ISABELLA CUNHA

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR P2X7 NO CONTROLE DAS
POPULAÇÕES DE CÉLULAS TFH E B ESPLÊNICAS E NA
PROTEÇÃO CONTRA O *Plasmodium yoelii* 17XNL**

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

São Paulo

2018

ISABELLA CUNHA

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR P2X7 NO CONTROLE DAS
POPULAÇÕES DE CÉLULAS TFH E B ESPLÊNICAS E NA
PROTEÇÃO CONTRA O *Plasmodium yoelii* 17XNL**

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

Área de concentração: Imunologia

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

Versão corrigida

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cunha, Isabella

Participação do receptor P2X7 no controle das
populações de células Tfh e B esplênicas e na
proteção contra o Plasmodium yoelii 17XNL / Isabella
Cunha; orientadora Maria Regina D' Império Lima. -
- São Paulo, 2018.
70 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Plasmodium yoelii 17XNL. 2. Receptor P2X7. 3.
Células Tfh. 4. Células B do centro germinativo. 5.
Anticorpos. I. D' Império Lima, Maria Regina,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Isabella Cunha

Título da Dissertação: Participação do receptor P2X7 no controle das populações de células Tfh e B esplênicas e na proteção contra o *Plasmodium yoelii* 17XNL.

Orientador: Prof. Dra. Maria Regina D' Império Lima

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

() Aprovada

() Reprovada

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3061-7788 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Importância do receptor p2x7 na célula t helper folicular durante a infecção pelo plasmodium chabaudi chabaudi (as)*", registrado sob o protocolo nº **109/2015**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **07/12/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Maria Regina D'Imperio Lima**
- Membros da Equipe: **Renan Siqueira (Pós-graduando)**

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Importance of p2x7 receptor on t helper follicular cell during plasmodium chabaudi chabaudi (as) infection*", protocol nº **109/2015**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **12/7/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Maria Regina D'Imperio Lima**
- Team members: **Renan Siqueira (Graduate Student)**

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/6 C57BL/6 (P2X7R-/-)	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	334
		Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	334

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-900
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Participação do receptor P2X7 na diferenciação e morte das células Tfh, durante o desenvolvimento da malária experimental*", registrado sob o protocolo nº **45/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **18/04/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Maria Regina D'Império Lima**
- Departamento: *Imunologia*
- Membros da Equipe: *Isabella Cunha (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Participation of the P2X7 receptor in the differentiation and death of Tfh cells during the development of experimental malaria*", protocol nº **45/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **4/18/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Maria Regina D'Império Lima**
- Team members: *Isabella Cunha (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/6 P2x7	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	150
	C57BL/6 CD4	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	30
	C57BL/6	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	400
	C57BL/6 Cd45.1	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	6
	C57BL/6 Caspase 1	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	16
	C57BL/6 ASC-1	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	16
	C57BL/6 NlrP3	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	16

São Paulo, 18 de abril de 2017.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais, Nancy e Marco Pollo, que tanto me apoiaram e me deram suporte durante toda minha jornada; e à minha irmã, Rafaela, por todo o carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

De todo o coração sou grata à Deus, ao meu anjo da guarda e aos meus guias espirituais, por nunca me permitirem desistir desta longa jornada.

Àqueles que representam minha base, meus pais, **Nancy e Marco Pollo**, , minha irmã, **Rafaela** e meu cunhado, **João Paulo**. Ao me dedicarem seu amor, carinho, compreensão, incentivo e todo apoio nessa fase que se encerra. À vocês minha mais sincera gratidão.

À minha orientadora, Dra. **Maria Regina D' Império Lima**, pela sua paciência comigo e por todas as vezes que me incentivou a aprender mais. Agradeço pelas oportunidades que me proporcionou, por abrir as portas do seu laboratório e me permitir trabalhar e aprender neste universo tão rico de conhecimento.

À pós doutoranda **Érika Machado de Salles** pela oportunidade de fazer parte do seu artigo, por todos os socorros em busca de conhecimento e paciência.

Ao técnico de laboratório **Rogério Silva do Nascimento** pela indicação para compor a equipe, confiança no meu potencial, suporte em todos os momentos difíceis e todas nossas conversas ao longo destes 2 anos.

Ao doutorando **Renan** pelos primeiros ensinamentos no laboratório, pelo carinho e todo o suporte.

À pós doutoranda **Paula Carolina de Souza** por todas nossas conversas, idas ao cinema e teatro e todo o suporte psicológico. Por todo o carinho e disponibilidade sempre, o meu eterno obrigada.

Ao professor **José Maria Alvarez Mosig** (Pepe) pelo incentivo, carinho e contribuição durante nossas reuniões de laboratório.

Às técnicas **Áurea e Silvana** por toda ajuda que sempre me deram.

Aos colegas de laboratório **Beatriz, Paulo Cesar, Rafael, Raíssa, Maria, Caio, Débora, Gislane, Igor e Paulo** pelos incentivos, socorro e amizade.

Aos amigos **Tábata** e **Marco Antonio** pelos nossos finais de semana de estudo e dedicação no primeiro semestre de estágio.

À minha amiga **Josiane Betim de Assis** por toda a ajuda nas citometrias, e ensinamentos de metodologia. Pelo consolo em todos os momentos de desespero, pelo abraço amigo, meu mais sincero obrigada.

Ao meu amigo **Caio Silveira** pelo companheirismo no final desta jornada, e pelo incentivo em não desistir.

Aos meus queridos amigos da portaria e da limpeza, pelas conversas, risadas, amizade e carinho. À coordenadora do biotério **Sandra Alexandre** pela disponibilização de camundongos, por toda ajuda e conversas. À toda equipe do biotério pela manutenção e cuidados com os animais.

Ao professor **Jean Pierre Schatzamnn Peron** pela oportunidade que me proporcionou ingressar na pós graduação e estagiar no seu laboratório.

Aos **Drs. Flavio Vieira Loures, Tarcio Braga e Maria Notomi Sato**, por aceitarem compor a minha banca de qualificação e sugestões que contribuíram na realização deste projeto.

À **Maria Eni**, secretária da Pós-Graduação, por sempre acreditar no meu potencial, pela ajuda espiritual e pelo carinho.

À todos os amigos de norte à sul do país que de alguma forma me incentivaram a continuar e realizar este sonho.

Por fim, agradeço à **CAPES** e à **FAPESP**, que proporcionaram o auxílio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”

Cora Coralina

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro do Programa de Excelência Acadêmica-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROEX-CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Projeto Temático 2015/20432-8).

RESUMO

CUNHA, I. **Participação do receptor P2X7 no controle das populações de células Tfh e B esplênicas e na proteção contra o *Plasmodium yoelii***. 2018. 69 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A imunidade à malária é de curta duração e os indivíduos curados são susceptíveis a reinfecções. Algumas evidências sugerem que a deficiência na produção de anticorpos específicos ao parasito possa explicar a dificuldade em se desenvolver uma resposta imune eficaz contra a malária. As células B são selecionadas em um ambiente altamente regulado, denominado centro germinativo, localizado nos órgãos linfoides secundários. A interação entre as células T foliculares (Tfh) e células B do centro germinativo permite a produção de plasmócitos de vida longa que secretam anticorpos com alta afinidade pelo antígeno e a geração de células B de memória. Estudos recentes mostraram que a sinalização do receptor P2X7 pelo ATP extracelular afeta a resposta das células T. Na infecção pelo *Plasmodium chabaudi*, o receptor P2X7 contribui para o controle do parasito favorecendo a produção de células Th1 produtoras de IFN- γ em detrimento da população de células Tfh. Neste trabalho, buscamos avaliar a participação do receptor P2X7 na produção das células Tfh e células B do centro germinativo em camundongos infectados pelo *Plasmodium yoelii* 17XNL. Este estudo justifica-se uma vez que a proteção contra o *P. yoelii* 17XNL depende principalmente dos anticorpos, enquanto o IFN- γ é essencial para o controle da infecção aguda pelo *P. chabaudi*. Nossos resultados mostram que camundongos nocautes para o receptor P2X7 (P2X7^{-/-}) apresentaram menores parasitemias que os camundongos C57BL/6 na fase aguda da infecção. Porém, o tempo decorrido até pico de parasitemia e o controle do parasito foram semelhantes em ambos os grupos. Observamos ainda uma anemia menos acentuada na ausência do receptor P2X7, mas este achado deve ser confirmado pois trata-se de um único experimento. Camundongos P2X7^{-/-} infectados apresentaram maior aumento no número de células T CD4⁺, células Tfh, células B, células B do centro germinativo e plasmócitos no baço, em relação aos camundongos C57BL/6 infectados. Além disso, as frequências de células mortas nas populações de células T CD4⁺ e B eram menores na ausência do receptor P2X7. Entretanto, na fase aguda da infecção, os níveis séricos de anticorpos IgM e IgG2c específicos ao parasito eram semelhantes nos camundongos P2X7^{-/-} e C57BL/6. Concluindo, este estudo mostra que o receptor P2X7 prejudica a expansão das populações de células Tfh e B do centro germinativo, assim como o controle da malária causada pelo *P. yoelii* 17XNL.

