0.01 *** p<0.001 entre os animais controles e infectados.

4.2 Permeabilização de células esplênicas através da abertura de canais purinérgicos.

A princípio, verificamos que após a ruptura dos eritrócitos parasitados, a permeabilização dos linfócitos do sangue aumenta. Para corroborar a hipótese do aumento de permeabilização devido à ruptura dos eritrócitos, realizamos um experimento onde as células do baço foram expostas ao sobrenadante de eritrócitos parasitados e não parasitados lisados. Desta forma, nosso objetivo foi verificar se o sobrenadante era capaz de induzir permeabilização nas células TCD4⁺ e DC do baço de camundongos C57BL/6 no 4º dia de infecção com *P. chabaudi* e controles não infectados. A permeabilização foi maior nas células T CD4⁺ e DC de camundongos infectados que foram expostas ao sobrenadante de eritrócitos parasitados lisados (Figura 3).

Após verificarmos a permeabilização induzida pela ruptura dos eritrócitos, nosso próximo passo foi observar se a permeabilização era dependente do P2X7R. Portanto, utilizamos o sobrenadante de eritrócitos parasitados e não parasitados lisados sobre as células de camundongos C57BL/6 *Knockout* para o P2X7R (P2X7R^{-/-}). A permeabilização de células do baço de camundongos P2X7R^{-/-} infectados com *P. chabaudi* induzida pelo sobrenadante de eritrócitos parasitados lisados foi menor que nos camundongos WT (Figura 3). Da mesma forma, observamos também a redução de permeabilização de linfócitos T CD4⁺ de camundongos P2X7R^{-/-} quando foram expostos ao sobrenadante de eritrócitos não parasitados. A permeabilização mais expressiva foi em DC de camundongos WT infectados. Para todos os grupos, utilizamos o meio de cultura como controle basal de permeabilização.

Figura 3 – Permeabilização de linfócitos T CD4⁺ e DC de camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} com o sobrenadante de eritrócitos parasitados e não parasitados lisados. Comparação da permeabilização de linfócitos T CD4⁺ e DC do baço induzida pelo sobrenadante de eritrócitos parasitados e não parasitados lisados ou apenas meio. As células permeabilizadas foram retiradas de camundongos infectados com *P. chabaudi* (4^o dia) e controles. Os dados são representativos das médias $\pm$ desvio padrão (n=3) com 3 experimentos realizados em separado. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 entre os animais controles e infectados ou entre os diferentes sobrenadantes de um mesmo grupo.

Para verificar a presença de células suscetíveis ao ATP, comparamos o potencial de permeabilização de células o baço de camundongos infectados com *P. chabaudi* e seus respectivos controles mediante crescentes doses de ATP. Células T CD4⁺ e DC provenientes de camundongos no 4^o dia de infecção (parasitemia 1%-3%) apresentaram um aumento significativo na permeabilização celular induzida por ATP (Figura 4A). No entanto, linfócitos T CD4⁺ provenientes de camundongos no 7^o dia de infecção (parasitemia 35%-47%) não apresentaram diferenças significativas (Figura 4A). Os linfócitos T CD8⁺ do baço de camundongos no 4^o dia de infecção apresentaram um aumento na permeabilização induzida por ATP e, da mesma forma que os linfócitos T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ de camundongos no 7^o dia de infecção não apresentaram diferenças significativas (dados não mostrados). Avaliamos a capacidade de permeabilização induzida por ATP em células dendríticas de camundongos infectados com *P. chabaudi* e constatamos uma alta suscetibilidade ao ATP em baixas concentrações (Figura 4A). As células B esplênicas apresentaram resistência à permeabilização induzida por ATP, tanto

em células de camundongos infectados com *P. chabaudi* no 7º dia de infecção como em células de camundongos saudáveis (dados não apresentados). Desta forma, verificamos que durante a infecção os linfócitos T e DC do baço tornam-se suscetíveis a ação do eATP.

Após constataremos um aumento de permeabilização em células do baço de camundongos infectados, nosso próximo objetivo foi determinar se a permeabilização encontrada era dependente do P2X7R. Assim, comparamos a permeabilização espontânea e induzida por ATP (300 μ M) de células do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} no 4º dia de infecção e controles. As células de camundongos P2X7R^{-/-} não são capazes de se permeabilizar após o contato com o ATP, ao contrário das células de camundongos C57BL/6 nas quais possuem expressiva permeabilização induzida por ATP (Figura 4B).

Figura 4 – Permeabilização induzida por ATP de células do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7^{R-/-} infectados com *P. chabaudi*. A. Permeabilização induzida por diferentes concentrações de ATP (0, 25, 50, 100, 300 e 500 μM) de células TCD4⁺ e DC do baço de camundongos no 4^o (▲), 7^o dia de infecção com *P. chabaudi* (▼) e controles (■). B. Permeabilização espontânea e induzida por ATP (300 μM) de células TCD4⁺ e DC do baço de camundongos WT e P2X7^{-/-} infectados com *P. chabaudi* (4^o dia). Os dados são representativos das médias ± desvio padrão (n=3). *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 entre os animais controles e infectados ou entre as diferentes concentrações de ATP e a permeabilização espontânea dentro de um mesmo grupo. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados em separado.

Com o intuito de corroborar a hipótese da permeabilização dependente do P2X7R, tratamos esplenócitos totais de camundongos no 4º dia de infecção com *P. chabaudi* e controles com um antagonista do P2X7R (BBG). Analisamos a permeabilização induzida por 300 µM de ATP em linfócitos T CD4⁺ e DC tratados com o BBG e controles não tratados. As células tratadas com BBG apresentaram uma redução significativa na permeabilização comparadas com as células não tratadas (Figura 5).

Figura 5. Permeabilização de linfócitos T CD4⁺ e DC tratados com BBG de camundongos infectados e não infectados. Permeabilização induzida por ATP (300 µM) de células do baço de camundongos infectados com *P. chabaudi* (4º dia) e controles tratadas com BBG. Os dados são representativos das médias ± desvio padrão (n=3). *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 entre os animais controles e infectados ou entre as células tratadas e não tratadas com BBG dentro de um mesmo grupo. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados em separado.