ABSTRACT

CUNHA, I. Participation of the P2X7 receptor in the control of splenic Tfh and B cell populations and protection against *Plasmodium yoelii*. 2018. 69 f. Dissertation (Master in Immunology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Immunity to malaria is short-lived and cured individuals are susceptible to reinfections. Some evidence suggests that deficiency in the production of parasite-specific antibodies may explain the difficulty in developing an effective immune response against malaria. B cells are selected in a highly regulated environment, named the germinal center, located in the secondary lymphoid organs. The interaction between follicular T cells (Tfh) and germinal center B cells allows the production of long-lived plasma cells that secrete antibodies with high affinity for the antigen and generation of memory B cells. Recent studies have shown that P2X7 receptor signaling by extracellular ATP affects the T cell response. In *Plasmodium chabaudi* infection, the P2X7 receptor contributes to parasite control by favoring the production of Th1 cells secreting IFN- γ to the detriment of the Tfh cell population. In this work, we aimed to evaluate the participation of the P2X7 receptor in the production of Tfh cells and germinal center B cells in mice infected with *Plasmodium yoelii* 17XNL. This study is justified since the protection against *P. yoelii* 17XNL depends mainly on antibodies, whereas IFN- γ is essential for the control of acute *P. chabaudi* infection. Our results show that P2X7 knockout mice (P2X7^{-/-}) displayed lower parasitemias than the C57BL/6 mice in the acute phase of infection. However, the time elapsed until the peak of parasitemia and control of the parasite were similar in both groups. We also observed less marked anemia in the absence of the P2X7 receptor, but this finding must be confirmed because a single experiment was performed. Infected P2X7^{-/-} mice showed a greater increase in the number of CD4⁺ T cells, Tfh cells, B cells, germinal center B cells and plasma cells in the spleen, compared to infected C57BL/6 mice. In addition, the frequencies of dead cells in the populations of CD4⁺ T cells and B cells were lower in the absence of the P2X7 receptor. Nevertheless, in the acute phase of infection, serum levels of parasite-specific IgM and IgG2c antibodies were similar in P2X7^{-/-} and C57BL/6 mice. In conclusion, this study shows that the P2X7 receptor impairs the expansion of the Tfh cell and germ center B cell populations, as well as the control of *P. yoelii* 17XNL malaria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	21
Figura 2 Ação de anticorpos contra o merozoíto e o eritrócito infectado.....	24
Figura 3 Sinalização Purinérgica na ativação das Célula T.....	29
Figura 4 Monitoramento da parasitemia e hemoglobina em camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} infectados pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 5 Estratégia de análise usada para definir subpopulações de células CD4 ⁺ e CD19 ⁺ no baço de camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} infectados pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 6 Estratégia de análise usada para definir subpopulações de células CD4 ⁺ e CD19 ⁺ no baço de camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} infectados pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 7 Frequência e número absoluto de células CD4 ⁺ LD ⁺ no baço de camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} infectados pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 8 Frequência e número absoluto de células CD19 ⁺ LD ⁺ no baço de camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} infectados pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 9 Análise das populações de células ICOS ⁺ BCL6 ⁺ ; CXCR5 ⁺ BCL6 ⁺ e PD-1 ⁺ BCL6 ⁺ no baço de camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} no dia 14 de infecção pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 10 Frequência e número absoluto de células ICOS ⁺ BCL6 ⁺ ; CXCR5 ⁺ BCL6 ⁺ e PD-1 ⁺ BCL6 ⁺ no baço de camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} no dia 14 de infecção pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 11 Cinética da população de células PD-1 ^{high} CXCR5 ^{high} no baço de camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} infectados pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 12 Frequência e número absoluto de células Fas ⁺ GL7 ⁺ CD19 ⁺ no baço de camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} infectados pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 13 Frequência e número absoluto de células CD138 ⁺ CD19 ⁺ no baço de camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} infectados pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 14 Anticorpos IgM e IgG2c específicos no soro de camundongos C57BL/6 e P2X7 ^{-/-} infectados pelo <i>P. yoelii</i>	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP – Adenosina difosfato
AMP – Adenosina monofosfato
APC – Célula Apresentadora de Antígeno
APC – Alofococianina
APC-Cy7 – Alofococianina-Cy7
ATP – Adenosina trifosfato
Bcl6 – Proteína 6 do linfoma de células B
Blimp-1 – Proteína de maturação de linfócitos B
BSA – Albumina sérica bovina
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CSP – Proteína circunsporozoíta
CXCR5 – Receptor de quimiocina C-X-C tipo 5
DAMP – Via molecular associada ao dano
d.p.i. – dias pós infecção
ELISA – do inglês, “*enzyme-linked immunosorbent assay*”
EP – Eritrócitos parasitados
GPI – glicosil-fosfatidil-inositol
Hb – Hemoglobina
i.p. – intraperitoneal
ICOS – Coestimulador de células T induzível
IFN – Interferon
Ig – Imunoglobulina
IL– Interleucina
ICB/USP – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
iRBC - Eritrócitos parasitados
LD – *Live/Dead*
LT – Linfócito T
mAb – Anticorpo monoclonal
MHC – Complexo principal de Histocompatibilidade
NK – do inglês, *Natural Killer cell*
OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

P. – *Plasmodium*

PBS – Salina tamponada com fosfato

PD-1 – Proteína de morte celular prgramada

PE – Ficoeritrina (Phycoerythrin)

PEcy-7 – Ficoeritrina-Cy7

PerCp – Complexo proteína clorofila peridinina

RPMI – Meio McCoy de cultura modificada

SBF – Soro bovino fetal

STAT – Transdutores de sinal e ativadores de transcrição

TCR – Receptor de célula T

Th – Célula T auxiliar

Tfh – Células T auxiliares do folículo

TGF- β – Fator β de transformação de crescimento

TLR – Receptor do tipo Toll

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF α – Fator de Necrose Tumoral α

WHO – do inglês, *World Health Organization*

α – alfa

β – beta

γ – gama

δ – delta

μ – micro

-/- – nocaute

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Aspectos Gerais da Malária	18
1.2 Ciclo de Vida do <i>Plasmodium</i>	20
1.3 Resposta Imune ao <i>Plasmodium</i> no Homem	22
1.4 Resposta Imune na infecção pelo <i>P. yoelii</i>	25
1.5 ATP, Receptor P2X7 e Células Tfh	26
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos Gerais	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Comitê de Ética	32
3.2 Camundongos e infecção	32
3.3 Parasitemia e Análise Clínica	32
3.4 Peso e Suspensão de Células do Baço	33
3.5 Análise Fenotípica das Células por Citometria de Fluxo	33
3.6 Purificação e Sincronização dos Reticulócitos Parasitados	34
3.7 Preparação do Extrato do Antígeno do <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	35
3.8 Titulação do Antígeno do <i>P. yoelii</i> 17XNL	35
3.9 Detecção por ELISA dos Anticorpos Específicos ao Parasito no Soro	35
3.10 Análise Estatística	36
4 RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
4.1 A ausência do receptor P2X7 contribui para a proteção contra o <i>P. yoelii</i> 17XNL	Erro! Indicador não definido.
4.2 A ausência do receptor P2X7 favorece a expansão das populações de células T CD4 ⁺ e CD19 ⁺ esplênicas durante a infecção pelo <i>P. yoelii</i> 17XNL	Erro! Indicador não definido.
4.3 O receptor P2X7 favorece a morte de células CD4 ⁺ e CD19 ⁺ durante a infecção pelo <i>P. yoelii</i> 17XNL	Erro! Indicador não definido.
4.4 A ausência do receptor P2X7 favorece a produção de células Tfh durante a infecção pelo <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	Erro! Indicador não definido.
4.5 A ausência do receptor P2X7 favorece a produção de células B do centro germinativo durante a infecção pelo <i>P. yoelii</i> 17XNL ...	Erro! Indicador não definido.

4.6 A ausência do receptor P2X7 favorece a produção de plasmócitos durante a infecção pelo *P. yoelii* 17XNL.....**Erro! Indicador não definido.**

4.7 A ausência do receptor P2X7 não altera os níveis séricos de anticorpos IgM e IgG2c específicos na fase aguda da infecção pelo *P. yoelii* 17XNL.**Erro! Indicador não definido.**

5 DISCUSSÃO**Erro! Indicador não definido.**

6 CONCLUSÃO.....37

7 REFERÊNCIA..379

APÊNDICE A.....48

APÊNDICE B.....49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Malária

A malária é uma doença infecciosa endêmica em regiões tropicais e subtropicais do globo e resulta em alta morbidade e mortalidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2016 houve aproximadamente 220 milhões de casos e 445 mil mortes decorrentes da malária no mundo, sendo que mais de 90% dos casos pertenciam à Região Africana. Este relatório foi baseado em 91 países e em áreas de transmissão contínua (WHO, 2017).

No Brasil, a maioria dos casos de malária está na região Amazônica, que contempla os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Embora nas demais regiões o número de casos se apresente com menor incidência, observa-se um nível maior de letalidade quando comparado à região Amazônica. Sendo assim, é necessário o controle da doença nestas regiões diante do fluxo migratório provenientes de regiões suscetíveis e da alta letalidade, que resulta do diagnóstico tardio e manejo clínico inadequado. (Ministério da Saúde, 2017). A Organização Pan-Americana da Saúde em seu último relatório constatou que houve um aumento de 48% no número de casos de malária entre os anos de 2016 e 2017 na Região Amazônica, chegando a aproximadamente 175 mil ocorrências (OPAS, 2018).

Os primeiros relatos descritos desta doença advêm de documentos chineses datados de quase três mil anos a.C.. Em 440 a.C., Hipócrates descreveu características sintomáticas como a febre malárica e a esplenomegalia em indivíduos residentes em locais pantanosos (Cox, 2010). Porém, somente há pouco mais de cem anos, houve a descoberta que seu transmissor era um protozoário. Em 1880, Alphonse Laveran relatou a presença de gametócitos masculinos no sangue de um paciente febril. Laveran mostrou que a malária era decorrente de um parasito que invadia as células vermelhas do sangue do hospedeiro e multiplicava em seu interior. O parasito foi inicialmente denominado *Oscillaria malariae* e posteriormente *Plasmodium*. Somente em 1898, o vetor e o ciclo de transmissão do parasito na fase sexuada foram descobertos por um conjunto de pesquisadores, dentre eles Ronald Ross, Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi e Ettore Marchiafava (Doolan *et al*, 2009; Tan, Ahana, 2009; Cox, 2010).

Sua transmissão ocorre pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. Em humanos, cinco espécies de protozoários podem causar a malária. A transmissão do parasito das espécies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* ocorre de um hospedeiro humano para outro por meio da picada do mosquito. Já no caso do *Plasmodium knowlesi* a infecção se faz de forma zoonótica (Cox-Singh *et al.*, 2008). Esta espécie do parasito costumava estar associada a casos de malária em macacos, porém atualmente tem sido descrita a infecção humana (Daneshvar *et al.*, 2009).

No Brasil, três espécies estão associadas à malária humana, *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, sendo que há maior prevalência de infecções com o *P. vivax* (Ministério da Saúde, Brasil, 2015 Boletim Epidemiológico). Há também a presença de formas mistas onde o indivíduo é infectado por mais de uma espécie do protozoário (WHO, 2017: World Malaria Report 2017).

Em vista da escassez de conhecimento acerca da biologia do *Plasmodium* e sua ação no hospedeiro humano, vem-se utilizando modelos murinos como fundamento para o estudo *in vivo* do desenvolvimento da doença. Estes modelos experimentais têm contribuído para caracterizar a resposta do hospedeiro associada ao combate do parasito nos estágios pré-eritrocíticos e eritrocíticos (Long *et al.*, 1994). O uso de animais favorece o estudo do papel da resposta imune celular e humoral em inúmeras infecções devido à similaridade das respostas em humanos. Há várias espécies de *Plasmodium* que infectam o camundongo e causam patologias com características similares às observadas na infecção humana. O estudo da malária vem utilizando quatro espécies murinas do *Plasmodium*: *Plasmodium berghei*, *Plasmodium vinckei*, *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium yoelii* (Carlton *et al.*, 2002). Estes parasitos foram isolados na África Central sub-Saariana entre os anos de 1940 e 1960. Os hospedeiros naturais destas espécies são os roedores do gênero *Grammomys* para o *P. berghei* e do gênero *Thamnomys* para as demais espécies (Stephens *et al.*, 2012). O *P. chabaudi* e o *P. vinckei* infectam eritrócitos maduros e se desenvolvem de maneira sincrônica causando o rompimento quase que simultâneo destas células, enquanto o *P. yoelii* e o *P. berghei* infectam reticulócitos e são assíncronicos (Bagnaresi *et al.*, 2009; Stephens *et al.*, 2012). O *P. yoelii* é capaz de infectar eritrócitos quando há limitação de reticulócitos (Cernetich-Ott *et al.*, 2012).

1.2 Ciclo de Vida do *Plasmodium*

O ciclo de vida do parasito apresenta duas etapas; a fase sexuada ocorre no vetor que é o mosquito fêmea do gênero *Anopheles* e a fase assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado. Por intermédio da picada do mosquito infectado, os esporozoítos são liberados na pele do hospedeiro (**Figura 1**). Em seguida, adentram na circulação sanguínea e a partir daí migram para o fígado (fase pré-eritrocítica), onde irão invadir os hepatócitos. Esta etapa é caracterizada como um estágio silencioso, onde não há sintomatologia clínica.

A adesão dos esporozoítos aos hepatócitos se faz por intermédio da proteína circunsporozoíta (CSP), que é a principal proteína de superfície dos esporozoítos (Ménard, 2000), e vem sendo utilizada como um dos alvos antigênicos para o desenvolvimento de vacinas. A invasão do hepatócito leva à formação de um compartimento, o vacúolo parasitóforo, que envolve o esporozoíto (Silvie *et al.*, 2008). O parasito se desenvolve dentro do hepatócito em um processo celular conhecido como esquizogonia. Trata-se de um processo endomitótico caracterizado pelo aumento na massa celular com replicação concomitante de DNA e organelas, mas sem citocinese (Dankwa *et al.*, 2016). O resultado da esquizogonia é a produção de merozoítos, que ao serem liberados na corrente sanguínea ficam envoltos em uma estrutura denominada merossomo (Sturm *et al.*, 2006) – estrutura pertencente ao próprio hepatócito. A estrutura do merossomo protege os merozoítos de serem reconhecidos por fagócitos residentes, como por exemplo, as células de Küpffer (Sturm *et al.*, 2006). Os merozoítos liberados passam a infectar os eritrócitos, dando início ao ciclo eritrocítico (Silvie *et al.*, 2008; Aly *et al.*, 2009).