4.3 Papel do ATP na proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do baço de camundongos infectados.

Para o ensaio de proliferação, utilizamos esplenócitos totais retirados de camundongos no 4º dia de infecção com *P. chabaudi* e controles. As células foram mantidas em cultura por 72 horas sob exposição a diferentes concentrações de ATP. Realizamos este experimento em quatro grupos: 1) Controle somente com meio de cultura; 2) Controle + EP; 3) Esplenócitos de camundongos infectados (Dia 4) somente com meio de cultura; 4) Esplenócitos

de camundongos infectados (Dia 4) + EP. Todas as células foram marcadas com CFSE e submetidas a diferentes concentrações de ATP. As células não sofreram a lise induzida de eritrócitos, uma vez que observamos que a lise altera a permeabilização celular. Ao avaliar o número de células T $CD4^+CFSE^{low}$, observamos que os linfócitos T $CD4^+$ estimulados com EP (Dia 4+EP) apresentaram um pequeno aumento no número de células proliferando, quando deixados em cultura com 25 μM de ATP. No entanto o aumento de ATP em cultura resultou na diminuição no número de células totais e conseqüentemente uma diminuição no número de células proliferando (Figura 6A). O aumento encontrado na porcentagem de células proliferando não reflete um aumento real do número de células T $CD4^+CFSE^{low}$ encontradas na cultura, de acordo com os dados obtidos, doses aumentadas de ATP induz uma redução no número de células totais (Figura 6A). Os linfócitos T $CD8^+$ não apresentaram uma proliferação expressiva, no entanto observamos uma mesma redução no número de células totais e proliferando quando deixados em cultura com doses crescentes de ATP (Figura 6B).

FIGURA 6 - Proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ mantidos em cultura com diferentes concentrações de ATP. A e B, Proliferação de linfócitos TCD4⁺ e T CD8⁺ esplênicos de camundongos controles e infectados com *P. chabaudi* mantidos em cultura com diferentes concentrações de ATP (0, 25, 100, 300 e 500 μ M). As células foram marcadas com CFSE e mantidas em cultura por 72h na presença ou ausência de EP e ATP. Os dados do número de células totais e número de células proliferando são representativos das médias $\pm$ desvio padrão (n=3). Os dot plots representam a intensidade de fluorescência de CFSE em células TCD4⁺ e TCD8⁺. A porcentagem de proliferação foi analisada pela redução de intensidade de fluorescência do CFSE. *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001 entre as diferentes concentrações de ATP e a amostra sem ATP dentro de um mesmo grupo. Os dados são representativos de 2 experimentos realizados em separado.

Outro parâmetro avaliado foi a proliferação de células do baço de camundongos no 4º dia de infecção e controles, com ou sem o estímulo (EP), tratadas com um antagonista do P2X7R (BBG). Observamos, na cultura de células do dia 4 + EP, uma redução significativa no número total de linfócitos T CD4⁺ e no número de células proliferando quando tratadas com BBG (Figura 7A). Os linfócitos T CD8⁺ que receberam o estímulo apresentaram uma redução no número de células totais, quando tratadas com BBG, e uma queda no número de células proliferando (Figura 7B). Portanto, o tratamento das células com BBG resultou em diminuição no número de esplenócitos de camundongos no 4º dia de infecção na cultura. Desta forma, verificamos se a eliminação do ATP também foi capaz de reduzir o número de células e a proliferação. O tratamento de esplenócitos com apyrase, funciona como um catalisador da hidrólise do ATP, permitindo a eliminação do ATP na cultura. Observamos uma redução no número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ tratados com apyrase e deixados em cultura na presença de EP (Figura 7A e B). No entanto, somente os linfócitos T CD4⁺ tratados com apyrase apresentaram uma redução significativa no número de células proliferando.

FIGURA 7- Proliferação de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ tratados com BBG ou Apyrase. A e B, Proliferação de linfócitos TCD4⁺ e T CD8⁺ esplênicos tratados com BBG ou Apyrase e controles não tratados, de camundongos controles e infectados com *P. chabaudi*. As células foram marcadas com CFSE e mantidas em cultura por 72h na presença ou ausência de EP. Os dados do número de células totais e número de células proliferando são representativos das médias $\pm$ desvio padrão (n=3). Os dot plots representam a intensidade de fluorescência de CFSE em células TCD4⁺ e TCD8⁺. A porcentagem de proliferação foi analisada pela redução de intensidade de fluorescência do CFSE. Os dados são representativos de 2 experimentos realizados em separado. *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001 entre as células tratadas e não tratadas.

O tamanho da célula está diretamente relacionado com a ativação celular. Portanto, avaliamos o tamanho das células do baço de camundongos no 4º dia de infecção, estimuladas com EP, tratadas e não tratadas com BBG. A figura 8 demonstra claramente uma redução no número de células grandes B220⁺ e CD4⁺, desta forma corroborando com os resultados de redução da proliferação quando as células são tratadas com BBG (Figura 7).

A

B

FIGURA 8 – Tamanho celular e expressão de CD69 em linfócitos do baço de camundongos C57BL/6 tratados com BBG em cultura. Tamanho celular de linfócitos TCD4⁺ e B220⁺ do baço de camundongos no 4º dia de infecção com *P. chabaudi*, estimulados com EP e tratados ou não tratados com BBG. B. Expressão de CD69 em linfócitos TCD4⁺ e B220⁺ do baço de camundongos no 4º dia de infecção com *P. chabaudi*, estimulados com EP e tratados ou não com BBG. As células foram mantidas em cultura por 72h. Os dados são representativos de 2 experimentos realizados. *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001 entre as células tratadas e não tratadas.

4.4 Produção de citocinas e NO no sobrenadante da cultura de células do baço na presença de diferentes concentrações de ATP

Para correlacionar os resultados que mostram o papel do ATP na ativação celular analisamos a produção de citocinas e NO no sobrenadante de cultura de células do baço de camundongos controle e infectados com *P. chabaudi* com e sem estímulo (EP). Todos os grupos foram expostos a diferentes concentrações de ATP. A produção de IFN- γ foi relativamente alta, de forma que correlaciona com os resultados encontrados na malária experimental. Verificamos uma redução significativa na quantidade de IL-6, IL-4, IL-10 e TNF- α nas doses crescentes de ATP na cultura de células do dia 4 + EP (Figura 9A) e quantidades não detectáveis de IL-2, IL-12 e IL-17 (dados não mostrados). Observamos pouca produção de IL1- β na cultura, mas conseguimos detectar um aumento com baixas concentrações de ATP e posteriormente uma queda com altas concentrações. Baixas concentrações de ATP também proporcionaram um aumento na produção de NO na cultura de células do dia 4 + EP (Figura 9A). O sobrenadante da cultura de células do baço de camundongos no 4º dia de infecção sem o estímulo apresentou uma diminuição na produção de IFN- γ quando mantidos em cultura com 500 μ M de ATP (Figura 9B). O tratamento com BBG reduziu a produção de IFN- γ na cultura de células do dia 4 com e sem o estímulo, assim como o tratamento com Apyrase proporcionou uma diminuição de IFN- γ na cultura (Figura 9B).