Figura 1 Ciclo de vida do *Plasmodium*

Fonte: Adaptado de Teo *et al.*, 2016

Dentro dos eritrócitos, os merozoítos se desenvolvem em trofozoítos jovens e posteriormente em trofozoítos maduros que se multiplicam e maturam até a formação de esquizontes que irão se replicar entre 16-32 merozoítos filhos (Cowman, Crabb, 2006). Após a etapa de maturação, há o rompimento dos eritrócitos infectados com a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, os quais irão infectar novos eritrócitos, reiniciando o ciclo de infecção eritrocítica (Good, Doolan, 2010). Os ciclos de rompimento e desenvolvimento acontecem em intervalos de tempo definidos, que variam de acordo com a espécie do parasita. Por exemplo, o ciclo eritrocítico é repetido a cada 48 horas nas infecções com *P. vivax* e *P. falciparum* (Crutcher, Hoffman, 1996) e a cada 72 horas na infecção com *P. malariae*. A escassez de nutrientes e o estresse gerado pelo microambiente, como a alta parasitemia, levam os merozoítos a se diferenciarem em gametócitos

masculinos e femininos (Cowman *et al.*, 2016). A continuidade do ciclo sexual no mosquito ocorre mediante a ingestão do sangue contendo os gametócitos.

Os sinais e sintomas clínicos característicos da malária são febre elevada, calafrios, dor de cabeça, sudorese profunda, náuseas e dores musculares (Dostert *et al.*, 2009). Alguns indivíduos podem evoluir para as formas graves da doença como a síndrome respiratória, anemia intensa, acidose metabólica, malária cerebral e choque séptico (Bartoloni, Zammarchi, 2012; Cowman *et al.*, 2016).

1.3 Resposta Imune ao *Plasmodium* no Homem

O sistema imune é capaz de reconhecer produtos derivados do parasito como também reconhecer o próprio eritrócito parasitado através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Dois exemplos de produtos imunogênicos gerados pelo *P. falciparum* e reconhecidos pelos PRRs durante a infecção são as âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Schofield, Hackett, 1993) e a hemozoína (Coban *et al.*, 2005). Trabalhos *in vitro* utilizando monócitos humanos e macrófagos murinos mostraram que as âncoras de GPI induzem a ativação de receptores do tipo Toll (TLR) 1/TLR2 TLR2/TLR6 e TLR4 (Krishnegowda *et al.*, 2005), assim como a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IL-1 (Schofield, Hackett, 1993). A hemozoína é um cristal formado dentro do vacúolo alimentar do *Plasmodium* pelo processo de degradação da hemoglobina (Francis *et al.*, 1997). Experimentos *in vivo* e *in vitro* utilizando hemozoína sintética e purificada de cultura de *P. falciparum* demonstraram que as células dendríticas de camundongos são capazes de reconhecer este cristal através do TLR9 (Coban *et al.*, 2005).

A resposta imune celular e humoral é capaz de reconhecer antígenos do merozoíto. Estudos em humanos infectados pelo *P. falciparum* residentes em área endêmica demonstraram que a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ em resposta à antígenos do merozoíto está associada à proteção contra a infecção (Pombo *et al.*, 2002; Moormann *et al.*, 2013). Isto pode ser visto em um estudo envolvendo células mononucleares do sangue humano de crianças estimuladas *in vitro* durante 5 dias com eritrócitos infectados pelo *P. falciparum*, que resultou na produção de altos níveis de IFN- γ e TNF α , indicando uma polarização para o perfil de resposta Th1. Além disso, quando o sangue de crianças residentes de área endêmica infectadas pelo *P. falciparum* foram analisadas, durante os primeiros dias de infecção, também apresentaram maior produção de células Th1 secretoras de

IFN- γ , assim como a produção de anticorpos de vida curta (Obeng-Adjei *et al.*, 2015). No entanto, o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz contra o *P. falciparum* é relativamente lento, Isto é, indivíduos que habitam zonas endêmicas necessitam de repetidas exposições ao parasito para lhes conferir imunidade clínica não estéril, que este se caracteriza por baixos níveis de parasitemia na ausência de sintomas (Baird, 1995; Marsh e Kinyanjui, 2006; Tran *et al.*, 2013).

Os anticorpos apresentam grande importância na imunidade contra a malária. O papel protetor dos anticorpos foi demonstrado em estudos envolvendo a transferência passiva de IgG de adultos imunes para indivíduos acometidos pela malária grave que, após o tratamento, foram capazes de controlar a parasitemia e melhoraram os sinais de febre (Cohen *et al.*, 1961). Esses estudos sugeriram que a atuação destes anticorpos eram contra esquizontes maduros ou merozoítos extracelulares. A participação dos anticorpos que agem contra antígenos do merozoíto é importantes no controle da infecção pelo *P. falciparum* (Egan, *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 2002; Metzger *et al.*, 2003; Polley *et al.*, 2006). Este papel foi demonstrado através de estudos em humanos e *in vitro* utilizando o soro de pacientes. Os anticorpos contra os antígenos do merozoíto apresentam inúmeras ações como neutralização, opsonização e o bloqueio da citoaderência de hemácias parasitadas no endotélio vascular (Khusmith *et al.*, 1982; Khusmith *et al.*, 1983; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990; Celada *et al.*, 1982; Beeson *et al.*, 2004; Beeson *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2013, Tran *et al.*, 2012, Chiu *et al.*, 2015. Hansen *et al.*, 2017) (**Figura 2**).

As subclasses de anticorpos IgG1 e IgG3 são as mais predominantes na resposta contra antígenos do merozoíto do *P. falciparum* (Taylor *et al.*, 1995; Issa *et al.*, 2008). Estes anticorpos são eficazes na fixação do complemento (Boyle *et al.*, 2017) e apresentam alta afinidade pelos receptores Fc resultando na ativação de fagócitos (Bredius *et al.*, 1994; Stubbs *et al.*, 2011). Um estudo envolvendo crianças infectadas pelo *P. falciparum* demonstrou que os principais subtipos produzidos no soro foram os isótipos IgG1 e IgG3 contra os antígenos do merozoíto MSP1-19 (região C-terminal de 19-kDa da proteína de superfície do merozoíto 1), MSP2 (proteína de superfície do merozoíto 2) e AMA-1 (antígeno apical de membrana 1), entretanto os resultados demonstraram pouca reatividade dos isotipos IgG2 e IgG4 (Stanisic *et al.*, 2009).

Figura 2 Ação de anticorpos contra o merozoíto e o eritrócito infectado

Fonte: Adaptado de Teo *et al.*, 2016

As células T foliculares¹ (T_{fh}) são um subtipo de célula T CD4⁺ que auxiliam na produção de anticorpos de alta afinidade, atuando na formação do centro germinativo (Crotty, 2011). A fim de esclarecer o papel destas células, foi realizado um estudo em crianças infectadas pelo *P. falciparum* em que as células T_{fh} e Th1 do sangue periférico foram cultivadas com SEB (enterotoxina estafilocócica do tipo B), um superantígeno que mimetiza a interação entre as células T antígeno-específicas

¹As células T_{fh} foram identificadas dentro do centro germinativo, local onde ocorre sua interação com as células B, e a partir daí dão suporte para a resposta imune humoral, induzindo a produção de anticorpos de alta afinidade e de vida longa e células B de memória (Breitfeld *et al.*, 2000). Características determinantes desta população são a alta expressão do fator de transcrição proteína 6 do linfoma de células B (Bcl-6), da proteína de morte celular programada (PD1), do coestimulador de células T induzível (ICOS) e do receptor de quimiocina C-X-C tipo 5 (CXCR5), além da secreção de IL-21 e da baixa expressão do receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (Tangye *et al.*, 2013). O receptor de quimiocina CXCR5 atua na migração para dentro do folículo linfóide das células T_{fh}, que cooperam com as células B na formação do centro germinativo (Haynes *et al.*, 2007). A participação das citocinas IL-21 (ação autócrina) e IL-6 está associada à sinalização dos ativadores de transdução de sinais de transcrição (STAT) STAT3/STAT1 e do fator de transcrição Bcl6, que resultam na diferenciação das células T CD4⁺ para o perfil T_{fh} (Nurieva *et al.*, 2008).

e células B apresentadoras de antígeno. Após 12 dias de co-cultura, as células Tfh induziram maior produção de anticorpos IgG quando comparadas às células Th1 (Obeng-Adjei *et al.*, 2015). Entretanto, este estudo foi realizado apenas na fase aguda, não havendo publicação acerca das funções das células Tfh no sangue de humanos infectados pelo *P. falciparum* numa fase mais tardia da infecção. Por outro lado, durante a infecção pelo *P. vivax*, os indivíduos apresentaram aumento na produção de células Tfh circulantes e anticorpos IgM, IgG1, IgG3 e IgG4 já na fase aguda da doença (Figueiredo *et al.*, 2017). Este mesmo estudo ainda demonstrou que estes pacientes apresentaram aumento na produção de citocinas IFN- γ , IL-21, IL-6 e IL-10, o que conferiu o controle da infecção pelo *P. vivax*. A IL-21 auxilia na troca de classe de anticorpos e na produção de plasmócitos (Ettinger *et al.*, 2005; Morita *et al.*, 2011), a IL-6 é responsável pela diferenciação das células Tfh (Choi *et al.*, 2013), e a IL-10 induz as células B ativadas a secretar imunoglobulinas (Rousset *et al.*, 1992).

1.4 Resposta Imune na infecção pelo *P. yoelii*

Tendo como intuito ampliar o conhecimento adquirido através dos estudos em humanos, modelos murinos infectados pelo *Plasmodium* vêm sendo utilizados como estratégia de pesquisa. O *P. yoelii* mimetiza características imunogênicas e patogênicas da infecção pelo *P. falciparum* (Li *et al.*, 2011; Guthmiller *et al.*, 2017), tornando-se um bom objeto de estudos para resposta imune humoral frente à infecção. A infecção pelo *P. yoelii* apresenta características que diferem da infecção pelo *P. chabaudi*, como a preferência em infectar exclusivamente reticulócitos e apresentar um ciclo assíncrono de infecção (Bagnaresi *et al.*, 2009; Stephens *et al.*, 2012; Raja *et al.*, 2016).

Assim como na infecção pelo *P. falciparum*, o controle do parasito durante a fase aguda de infecção pelo *P. yoelii* é decorrente da ação de macrófagos (Couper *et al.*, 2008), de citocinas como IFN- γ e TNF α produzidas pelas células *natural killer* (NK), LT $\gamma\delta$ (Choudhury *et al.*, 2000) e células Th1. As células dendríticas atuam na fase aguda da infecção pelo *P. yoelii*, através da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- α , aumentando a ativação de células Th1 produtoras de IFN- γ (Ueffing *et al.*, 2017). Entretanto à medida que a infecção progride estas células passam a produzir IL-10 (Perry *et al.*, 2005), e o aumento na produção desta citocina na fase tardia da infecção pelo *P. yoelii*, favorece a supressão das células

Th1 e limita a produção de IFN- γ (Gutmuller *et al.*, 2017). Omer e colaboradores (2003) demonstraram que camundongos infectados com o *P. yoelii* apresentavam níveis imperceptíveis de produção TGF- β e IL-10 na fase aguda da infecção, entretanto numa fase mais tardia seus níveis são altos contribuindo no controle do parasito (Omer *et al.*, 2003). As células T CD4⁺ produtoras de IL-10 que auxiliam no controle do *P. yoelii* não são as células T reguladoras convencionais, e sim as células Tr1 (Couper *et al.*, 2008). Estudos mais recentes associam a IL-10 à imunidade humoral, uma vez que favorece as reações de células B do centro germinativo e a troca de isotipos de anticorpos (Gutmuller *et al.*, 2017).

A IL-21 mostrou-se importante no controle da infecção pelo *P. yoelii*, uma vez que camundongos nocautes para IL-21 ou o receptor da IL-21 não conseguiram resolver a fase crônica da infecção, resultando em alta parasitemia sustentada. Além disso, havendo uma reinfeção, estes camundongos não estão imunes ao parasito, visto que não há produção de células B de memória nem anticorpos IgG (Pérez-Mazliah *et al.*, 2015). Outra citocina importante no controle tardio da infecção pelo *P. yoelii* é a citocina IL-6, que favorece o desenvolvimento de respostas imunes humorais, a partir da segunda semana de infecção, uma vez que aumenta a produção de IgM e IgG específica ao parasito, regulando positivamente a expressão de ICOS pelas células Tfh e o desenvolvimento de células B do centro germinativo (Sebina *et al.*, 2017). As células Tfh vêm se mostrando importantes na fase tardia da infecção pelo *P. yoelii*, uma vez que favorecem a produção de células B do centro germinativo, células B de memória (James *et al.*, 2018) e plasmócitos produtores de anticorpos de alta afinidade (Butler *et al.*, 2011; Zander *et al.*, 2015; Sebina *et al.*, 2016).

1.5 ATP, Receptor P2X7 e Células Tfh

O sistema imune reconhece produtos endógenos liberados em condições de dano celular ou injúria tecidual (Seong, Matzinger, 2004). A adenosina trifosfato (ATP) é um nucleotídeo importante como fonte de energia, presente em altas concentrações no meio intracelular, entretanto ao ser liberado para o meio extracelular, torna-se um importante mediador inflamatório atuando como uma molécula associada ao dano celular (DAMP). (Di Virgilio *et al.*, 2003, 2009). Eritrócitos humanos infectados *in vitro* com o *P. falciparum* obtiveram níveis de ATP intracelular aumentado, e a hemólise resultante da infecção levou a abertura

de canais de membrana, aumentando a liberação e concentração do ATP no meio extracelular e a ativação de receptores purinérgicos (Akkaya *et al.*, 2008).

O ATP pode ser liberado para o meio extracelular através de exocitose, como por exemplo por canais denominado panexina-1 presente na membrana celular de linfócitos e eritrócitos (Locovei *et al.*, 2006), assim como em condições de trauma e morte celular. Normalmente, o ATP está presente em altos níveis no compartimento citoplasmático, em concentrações que variam entre 1 a 10 mM (Bours *et al.*, 2006). Em contrapartida, no espaço extracelular, em condições fisiológicas, o ATP apresenta concentrações bem mais baixas que variam entre 1-10 nM (Coade, Pearson, 1989).

Sua liberação pode ser decorrente de condições patogênicas e não patogênicas, podendo resultar numa ampla gama de processos biológicos como a atividade quimiotática, ativação de diferentes células do sistema imune e liberação de mediadores inflamatórios (Di Virgílio *et al.*, 2001). Em condições de grande injúria tecidual, o ATP atua como um mediador inflamatório, representando uma importante função na resposta imune, ao atuar nas células inflamatórias resultando em sua migração, proliferação, diferenciação celular e resposta efetora (Di Virgílio *et al.*, 2001, 2003, 2009). Atua como sinal “*find-me*” e atrai fagócitos para o foco inflamatório, ativa plaquetas e estimula a óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) (Chekeni *et al.*, 2010). Uma vez no espaço extracelular é degradado por ectonucleotidases e convertido em moléculas de ADP, AMP e adenosina (Robson *et al.*, 2006).

A descoberta por Burnstock, em 1972, da existência de uma via de sinalização purinérgica permitiu a ampliação das ações biológicas do ATP. Em 1978, formalizou-se o reconhecimento de 2 famílias de receptores de membrana celular capazes de se ligar ao ATP e seus subprodutos: os receptores P1 (reconhecem a adenosina) e os receptores P2 (reconhecem nucleotídeos) (Burnstock 1972, 1978). Os receptores P2 são classificados em duas famílias, a família do P2X (receptor de canal iônico) e a família do P2Y (receptor acoplado à proteína G) (Verkhatsky *et al.*, 2009). A família P2X inclui sete receptores (P2X1-P2X7) (Burnstock, 2007) que são responsáveis pela abertura de canais iônicos – seletivos para cátions monovalentes e divalentes como Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ – ativados em resposta ao reconhecimento do ATP extracelular (North, 2002). Os receptores P2X estão presentes em muitas células do sistema imune, tais como macrófagos, monócitos, neutrófilos, mastócitos, células

dendríticas, linfócitos T e células NK. A família de receptores P2X desempenha um papel central na inflamação, em especial o receptor P2X7, expresso em quase todas as células do sistema imune (Adinolfi *et al.*, 2018). Este receptor ao ser ativado na superfície celular, é capaz de ativar inflamassoma (Ferrari *et al.*, 2006), participa na secreção de citocinas e quimiocinas (Kurashima *et al.*, 2012), ativação e diferenciação de linfócitos T, ativação de fatores de transcrição (Amoroso *et al.*, 2012) e morte celular (Di Virgilio *et al.*, 1989).