FIGURA 9 - Influência do ATP na produção de citocinas e NO no sobrenadante de cultura de células do baço. A. Quantificação de citocinas secretadas no sobrenadante de cultura de células do baço de camundongos controles e infectados com *P. chabaudi*, na presença ou ausência de EP com diferentes concentrações de ATP (0, 25, 50, 100, 300 e 500 μ M). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ entre as células com ATP e seus respectivos controles. Os dados são representativos de 1 experimento realizado. B. Quantificação de IFN- γ no sobrenadante de cultura de células do baço expostas a diferentes concentrações de ATP (0, 25, 50, 100, 300 e 500 μ M) ou tratadas com BBG ou apyrase. Os dados são representativos das médias $\pm$ desvio padrão ($n=3$). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ entre as células com ATP e seus respectivos controles ou entre as células tratadas e não tratadas. Os dados são representativos de 2 experimentos realizados.

4.5 Parasitemia e número de células no baço de camundongos C57BL/6, P2X7R^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG

Os experimentos realizados em cultura mostraram diferenças significativas em células tratadas com BBG e Apyrase. Desta forma, analisamos o perfil de resposta em camundongos deficientes do P2X7R e em camundongos tratados com BBG e infectados com *P. chabaudi*. O tratamento com BBG foi realizado em dias alternados tendo início um dia antes da infecção com *P. chabaudi*. Todos os grupos foram infectados e a parasitemia acompanhada até o 7º dia de infecção. Verificamos uma redução significativa da parasitemia no grupo tratado com BBG em relação ao grupo WT no 6º dia de infecção (Figura 10A), no entanto no 7º dia não houve diferença significativa. Acompanhamos os grupos de camundongos P2X7^{-/-} e WT até o 20º dia de infecção e não constatamos diferenças (Figura 10A). Analisamos o perfil de células do baço de camundongos WT, P2X7^{-/-} e WT tratados com BBG no 7º dia de infecção. Verificamos uma redução significativa no número de células totais do baço nos grupos P2X7^{-/-} e WT tratados com BBG no 7º dia de infecção (Figura 10B). Os camundongos P2X7^{-/-} tiveram uma redução significativa no número de células B220⁺ e CD11c⁺IAb⁺ e o grupo WT tratado com BBG apresentou uma diminuição nas quatro populações celulares (TCD4⁺, TCD8⁺, B220⁺ e CD11c⁺IAb⁺) (Figura 10C). É importante notar que somente os camundongos infectados apresentaram uma redução significativa nas populações.

FIGURA 10 - Parasitemia e número de células em camundongos C57BL/6, P2XR^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG. A. Curva de parasitemia de camundongos C57BL/6, P2X7R^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG infectados com *P. chabaudi*. B. Número de células por baço de camundongos C57BL/6, P2X7R^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG, controles e infectados com *P. chabaudi*. C. Número de células TCD4⁺, TCD8⁺, B220⁺ e CD11c⁺IA^b+ do baço de camundongos C57BL/6, P2X7R^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG, controles e infectados com *P. chabaudi*. Todos os dados são representativos das médias $\pm$ desvio padrão (n=3) de um experimento realizado. *P<0,05 **P<0,01 *** P<0,001 entre os camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} ou C57BL/6 tratados com BBG e não tratados.

4.6 Número de células produtoras de IFN- γ e anticorpos em camundongos WT, P2X₇^{-/-} e WT tratados com BBG

Avaliamos o número de células produtora de IFN- γ e células produtoras de anticorpos no 7º dia de infecção, uma vez que estes mecanismos efetores são importantes no controle da malária e nas manifestações clínicas associadas à doença. Os camundongos P2X₇^{-/-} não apresentaram diferenças no número de células produtoras de IFN- γ em relação aos camundongos C57BL/6. Em relação aos linfócitos T CD8⁺, observou-se uma redução significativa no número de células dos camundongos C57BL/6 tratados com BBG em comparação com o grupo C57BL/6 não tratado (Figura 11A). Os camundongos controles não apresentaram diferenças entre os diferentes grupos. Embora os linfócitos B sejam resistentes a permeabilização por ATP, a resposta imune mediada pelos linfócitos B foi analisada, uma vez que observamos uma redução no número total de linfócitos B220⁺ em camundongos P2X₇^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG (Figura 10C). Não verificamos diferenças significativas no número de células produtoras de anticorpos entre os grupos controle e nem entre os grupos de camundongos no 7º dia de infecção (Figura 11B).

FIGURA 11 - Número de linfócitos T produtores de IFN γ e linfócitos B produtores de anticorpos em camundongos C57BL/6, P2X₇^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG. A. Número de células TCD4⁺ e TCD8⁺ produtoras de IFN γ em camundongos C57BL/6, P2X₇^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG, controles e infectados com *P. chabaudi*. Os gráficos representam as médias $\pm$ desvio padrão (n=3). B. Número de células produtoras de IgM, IgG1 e IgG2a em camundongos C57BL/6, P2X₇^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG, controles e infectados com *P. chabaudi*. Os dados são representativos de um experimento realizado (n=3).

4.7 Expressão de marcadores de superfície durante a fase aguda da infecção com *P. chabaudi*.

Analizamos a expressão de marcadores de superfície em células TCD4⁺, TCD8⁺ e B220⁺ de camundongos C57BL/6, P2X7R^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG. Verificamos, através da intensidade de fluorescência, uma redução na expressão de CD69 em linfócitos TCD4⁺ e B220⁺ nos camundongos C57BL/6 tratados com BBG em relação aos camundongos C57BL/6 (Figura 12A). Os camundongos P2X7R^{-/-} não apresentaram diferenças significativas e não encontramos alterações entre o grupo não infectado. Analisamos também a expressão de moléculas de classe II, CD80 e CD86 em linfócitos B e DC. Encontramos somente diferenças significativas, entre o grupo infectado, na intensidade de fluorescência de moléculas de classe II em linfócitos B (Figura 13). Outro fator importante observado foi a redução da expressão de CD62L em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos camundongos C57BL/6 tratados com BBG (Figura 12B). Verificamos também diferenças na expressão de CD62L entre os grupos controles.