O receptor P2X7 atua na inflamação e na resposta imune. A sinalização pelo receptor P2X7 induz a célula a produzir citocinas pró-inflamatórias como IL-6 em mastócitos (Kurashima *et al.*, 2012), TNF α em células dendríticas (Ferrari *et al.*, 2000); citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (Chessell *et al.*, 2005; Monção-Ribeiro *et al.*, 2014; Bianchi *et al.*, 2014). O estímulo pelo receptor ainda induz a expressão de quimiocinas, como CCL2, CXCL2, MCP-1, e a produção de mediadores lipídicos como prostaglandinas (Kurashima *et al.*, 2012). O receptor P2X7 é um dos mais potentes ativadores do inflamassoma NLRP3, que resulta na clivagem da caspase-1, e consequentemente, levando a liberação da IL-1 β (Ferrari *et al.*, 2006).

A ativação do receptor P2X7 nas células T decorrente do ATP extracelular leva a uma modificação no volume da célula, resultando primeiramente na exposição da fosfatidilserina na membrana celular, e em seguida na lise celular (Taylor *et al.*, 2008). Apenas um breve estímulo do receptor P2X7 já é o suficiente para resultar nesta alteração morfológica, e exposição de fosfatidilserina, entretanto se em até 20-30 minutos o estímulo for retirado, o efeito torna-se reversível (Mackenzie *et al.*, 2005). A ativação sustentada do receptor P2X7 leva a formação de um poro na membrana celular de até 900Da, o que permite a passagem de solutos pela membrana (Steinberg *et al.*, 1990; Proietti *et al.*, 2014).

O receptor P2X7 encontra-se distribuído em toda a superfície das células T, o que garante que as células T permaneçam responsivas ao ATP liberado pelos tecidos adjacentes (**Figura 3**) (Junger *et al.*, 2011). Na sinapse imunológica, as células T expressam também os receptores P2X1 e P2X4 e o P2X7 (Myrtek, Idzko, 2007), que a participação destes receptores amplificam o processo de ativação pelas células T. O ATP é liberado na sinapse imunológica pela célula T através dos canais de Panexina-1, e uma vez no meio extracelular, liga-se aos receptores P2X1, P2X4 e P2X7 e juntamente com a entrada do íon cálcio, amplifica a sinalização

conduzindo à transcrição da IL-2 (Woehrle *et al.*, 2010), e a diferenciação celular. Ao mesmo tempo, os receptores P2X7 localizados fora da sinapse imunológica ligando-se ao ATP proveniente de outros tecidos que também favorece a ampliação do sinal de ativação das células T (Junger *et al.*, 2011).

Figura 3 Sinalização purinérgica na ativação das célula T

Fonte: Adaptado de Junger *et al.*, 2011

As subpopulações de linfócitos T expressam diferentes quantidades de receptores P2X7 na superfície, e a presença do receptor em altas quantidades na célula resulta na maior sensibilidade desta à morte (Aswad *et al.*, 2006). As células Tfh, expressam exclusivamente o receptor P2X7, e dentre as células que expressam este receptor em sua superfície, as células Tfh são as que mais expressam. Esta alta expressão do receptor conduz à morte das células Tfh quando expostas ao ATP em altas concentrações (Proietti *et al.*, 2014).

A desenvolvimento de uma vacina eficaz para a malária que envolva a produção de anticorpos de vida longa é fator determinante no controle desta doença. O entendimento dos mecanismos que levam a produção de células Tfh resultante da

sinalização do P2X7 na malária ainda é pouco conhecido. Esta é uma estratégia que pode ser mais explorada, uma vez que as células Tfh atuam na produção de plasmócitos de vida longa, anticorpos específicos e células B de memória, e a infecção pelo *Plasmodium* pode estar levando à morte destas células pela alta concentração de ATP no meio extracelular em razão da lise de eritrócitos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- O presente trabalho apresenta como objetivo central avaliar a participação do receptor P2X7 na geração de células Tfh e B do centro germinativo durante a infecção pelo *P. yoelii* 17XNL.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a participação do receptor P2X7 no controle da infecção pelo *P. yoelii* 17XNL;
- Avaliar a participação do receptor P2X7 na expansão das populações de células T CD4⁺ e B durante a infecção pelo *P. yoelii* 17XNL;
- Avaliar a participação do receptor P2X7 na morte das células T CD4⁺ e B durante a infecção pelo *P. yoelii* 17XNL;
- Avaliar a participação do receptor P2X7 na expressão do fator de transcrição Bcl6 e ICOS em células T CD4⁺ na infecção pelo *P. yoelii* 17XNL;
- Avaliar a participação do receptor P2X7 na diferenciação das células Tfh nos diferentes dias de infecção pelo *P. yoelii* 17XNL;
- Avaliar a participação do receptor P2X7 no desenvolvimento da população de células B do centro germinativo durante a infecção pelo *P. yoelii* 17XNL;
- Avaliar a participação do receptor P2X7 no desenvolvimento de plasmócitos durante a infecção pelo *P. yoelii* 17XNL;
- Avaliar a participação do receptor P2X7 na produção de anticorpos específicos contra o plasmódio durante a infecção pelo *P. yoelii* 17XNL.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética

Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com os regulamentos nacionais de diretrizes éticas para a experimentação e bem estar dos camundongos determinados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de saúde animal da USP, com o número de licenciamento: 45/2017.

3.2 Camundongos e infecção

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados fêmeas de duas linhagens de camundongo C57BL/6 – a linhagem selvagem e linhagem de camundongos deficientes no receptor P2X7 (P2X7^{-/-}), – ambos os camundongos com idades entre 8-10 semanas, fornecidos pelo biotério do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo (originalmente da *The Jackson Laboratory*) e mantidos no Biotério de Camundongos Isogênicos Departamento de Imunologia do ICB/USP.

Os camundongos foram infectados pela via intraperitoneal com 1×10^6 reticulócitos infectados pelo *P. yoelii* 17XNL obtidos do sangue de camundongos previamente infectados. O parasito do *P. yoelii* 17XNL nos foi fornecido pelo Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa (UNICAMP). O sangue foi retirado da cauda dos camundongos diluído em Salina tamponada com fosfato (PBS) estéril.

3.3 Parasitemia e Análise Clínica

As parasitemias foram monitoradas por meio de exame microscópio de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (Merck, EUA). Uma gota de sangue da cauda do camundongo infectado foi colocada sobre a extremidade inferior de uma lâmina limpa. Utilizando-se uma espátula na angulação de 45°, esta veio ao encontro da borda inferior da lâmina até encostar no sangue, deixando que este conteúdo se difundisse uniformemente por toda a largura da espátula. Em seguida, a espátula, ainda exercendo uma leve pressão sobre a lâmina e mantendo a angulação de 45°, espalhou o conteúdo de sangue até a borda superior. As lâminas contendo o esfregaço do sangue dos camundongos foram feitas diariamente, a partir do 5º dia pós infecção (d.p.i) até a realização do experimento, ou até o dia em que a

não fosse observado parasito na microscopia. Após a obtenção do esfregaço sanguíneo, as lâminas foram fixadas com metanol e em seguida coradas com Giemsa diluído em água destilada (diluição 1/10). As lâminas foram lidas em microscópio óptico na objetiva 100X utilizando o óleo de imersão (Merck, EUA).

A concentração de hemoglobina foi avaliada com um kit de hemoglobina (Doles Inc., Brasil), sendo determinada a cada dois dias a partir do 3º dia de infecção.

3.4 Peso e Suspensão de Células do Baço

Para obtenção das células do baço, os camundongos foram eutanasiados utilizando halotano (Cristália, Brasil) e o baço foi retirado, sendo então pesado em balança (Denver Instrument, EUA). O baço foi macerado, e as células esplênicas foram lavadas e mantidas em meio RPMI 1640 (Life Technologies, EUA) gelado, suplementado com penicilina/estreptomicina (100 U/ml) (Life Technologies, EUA), L-glutamina (2 mM) (Life Technologies, EUA), piruvato de sódio (1 mM) (Sigma-Aldrich, USA), 3% de soro bovino fetal (SBF) (Life Technologies, EUA) inativado pelo calor. Para hemólise dos eritrócitos foi utilizado o tampão de lise contendo 1 partes de solução de Tris (0,5125g TRIS Base em 25ml de água Mili Q) (Sigma-Aldrich) associado a 9 parte de cloreto de amônio (2,14g NH_4Cl em 25ml de água Mili Q) (Sigma-Aldrich). Em seguida estas células foram novamente ressuspensas em meio RPMI 1640 para contagem em câmara de Neubauer (HBG, Alemanha)

3.5 Análise Fenotípica das Células por Citometria de Fluxo

As células (1×10^6) foram marcadas com uma mistura de anticorpos monoclonais (mAbs) contendo os anticorpos anti-CD4 (RM4-5 ou H129.19, BD Pharmingen, USA) conjugados ao Pacific Blue (PB) e AmCyan, anti-PD-1 (J43, CD279, eBioscience, USA) conjugados à alofococianina (APC), anti-CXCR5 (CD 185) (SPR CL5, eBioscience, USA) conjugados ao complexo proteína clorofila peridina (PerCp) ou à ficoeritrina-Cy7 (PE-Cy-7), anti-ICOS (7E,17G9) conjugados à ficoeritrina (PE-Cy-7), anti-CD95 (JO2; BD Horizon, USA) conjugados ao *brilliant violet* 510 (BV510), anti-CD19 (ID3, BD Pharmingen, USA) conjugados à ficoeritrina-Cy7 (PE-Cy-7), anti-GL-7 (GL7, BD Horizon, USA) conjugados ao *brilliant violet* 421 (BV421). Para marcação intracelular, mAbs anti-Bcl-6 conjugados à alofococianina-Cy7 (APC-Cy7) (K112-91, BD Pharmingen, USA) foram utilizados de acordo com as

instruções do fabricante. A viabilidade celular foi determinada com o reagente *Live and Dead* (LD) (*red fluorescence reactive dye ou aqua fluorescence reactive dye*) (LifeTechnologies) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo BD FACS Canto™ II (Firmware v.1.49) e software BD FACS Diva v.8.0.1. Os dados foram analisados utilizando-se o programa FlowJo v.9.9.8 (Tree Star Inc., USA)

3.6 Purificação e Sincronização dos Reticulócitos Parasitados

Esta técnica foi realizada no Laboratório de Imunoparasitologia Experimental do Departamento de Parasitologia do ICB/USP sob a responsabilidade do Dr. Cláudio Romero Faria Marinho. Esta técnica teve como intuito a obtenção de formas maduras do parasita sincronizando os reticulócitos do *P. yoelii* (Janse *et al.*, 2006). Os reticulócitos de camundongos fêmeas C57BL/6 infectados com o *P. yoelii* foram obtidos do sangue exibindo entre 10-20% de parasitemia. Os camundongos foram eutanasiados e o sangue foi retirado por punção cardíaca da região atrial, e imediatamente inserido na garrafa para cultura de 75 cm sem filtro (Corning Inc., USA) já contendo meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, USA) suplementado com 25% de SBF (Life Technologies, USA). Em seguida, foi aplicado utilizando uma mangueira acoplada ao fluxo laminar, uma mistura gasosa contendo 5% de CO₂, 85% de N₂ e 10% de O₂, durante 30 segundos, cuidando para não romper as células. Em seguida, as garrafas foram armazenadas em estufa a 37° C por 14 horas. A seguir, as células foram passadas em uma coluna de separação magnética (Milenyl Biotec, EUA), que realizou uma seleção positiva, onde teve como intuito a retenção de 10⁷ células vermelhas, - uma vez que a coluna apresenta o ferro em sua estrutura, e o ferro facilita a ligação das células vermelhas infectadas pelo parasito, e este produzir hemozoína que tem alta atração pela coluna magnética -. Esta técnica teve como intuito o enriquecimento dos reticulócitos infectados. Em seguida os reticulócitos enriquecidos foram removidos da coluna de magneto. Utilizando-se apenas o êmbolo de uma seringa contendo tampão MACS, aplicou-se este conteúdo sobre a amostra, e retirou-se todo o conteúdo contido na coluna, o qual foi ressuspensionado em tubo falcon. Em seguida o conteúdo foi centrifugado e o sobrenadante descartado. O pellet resultante continha as formas mais maduras do parasito.

3.7 Preparação do Extrato do Parasito do *P. yoelii* 17XNL

Esta etapa teve como referência o protocolo para preparação do extratos de proteína do parasito e análise de western blot (Heiber, Spielmann, 2014). Após a obtenção do pellet contendo as formas maduras do parasito, conforme descrito acima, a primeira etapa para a obtenção do extrato do antígeno foi a retirada da membrana dos reticulócitos parasitados. Adicionou-se ao pellet 1 ml de PBS e a 15 µl de saponina 10%. Lavou-se 5 vezes o conteúdo com 1 ml de PBS, centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante. Ao pellet foi adicionado 1ml de PBS e 5 µl do inibidor de protease (Sigma-Aldrich). Por último foi adicionado 135 µl de tampão de lise, que continha 4 ml de SDS 10%, 5ml de Triton X114 10%, 5 ml de PBS, e 0,5 ml de água destilada em mili Q. Homogeinizou-se o conteúdo que foi sonificado (Sonic Dismembrator - Fischer Scientific, EUA) por 1 minuto. Em seguida dosou-se a concentração da proteína do antígeno. O branco continha 90% (180 µl) de PBS e 10% (20 µl) de tampão de lise do parasito. A placa foi lida no espectrofotômetro (Epoch/Bioteck) utilizando comprimento de onda de 280nm.

3.8 Titulação do Parasito do *P. yoelii* 17XNL

Após a obtenção do extrato do parasito, foi realizada a titulação do anticorpo IgM, utilizando a técnica de ELISA descrita abaixo. A partir da dosagem da concentração de proteína do antígeno adquirida na preparação do extrato (4,5 mg/l) foi realizada uma diluição seriada da concentração deste antígeno tendo como concentração inicial 8 µg/ mL com o intuito de identificar uma melhor concentração a ser aplicada que consistiu em 4 µg/ mL.

3.9 Detecção por ELISA dos Anticorpos Específicos ao Parasito no Soro

Anticorpos séricos anti-*P. yoelii* 17XNL foram detectados por ELISA, a partir do soro obtido dos camundongos controles (dia 0 p.i.) e infectados. O soro foi retirado por coleta do sangue da cauda dos camundongos eutanasiados. O sangue foi armazenado em tubo eppendorf de 1,5mL contendo 2 µL de heparina e centrifugado por 10 minutos em velocidade 2.500 rpm. O soro foi então retirado com pipeta e congelado a -80°C.

Inicialmente as placas de ELISA (Costar 3590 High Binding - Corning Inc) foram sensibilizadas com 50 µL de extrato total de *P. yoelii* diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e incubadas durante a noite, a 4°C. Após

lavagens sucessivas com PBS contendo 0,05% de tween 20 (Sigma-Aldrich), as placas foram saturadas por 3 horas com 200 µl de PBS-tween contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich). Após as lavagens, foi adicionado em cada poço, 100 µl de diluições decrescentes de cada amostra feitas com PBS-tween contendo 1% de BSA e incubados durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas e a presença de anticorpos específicos contra o parasito, revelada adicionando-se anticorpos de cabra anti-IgM, anti-IgG2c de camundongos conjugados à peroxidase (Southern Biotechnology Associates), diluídos 1:2500 (IgM) e 1:2000 (IgG2c) em PBS-tween com 1% de BSA. Por fim, as placas foram novamente lavadas e 100 µL de Tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado em cada poço. A reação foi bloqueada com 100 µl ácido fosfórico (H₃PO₄) 1 M e a leitura, realizada através de um espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda 450 nm. A concentração do anticorpo é definido a partir da curva do anticorpo que está numa concentração de 1000ng/ml

3.10 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Prisma 6 (GraphPad Prisma 5), com o Teste t de Student, e as diferenças entre os grupos controle e infectado foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) ou $p < 0,0001$ (****).