FIGURA 12 - Expressão de marcadores de superfície durante a fase aguda da infecção com *P. chabaudi*. **A.** Expressão de CD69 em células T CD4⁺, TCD8⁺ e B 220⁺ do baço de camundongos WT, P2X₇^{-/-} e WT tratados com BBG, controles e infectados com *P. chabaudi*. **B.** Porcentagem de células TCD4⁺CD62L⁻ e TCD8⁺CD62L⁻ do baço de camundongos WT, P2X₇^{-/-} e WT tratados com BBG, controles e infectados com *P. chabaudi*. Todos os dados são representativos das médias $\pm$ desvio padrão de um experimento realizado (n=3). *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 entre os camundongos P2X₇KO e WT ou WT tratados com BBG e não tratados.

FIGURA 13 - Expressão de marcadores de superfície em células esplênicas de camundongos C57BL/6, P2X7^{-/-} e C57BL/6 tratados com BGG, no dia 7 de infecção por *P. chabaudi*. Expressão de IA^b, CD80 e CD86 em células T CD4⁺, T CD8⁺ e B 220⁺ esplênicas de camundongos C57BL/6, P2X7R e C57BL/6 tratados com BGG, controles e infectados com *P. chabaudi*. Os dados são representativos das médias $\pm$ desvio padrão de um experimento realizado (n=3). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001 entre os camundongos P2X7^{-/-} e C57BL/6 ou C57BL/6 tratados com BGG e não tratados.

4.8 Análise histopatológica do fígado de camundongos C57BL/6 tratados e não tratados com BBG e P2X7R^{-/-} infectados com *P. chabaudi* e controles.

Os cortes histológicos do fígado dos camundongos foram realizados para observarmos diferenças na patologia de camundongos C57BL/6, P2X7R^{-/-} e C57BL/6 tratados com BBG infectados com *P. chabaudi*. Portanto, os fígados dos camundongos C57BL/6 tratados e não tratados com BBG e P2X7R^{-/-} infectados com *P. chabaudi* e controles foram coletados e fixado em formaldeído 10% tamponado por 48h para histopatologia. A patologia foi avaliada por meio da microscopia dos cortes histológicos dos tecidos corados pelos métodos hematoxilina-eosina a fim de visualizar alterações celulares e teciduais.

O fígado dos camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi* apresentou regiões de intensa injúria tecidual em todas as secções analisadas (Figura 14B). No entanto, o fígado dos camundongos P2X7R^{-/-} infectados não apresentou nenhum sinal de lesão (Figura 14D). É importante ressaltar que o fígado dos camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} não infectados não apresentou injúria tecidual (Figuras 14A e C).

O tratamento com BBG obteve redução parcial das lesões hepáticas nos camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi* (Figura 14F). Porém, observamos que apenas o tratamento com BBG em camundongos C57BL/6 proporciona pequenas regiões de lesão no fígado (Figura 14E). As lesões hepáticas dos camundongos C57BL/6 infectados representam 24% da área total do fígado e os camundongos C57BL/6 tratados com BBG e infectados apresentaram 4% da área total do fígado lesionada (Figura 14G).

Figura 14 - Receptores P2X7 contribuem para o dano no fígado de camundongos infectados com *P. chabaudi*. Corte histológico do fígado de camundongos: A. C57BL/6 não infectados, B. C57BL/6 infectados com *P. chabaudi*, C. C57BL/6 não infectados e tratados BBG, D. C57BL/6 infectados com *P. chabaudi* e tratados com BBG, E. *P2X7R*^{-/-} não infectados, F. *P2X7R*^{-/-} infectados com *P. chabaudi*. G. As lesões foram calculadas de acordo com a área de dano (μm) em relação à área total. Os cortes histológicos foram corados pelos métodos hematoxilina-eosina. Todos os dados são representativos das médias $\pm$ desvio padrão de um experimento realizado (n=3). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001 entre os camundongos *P2X7KO* e WT ou WT tratados com BBG e não tratados.

5 DISCUSSÃO

Os mecanismos pelos quais o sistema imunológico consegue detectar e responder a sinais de dano, tais como o ATP, são alvos de estudos recentes. Durante muitos anos o eATP foi estudado como molécula neurotransmissora do sistema nervoso, atuando tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico (Burnstock, 2007). Além da participação neuronal, o eATP tem um importante papel em condições inflamatórias (Khakh e North, 2006). Sinais de dano, tais como o ATP, são liberados no meio extracelular durante a morte celular ou por meio de canais na membrana durante uma resposta inflamatória (Trautmann, 2009).

A ligação do ATP aos receptores P2X, chamados de receptores purinérgicos ionotrópicos, proporciona uma permeabilização celular que pode atuar tanto na fisiologia (Corriden e Insen, 2010) como na ativação celular. Durante uma resposta inflamatória, o ATP é liberado por meio de células apoptóticas ou necróticas, dano tecidual ou por sinalização parácrina e autócrina (Junger, 2011). Na malária, é possível que durante o rompimento de eritrócitos haja uma grande quantidade de ATP sendo liberada. A concentração citosólica de ATP varia entre 3 e 10 mM, no entanto a concentração extracelular de ATP fica em torno de 10 nM (Trautman, 2009). Esta diferença nas concentrações intra e extracelulares é mantida pela ação de ecto-atpases que metabolizam o eATP em ADP, AMP e adenosina. Portanto, as concentrações séricas de ATP são extremamente inferiores às concentrações intracelulares ou quantidades liberadas pelas células. Neste trabalho verificamos que a concentração de ATP no soro de camundongos infectados com *P. chabaudi* é maior após a ruptura dos eritrócitos. Além disso, os linfócitos do sangue também possuem diferenças na permeabilização. A permeabilização espontânea e induzida dos linfócitos do sangue aumenta após a ruptura dos eritrócitos. Embora seja difícil identificar a principal fonte de liberação de ATP, há trabalhos mostrando que eritrócitos infectados com *P. falciparum* são capazes de liberar grande quantidade de ATP no meio (Akkaya et al., 2009) e este ATP possui um importante papel durante a invasão pelo *P. falciparum* de eritrócitos humanos (Levano-Garcia et al., 2010). O sobrenadante de EP lisados realmente induz maior permeabilização celular que o sobrenadante de eritrócitos não parasitados. Além disso, verificamos que a permeabilização, acima dos níveis basais, é dependente do P2X7R. Desta

forma, estes resultados sugerem que realmente é possível haver permeabilização celular por meio da ligação do ATP a P2X7R após a ruptura de EP.

Em nosso estudo mostramos que no 4º dia de infecção com *P. chabaudi* os linfócitos e DC do baço estão mais suscetíveis à ação do eATP. As células do baço de camundongos infectados com *P. chabaudi*, quando expostas a crescentes doses de ATP, aumentam a permeabilização celular com maior intensidade em comparação com o controle. As DC são importantes células de detecção de sinais de dano (Di Virgilio, 2005) e, consequentemente, apresentaram alta capacidade de responder ao ATP mesmo em baixas concentrações. É importante ressaltar que a permeabilização encontrada em células T CD4⁺ e DC é dependente do P2X7R. Além da utilização de camundongos P2X7R^{-/-}, outro fator que corroborou para esclarecermos que a permeabilização é dependente do P2X7R foi a utilização de um antagonista de P2X7R (BBG). O tratamento de células com BBG também foi capaz de reduzir a permeabilização de células do baço de camundongos infectados e controles.

O resultado da exposição das células ao eATP está diretamente relacionado com a concentração de ATP no meio. As concentrações de ATP acima de 100 µM são capazes de ativar P2X7R e induzir a abertura do poro (DiVirgilio et al., 2001). Porém, concentrações abaixo de 100 µM podem induzir a abertura de canais de íons por meio da ligação de receptores P2X (DiVirgilio et al., 2001). A abertura de canais em linfócitos T induz o influxo de Ca²⁺ extracelular e auxilia a ativação e proliferação de linfócitos T (Loomis et al., 2003; Budagian et al, 2003) e o eATP em linfócitos T CD4⁺ atua como um fator co-estimulador, sendo que a geração e liberação de mais ATP depende exclusivamente da força de ativação do linfócito T (Schenk, 2008). Sabendo que durante a infecção aguda pelo *P. chabaudi*, há proeminente ativação de linfócitos T CD4⁺ (Langhorne et al., 1989), tivemos grande interesse em entender o papel do eATP na proliferação de tais células. Em nossos achados, o eATP na concentração de 25 µM proporciona um aumento na proliferação de células T CD4⁺ de camundongos no 4º dia de infecção com *P. chabaudi* que foram estimulados com EP na cultura. O aumento na proliferação com baixas doses de ATP não é necessariamente dependente de P2X7R, uma vez que a formação do poro necessita de altas concentrações de ATP. Este resultado

sugere que possa haver a participação de outros receptores de eATP que auxiliariam na proliferação celular. Em 2010, Woehrle e colaboradores mostraram que a liberação de ATP através de canais de panexina 1 e a ativação autócrina de receptores P2X1 e P2X4 tem importante função na amplificação do sinal do TCR e comunicação entre células T e APC nas sinapses imunes. Concentrações acima de 25 μ M de ATP diminuem o número de células proliferando e não proliferando de forma que temos a falsa impressão de aumento na proliferação celular com altas concentrações de ATP. Estudos mostram que a ativação prolongada de P2X7R com altas concentrações de ATP pode induzir apoptose (Aswad e Dennert, 2006) ou com baixas concentrações induzir a ativação celular (Adinolfi et al., 2005). Porém, a inibição da ligação do ATP a P2X7R, por meio do tratamento com BBG ou Apyrase, também reduz o número de células proliferando. É interessante ressaltar que o tratamento das células com BBG reduz o número de células grandes e reduz a expressão de marcadores da ativação tais como CD69. Em resumo, os nossos resultados corroboram a noção de que o eATP em baixas concentrações é importante para a manutenção fisiológica da célula e ativação celular e em altas concentrações pode atuar como um sinal de dano e induzir a morte celular.

A fase inicial que resulta em superprodução de citocinas pode depender do tipo de interação entre células do hospedeiro, o parasita e os sinais de dano liberados. Muitos estudos têm focado no papel dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) sobre as células do hospedeiro usadas para reconhecer e responder ao plasmódio. Moléculas do parasita e do hospedeiro, tais como GPI e hemozoína, induzem uma resposta na fase aguda com ativação local de monócitos e do endotélio vascular (Ropert et al., 2008). Além disso, os sinais de dano também são mecanismos de indução de resposta imune. McDonald e colaboradores mostraram que os sinais de dano intravasculares guiam os neutrófilos para sítios de inflamação estéril, outro grupo verificou que canais de panexina-1 são capazes de controlar a permeabilidade da membrana e liberação de sinais “find-me” durante a apoptose (Chekeni et al., 2010).

A produção de IFN- γ é intensa durante a fase aguda da malária. A produção de citocinas pró-inflamatórias são importantes para o controle do

parasito, no entanto a resposta inflamatória exacerbada pode induzir grave patologia (Schofield e Grau, 2005). Verificamos que o tratamento das células com BBG ou apyrase é capaz de reduzir a produção de IFN- γ em culturas de esplenócitos de camundongos no 4º dia de infecção. Ainda assim, em altas concentrações de eATP, também observamos redução da produção de citocinas na cultura. Estes resultados indicam que a concentração de eATP interfere no resultado inicial da resposta imune, principalmente atuando na ativação dos linfócitos. Em altas concentrações, a ligação do eATP ao P2X7R talvez seja importante para regular a produção exacerbada de IFN- γ . Verificamos também que a produção de NO aumentou em baixas concentrações de eATP.

As citocinas IL-10 e IL-4 foram somente liberadas, em maior quantidade, na cultura de células do baço de camundongos no 4º dia de infecção que receberam estímulo. A IL-10 tem um importante papel protetor na malária. Durante a infecção com *P. berghei* ANKA, a IL-10 parece estar envolvida na proteção contra a patogênese induzida pela resposta Th1 (Kossodo et al., 1997). Além disso, experimentos usando camundongos *knockouts* para IL-10 infectados com *P. chabaudi* apresentam aumento na patologia mediado por citocinas pró-inflamatórias (Li et al., 1999).

O papel do linfócito T CD8⁺ na fase aguda da malária é principalmente relatado durante a fase hepática, com alta produção de IFN- γ que ajudam na morte de parasitas em hepatócitos infectados (Schofield et al, 1987). Durante o estágio eritrocítico de camundongos infectados com *P. chabaudi*, observamos que a permeabilização de linfócitos T CD8⁺ não acompanhou o ciclo do parasito, como encontrado nos linfócitos T CD4⁺ e a proliferação de linfócitos T CD8⁺ em cultura sob estímulo de EP é baixa. Tem sido mostrado que o estágio sanguíneo do plasmódio induz DC a suprimir a resposta de linfócitos T CD8⁺ (Ocana-Morgner et al., 2003). A adição de ATP em cultura reduz o número de linfócitos T CD8⁺. Os linfócitos T CD8⁺ podem também influenciar na patogênese da malária (Yanez et al, 1996; Belnoue et al., 2002). Em camundongos infectados com *P. berghei* ANKA, o número de linfócitos T CD8⁺ infiltrando o cérebro é aumentado durante a malária cerebral, e estas células contribuem para mudanças na permeabilidade da barreira hematoencefálica através de mecanismos dependentes de perforina (Nitcheu et al, 2003).

As análises realizadas *in vivo* apresentaram o mesmo perfil dos experimentos realizados *in vitro*. Camundongos tratados com BBG apresentaram um atraso na parasitemia no 6º dia de infecção, no entanto esta diferença não persistiu em dias posteriores. Embora não tenhamos observado diferenças significativas na parasitemia, os camundongos P2X7R^{-/-} e os camundongos tratados com BBG apresentaram redução no número total de esplenócitos. Uma possível explicação para esta redução é que a inibição da ligação do ATP a P2X7R resulta em diminuição da ativação celular e, conseqüentemente, redução na proliferação. Camundongos P2X7R^{-/-} obtiveram maiores reduções em linfócitos B e DC e camundongos tratados com BBG apresentaram redução em linfócitos B, DC e linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. No entanto, não foi verificada uma redução significativa no número de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ nos camundongos tratados com BBG, porém encontramos uma redução na população de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺.

Marcadores de ativação tais como CD69 também foram reduzidos em camundongos tratados com BBG, desta forma corroborando os resultados *in vitro*. Esta redução na resposta inflamatória também foi observada por Peng e colaboradores em ratos tratados com BBG que sofreram lesão na coluna, além de uma melhora na injúria local. Os camundongos tratados com BBG também apresentaram alta expressão de CD62L nos linfócitos. A alta expressão de CD62L pode estar relacionada com o atraso na ativação celular e redução da resposta imunológica. A utilização de grupos de camundongos mais numerosos deve contribuir para reforçar a importância do ATP e do P2X7R na resposta imune contra estes parasitos. Camundongos tratados com BBG também reduziram a expressão de moléculas de classe II do MHC em linfócitos B. As DC não apresentaram diferenças significativas na expressão de moléculas de classe II do MHC, embora alguns estudos mostrem que a ligação de ATP ao P2X7R potencialize a apresentação de antígenos pelas DC (Mutini et al, 1999). Talvez a diferença na expressão de moléculas de classe II em DC de camundongos tratados com BBG seja expressiva no início da infecção com *P. chabaudi*.

As lesões no fígado de camundongos infectados com *P. chabaudi* encontram-se particularmente extremamente exacerbadas no 7º dia de infecção. Surpreendentemente, grande parte destas manifestações patológicas

geradas no fígado é dependente de P2X7R. O tratamento de camundongos com BBG também reduz as áreas de injúria no fígado. Portanto, concluímos que a injúria hepática que ocorre durante a infecção aguda pelo *P. chabaudi* é induzida pela ativação de P2X7R. Durante a infecção aguda da malária, a injúria no fígado poderia ser proveniente da ativação dependente de P2X7R em diversos tipos celulares. Em particular, a estimulação mediada por P2X7R de células NKT ativadas induz aumento da produção de citocinas e injúria hepática (Kawamura et al., 2006). Em 2010, um trabalho publicado pelo nosso grupo mostrou que, durante a infecção aguda com *P. chabaudi*, há um aumento no número de células NKT no baço e produção de IFN- γ por estas células (Muxel et al., 2010). Em conjunto, nossos resultados mostram que, durante a fase aguda do ciclo eritrocítico do *P. chabaudi*, linfócitos T e principalmente DC são responsivos ao ATP. No baço, o ATP é importante para a ativação, proliferação de linfócitos e, conseqüentemente, para a produção de IFN- γ . Interessantemente, a administração de um antagonista do P2X7R resultou em queda da resposta imune inicial. Esta diminuição na resposta imune poderia contribuir para a redução das manifestações patológicas ocasionadas pela exacerbação da resposta imune aguda na malária.

6 CONCLUSÕES

- A infecção com o *P. chabaudi* é capaz de aumentar a permeabilização dependente do P2X7R de linfócitos e DC do sangue e do baço espontânea e em resposta ao eATP.
- A quantidade de ATP no soro e a permeabilização de linfócitos T do sangue de camundongos infectados com *P. chabaudi* é maior após a ruptura dos eritrócitos.
- O sobrenadante de EP lisados é capaz de induzir um aumento na permeabilização de células do baço em comparação com o sobrenadante de eritrócitos não parasitados.
- A proliferação de linfócitos T CD4⁺ do baço de camundongos infectados com *P. chabaudi* em cultura, estimulada por EP, aumenta na presença de baixas concentrações de eATP e diminui em altas concentrações.
- O tratamento *in vitro* com BBG proporciona uma redução de proliferação de linfócitos, diminuição na expressão de CD69 e queda no número de linfócitos T CD4⁺ e B de maior tamanho.
- A hidrólise do ATP catalisada por Apyrase em cultura de esplenócitos com EP resulta em diminuição da proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺.
- Alta concentração de eATP reduz a produção de citocinas IL-6, TNF- α , IL-4 e IL-10 na cultura de esplenócitos com EP.
- Camundongos P2X7R^{-/-} no 7º dia de infecção com *P. chabaudi* reduzem o número de células B e DC do baço.
- Camundongos tratados com BBG no 7º dia de infecção com *P. chabaudi* reduzem o número de células T CD4⁺, T CD8⁺, B e DC do baço.
- A ausência do P2X7R ou o tratamento com BBG em camundongos infectados com *P. chabaudi* protege o fígado de injúria tecidual.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Adinolfi, E., M. G. Callegari, et al. "Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth." *Mol Biol Cell*. 2005; 16(7): 3260-72.
- Akkaya, C., E. Shumilina, et al. "The Plasmodium falciparum-induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway." *Pflugers Arch*. 2009; 457(5): 1035-47.
- Angulo, I., M. Fresno "Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria." *Clin Diagn Lab Immunol*. 2009; 9(6): 1145-52.
- Artavanis-Tsakonas, K. and E. M. Riley. "Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes." *J Immunol*. 2002; 169(6): 2956-63.
- Aswad, F., G. Dennert. "P2X7 receptor expression levels determine lethal effects of a purine based danger signal in T lymphocytes." *Cell Immunol*. 2006 243(1): 58-65.
- Bagnaresi, P., et al. Unlike the synchronous Plasmodium falciparum and P. chabaudi infection, the P. berghei and P. yoelii asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int J Gen Med*. 2009; v.2: 47-55
- Belnoue, E., M. Kayibanda, et al. "On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria." *J Immunol*. 2002; 169(11): 6369-75.
- Bours, M. J., E. L. Swennen, et al. "Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation." *Pharmacol Ther*. 2006; 112(2): 358-404.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscript submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: [http://www.icmje.org\[2007](http://www.icmje.org[2007) [2007 May

Budagian, V., E. Bulanova, et al. "Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56lck, MAP kinases, and transcription factors AP-1 and NF-kappa B." *J Biol Chem.* 2003; 278(3): 1549-60.

Buffet, P. A., I. Safeukui I et al. "The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology." *Blood.* 2011; 117(2):381-92.

Bulanova, E., V. Budagian, et al. "Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells." *J Immunol.* 2005; 174(7): 3880-90.

Burnstock, G. "Purinergic nerves." *Pharmacol Rev.* 1972; 24(3): 509-81.

Burnstock, G. "Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission." *Physiol Rev.* 2007; 87(2): 659-797.

Chekeni, F. B., M. R. Elliott, et al. "Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis." *Nature.* 2010; 467(7317): 863-7.

Clark, I. A., A. C. Budd, et al. "Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release." *Malar J.* 2006; 5: 85.

Corriden, R. and P. A. Insel "Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation." *Sci Signal.* 2009; 3(104): re1.

Coutinho-Silva, R., J. L. Perfettini, et al. "Modulation of P2Z/P2X(7) receptor activity in macrophages infected with *Chlamydia psittaci*." *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 280(1): C81-9.

Cox, J., S. Semoff, et al. "*Plasmodium chabaudi*: a rodent malaria model for in-vivo and in-vitro cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs." *Parasite Immunol.* 1987; 9(5): 543-61.

Di Virgilio, F., P. Chiozzi, et al. "Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells." *Blood.* 2001; 97(3): 587-600.

Di Virgilio, F. "Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells." *Purinergic Signal*. 2005; 1(3): 205-9.

D'Império Lima, M. R., Bandeira, A., Falanga, P., Freitas, A. A. , Kipnis, T. L., Pereira da Silva, L. , and Coutinho, A. "Clonal analysis of B lymphocyte responses to *Plasmodium chabaudi* infection of normal and immunoprotected mice." *Int. Immunol*. 1991; 3: 1207.

D'Imperio Lima, M. R., J. M. Alvarez, et al. "Ig-isotype patterns of primary and secondary B cell responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* correlate with IFN-gamma and IL-4 cytokine production with CD45RB expression by CD4+ spleen cells." *Scand J Immunol*. 1996; 43(3): 263-70.

Dinareello, C. A. "The IL-1 family and inflammatory diseases." *Clin Exp Rheumatol*. 2002; 20(5 Suppl 27): S1-13.

Elias, R. M., L. R. Sardinha, et al. "Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria." *J Immunol*. 2005; 174(2): 790-9.

Engwerda, C. R., L. Beattie, et al. "The importance of the spleen in malaria." *Trends Parasitol*. 2005; 21(2): 75-80.

Falanga, P. B., M. R. D'Imperio Lima, et al. "Isotypic pattern of the polyclonal B cell response during primary infection by *Plasmodium chabaudi* and in immune-protected mice." *Eur J Immunol*. 1987; 17(5): 599-603.

Ferrari, D., C. Pizzirani, et al. "The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release." *J Immunol*. 2006; 176(7): 3877-83.

Franklin, B. S., P. Parroche, et al. "Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(14): 5789-94

Franklin, B. S., S. O. Rodrigues, et al. "MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria." *Microbes Infect*. 2007; 9(7): 881-90.

Fredholm, B. B., I. J. AP, et al. "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors." *Pharmacol Rev.* 2001; 53(4): 527-52.

Good, M. F., D. L. Doolan "Malaria vaccine design: immunological considerations." *Immunity.* 2010; 33(4): 555-66.

Gu, B., L. J. Bendall, et al. "Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases." *Blood.* 1998; 92(3): 946-51.

Hafalla, J. C., O. Silvie, et al. "Cell biology and immunology of malaria." *Immunol Rev.* 2010; 240(1): 297-316.

Helmby, H., G. Jonsson, et al. "Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS." *Infect Immun.* 2000; 68(3): 1485-90.

Ishii, K. J. and S. Akira "Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids." *Curr Opin Immunol.* 2008; 20(5): 524-9.

Junger, W. G. "Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling." *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(3): 201-12.

Kawamura, H., F. Aswad, et al. "P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis." *J Immunol.* 2006; 176(4): 2152-60.

Khakh, B. S., R. A. North "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease." *Nature.* 2006; 442(7102): 527-32.

Kono, H., K. L. Rock "How dying cells alert the immune system to danger." *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(4): 279-89.

Kossodo, S., C. Monso, et al. "Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria." *Immunology.* 1997; 91(4): 536-40.

Kurtzhals, J. A., V. Adabayeri, et al. "Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria." *Lancet.* 1998; 351(9118): 1768-72.

Langhorne, J., S. J. Meding, et al. "The response of CD4+ T cells to *Plasmodium chabaudi chabaudi*." *Immunol Rev.* 1989; 112: 71-94.

Langhorne, J., F. M. Ndungu, et al. "Immunity to malaria: more questions than answers." *Nat Immunol.* 2008; 9(7): 725-32.

Levano-Garcia, J., A. R. Dluzewski, et al. "Purinergic signalling is involved in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* invasion to red blood cells." *Purinergic Signal.* 2010; 6(4): 365-72.

Li, C., I. Corraliza, et al. "A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice." *Infect Immun.* 1999; 67(9): 4435-42.

Locovei, S., L. Bao, et al. "Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(20): 7655-9.

Looareesuwan, S., T. M. Davis, et al. "Erythrocyte survival in severe *falciparum* malaria." *Acta Trop.* 1991; 48(4): 263-70.

Loomis, W. H., S. Namiki, et al. "Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation." *J Biol Chem.* 2003; 278(7): 4590-6.

Mackinnon, M.J., et al. "*Plasmodium chabaudi*: rosetting in a rodent malaria model". *Exp Parasitol.* 2002; 101, 121-128

Mantuano-Barradas, M., A. Henriques-Pons, et al. "Extracellular ATP induces cell death in CD4+/CD8+ double-positive thymocytes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*." *Microbes Infect.* 2003; 5(15): 1363-71.

Mariathasan, S., D. M. Monack "Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation." *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(1): 31-40

McCall, M. B., M. G. Netea, et al. "*Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses." *J Immunol.* 2007; 179(1): 162-71.

McDonald, B., K. Pittman, et al. "Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation." *Science.* 2010; 330(6002): 362-6.

Merckx, A., G. Bouyer, et al. (2009). "Anion channels in *Plasmodium-falciparum*-infected erythrocytes and protein kinase A." *Trends Parasitol.* 25(3): 139-44.

Ministério da Saúde - Malária. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/>
Acesso em: [2011. ago. 05].

Mohan, K., P. Moulin, et al. "Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection." *J Immunol.* 1997; 159(10): 4990-8.

Mota, M. M., K. N. Brown, et al. "Acute *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria infection induces antibodies which bind to the surfaces of parasitized erythrocytes and promote their phagocytosis by macrophages in vitro." *Infect Immun.* 1998; 66(9): 4080-6.

Mutini, C., S. Falzoni, et al. "Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation." *J Immunol.* 1999; 163(4): 1958-65.

Muxel, S. M., A. P. Freitas do Rosario, et al. "Comparative analysis of activation phenotype, proliferation, and IFN-gamma production by spleen NK1.1(+) and NK1.1(-) T cells during *Plasmodium chabaudi* AS malaria." *J Interferon Cytokine Res.* 2010; 30(6): 417-26.

Nitcheu, J., O. Bonduelle, et al. "Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis." *J Immunol.* 2003; 170(4): 2221-8.

North, R. A. "Molecular physiology of P2X receptors." *Physiol Rev.* 2002; 82(4): 1013-67.

Ocana-Morgner, C., M. M. Mota, et al. "Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells." *J Exp Med.* 2003; 197(2): 143-51.

Orengo, J. M., J. E. Evans, et al. "Plasmodium-induced inflammation by uric acid." *PLoS Pathog.* 2008; 4(3): e1000013.

Organização Mundial de saúde (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/malaria/en/>
Acesso em: [2011. ago. 05]

Parroche, P., F. N. Lauw, et al. "Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(6): 1919-24.

Peng, W., M. L. Cotrina, et al. "Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(30): 12489-93.

Podoba, J. E. and M. M. Stevenson "CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS." *Infect Immun*. 1991; 59(1): 51-8.

Roport, C., B. S. Franklin, et al. "Role of TLRs/MyD88 in host resistance and pathogenesis during protozoan infection: lessons from malaria." *Semin Immunopathol*. 2008; 30(1): 41-51.

Sardinha, L. R., M. R. D'Imperio Lima, et al. "Influence of the polyclonal activation induced by *Plasmodium chabaudi* on ongoing OVA-specific B- and T-cell responses." *Scand J Immunol*. 2002; 56(4): 408-16.

Schenk, U., A. M. Westendorf, et al. "Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels." *Sci Signal*. 2008; 1(39): ra6.

Schliess, F., R. Reinehr, et al. "Osmosensing and signaling in the regulation of mammalian cell function." *FEBS J*. 2007; 274(22): 5799-803.

Schofield, L., J. Villaquiran, et al. "Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites." *Nature*. 1987; 330(6149): 664-6.

Schofield, L., G. E. Grau "Immunological processes in malaria pathogenesis." *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(9): 722-35.

Scragg, I. G., M. Hensmann, et al. "Early cytokine induction by *Plasmodium falciparum* is not a classical endotoxin-like process." *Eur J Immunol*. 1999; 29(8): 2636-44.

Seixas, E. M. and J. Langhorne "gammadelta T cells contribute to control of chronic parasitemia in *Plasmodium chabaudi* infections in mice." *J Immunol*. 1999; 162(5): 2837-41.

Seixas, E., J. F. Moura Nunes, et al. "The interaction between DC and

Plasmodium berghei/chabaudi-infected erythrocytes in mice involves direct cell-to-cell contact, internalization and TLR." Eur J Immunol. 2009; 39(7): 1850-63.

Steinberg, T. H., H. P. Buisman, et al. "Effects of extracellular ATP on mononuclear phagocytes." Ann N Y Acad Sci. 1990; 603: 120-9.

Stevenson, M. M., E. M. Riley "Innate immunity to malaria." Nat Rev Immunol. 2004; 4(3): 169-80.

Suss G, Eichmann K, Kury E, Linke A, Langhorne J "Roles of CD4- and CD8-bearing T lymphocytes in the immune response to the erythrocytic stages of *Plasmodium chabaudi*". Infect Immun. 1988; 56: 3081–3088.

Trautmann, A. "Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". " Sci Signal. 2009; 2(56): pe6.

Turner, G. "Cerebral malaria." Brain Pathol. 1997; 7(1): 569-82.

Walther, M., J. E. Tongren, et al. "Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection." Immunity. 2005; 23(3): 287-96.

Wang, Y., R. Roman, et al. "Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation." Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(21): 12020-5.

Wassmer, S. C., C. A. Moxon, et al. "Vascular endothelial cells cultured from patients with cerebral or uncomplicated malaria exhibit differential reactivity to TNF." Cell Microbiol. 2011; 13(2): 198-209.

Woehrle, T., L. Yip, et al. "Hypertonic stress regulates T cell function via pannexin-1 hemichannels and P2X receptors." J Leukoc Biol. 2010; 88(6): 1181-9.

Woehrle, T., L. Yip, et al. "Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse." Blood. 2010; 116(18): 3475-84.

Yanez, D. M., D. D. Manning, et al. "Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria." J Immunol. 1996; 157(4): 1620-4.

Yap, G. S. and M. M. Stevenson "Differential requirements for an intact spleen in induction and expression of B-cell-dependent immunity to *Plasmodium chabaudi* AS." *Infect Immun.* 1994; 62(10): 4219-25.

Yilmaz, O., L. Yao, et al. "ATP scavenging by the intracellular pathogen *Porphyromonas gingivalis* inhibits P2X7-mediated host-cell apoptosis." *Cell Microbiol.* 2008; 10(4): 863-75.

Zhu, J., G. Krishnegowda, et al. "Proinflammatory responses by glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum* are mainly mediated through the recognition of TLR2/TLR1." *Exp Parasitol.* 2011; 128(3): 205-11.

Zimmermann, H. "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000; 362(4-5): 299-309.