6 CONCLUSÃO

Este estudo mostra que o receptor P2X7 prejudica a expansão das populações de células Tfh e B do centro germinativo do baço, assim como o controle da malária causada pelo *P. yoelli* 17XNL. Os números de células T CD4⁺, células B e plasmócitos também estão reduzidos quando a infecção ocorre na presença do receptor P2X7. Essa diminuição está associada ao aumento das frequências de células T CD4⁺ e B mortas. Entretanto, a ausência do receptor P2X7 não alterou os níveis séricos de anticorpos IgM e IgG2c específicos ao parasito. Este estudo contribuiu para a compreensão do papel do receptor P2X7 na geração das células Tfh na malária.

7. REFERÊNCIAS

- Adinolfi E, Giuliani AL, De Marchi E, Pegoraro A, Orioli E, Di Virgilio F. The P2X7 receptor : A main player in inflammation. *Biochem Pharmacol*. 2018; 151:234–44.
- Akkaya C, Shumilina E, Bobballa D, Brand V B, Mahmud H, Lang F, *et al.*. The *Plasmodium falciparum*-induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway. *Pflugers Archiv*. 2009; 457(5):1035-47.
- Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 2007; 27(2):190-202.
- Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol*. 2009; 63:195-221.
- Amaral EP, Ribeiro SC, Lanes VR, Almeida FM, de Andrade MR, Bomfim CC, *et al.*. Pulmonary infection with hypervirulent *Mycobacteria* reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS Pathogens*. 2014; 10(7): e1004188.
- Amoroso F, Falzoni S, Adinolfi E, Ferrari D, Di Virgilio F. The P2X7 receptor is a key modulator of aerobic glycolysis. *Cell Death Dis*. 2012; 3:e370.
- Aswad F, Dennert G. 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, Alves E, Borges da Silva H, Epiphany S, Mota MM, Garcia CR. Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Intern J Gen Med*. 2009; 2:47–55.
- Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012; 4(1):e2012026.
- Beeson JG, Chan JA, Fowkes FJI. PfEMP1 as a target of human immunity and a vaccine candidate against malaria. *Expert Rev. Vaccines*. 2013; 12(2):105–8.
- Beeson JG, Mann EJ, Elliott SR, Lema VM, Tadesse E, Molyneux ME, *et al.* Antibodies to variant surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and adhesion inhibitory antibodies are associated with placental malaria and have overlapping and distinct targets. *J. Infect. Dis*. 2004; 189(3): 540–551.
- Bianchi G, Vuerich M, Pellegatti P, Marimpietri D, Emionite L, Marigo I, *et al.* ATP/P2X7 axis modulates myeloid-derived suppressor cell functions in neuroblastoma microenvironment. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e1135.
- Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med*. 1990; 172(6):1633-41.
- Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*. 2006;112(2):358-404.

Boyle MJ, Reiling L, Osier FH, Fowkes FJ. Recent insights into humoral immunity targeting *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. *Int J Parasitol.* 2017; 47(2-3):99-104.

Braga EM , Barros RM , Reis TA , Fontes CJ , Morais CG , Martins MS , Krettli AU . Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 2002; 66(5):461-6.

Bredius RG, Fijen CA, De Haas M, Kuijper EJ, Weening RS, Van de Winkel JG, *et al.* Role of neutrophil Fc gamma RIla (CD32) and Fc gamma RIllb (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1- and IgG3-opsonized bacteria and erythrocytes. *Immunology.* 1994;83(4):624-30.

Breitfeld D, Ohl G, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp H, *et al.* Follicular B Helper T Cells Express Cxc Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production. *J Exp Med.* 2000; 192(11):1545-52.

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

Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*, edited by Straub RW and Bolis L. New York: Raven. 1978:107-118.

Burnstock G. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007; 87(2):659-797.

Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, *et al.* Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nat Immunol.* 2011; 13(2):188–95.

Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, Kooij TW, Perteau M, Silva JC *et al.* Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature.* 2002; 419:512–19.

Celada A, Cruchaud A, Perrin LH. Opsonic activity of human immune serum on in vitro phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells by monocytes. *Clin Exp Immunol.* 1982; 47(3):635-44.

Cernetich-Ott A, Daly TM, Vaidya AB, Bergman LW, Burns JM. Remarkable stability in patterns of blood-stage gene expression during episodes of non-lethal *Plasmodium yoelii* malaria. *Malar J.* 2012; 11(1):265-81.

Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen M, Lazarowski ER, *et al.* Pannexin 1 channel mediate ‘find me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature.* 2010; 467(7317):863–7.

Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, *et al.* Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain.* 2005; 114(3), 386-96.

Chiu CY, Hodder AN, Lin CS, Hill DL, Li Wai Suen CS, Schofield L, *et al.* Antibodies to the *Plasmodium falciparum* proteins MSPDBL1 and MSPDBL2 opsonize

merozoites, inhibit parasite growth, and predict protection from clinical malaria. *J. Infect. Dis.* 2015; 212, 406–415.

Choi YS, Eto D, Yang JA, Lao C, Crotty S. Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *J Immunol.* 2013; 190(7):3049-53.

Choudhury HR, Sheikh NA, Bancroft GJ, Katz DR, de Souza JB. Early nonspecific immune responses and immunity to blood-stage non lethal *Plasmodium yoelii* malaria. *Infect Immun.* 2000; 68(11):6127–32.

Coade SB, Pearson JD.. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res.* 1989; 65(3):531-7.

Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, *et al.* Toll- like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med.* 2005; 201(1):19-25.

Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* 1961; 192:733-7.

Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, *et al.* IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog.* 2008; 4(2): e1000004.

Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 2006; 124(4): 755–66.

Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell.* 2016; 167(3):610–24.

Cox, FEG. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors.* 2010; 3(1):3-5

Cox-Singh J., Davis TME, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(2):165–71.

Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:621–63.

Crutcher JM, Hoffman SL. Malaria. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.

Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, *et al.* Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clin Infect Dis.* 2009; 49(6):852-60.

Dankwa DA, Davis MJ, Kappe SHI, Vaughan M. A *Plasmodium yoelii* Mei2-Like RNA Binding Protein Is Essential for Completion of Liver Stage Schizogony. *Infect Immun.* 2016; 84(5):1336–45.

- Di Virgilio F, Bronte V, Collavo D, Zanovello P. Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. *J. Immunol.* 1989; 143(6):1955-60.
- Di Virgilio F, Borea PA, Illes P. P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol.* 2001; 22(1): 5-7.
- Di Virgilio F. Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *Br J Pharmacol.* 2003; 140(3):441-3.
- Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9(4):507-13.
- Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity.* 2017; 47(1): 15-31
- Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(1):13-36
- Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A *et al.* Malarial Hemozoin Is a Nalp3 Inflammasome Activating Danger Signal. *Plos One.* 2009; 4(8):e6510.
- Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, Holder AA, Riley EM. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J. Infect Dis.* 1996; 173(3):765-9.
- Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, Leonard WJ, *et al.* IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. *J Immunol.* 2005; 175(12):7867-79.
- Ferrari D, La Sala A, Chiozzi P, Morelli A, Falzoni S, Girolomoni G, *et al.* The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J.* 2000; 14(15):2466-76.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, *et al.* The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 2006; 176(7): 3877-83.
- Figueiredo MM, Costa PAC, Diniz SQ, Henriques PM, Kano FS, Tada MS, *et al.* T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during *Plasmodium vivax* infection. *PLoS Pathog.* 2017; 13(7):e1006484.
- Francis S E, Sullivan DJ, Goldberg D E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev. Microbiol.* 1997; 51:97-123.
- Good-Jacobson KL, Shlomchik MJ.. Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J Immunol.* 2010; 185(6):3117-25.
- Good MF, Doolan DL. Malaria vaccine design: immunological considerations. *Immunity.* 2010; 33(4):555–66.

Guthmiller JJ, Graham AC, Zander RA, Pope RL, Butler NS. Cutting Edge: IL-10 Is Essential for the Generation of Germinal Center B Cell Responses and Anti-*Plasmodium* Humoral Immunity. *J Immunol*. 2017; 198(2):617-622.

Hahn WO, Butler NS, Lindner SE, Akilesh HM, Sather DN, Kappe SH, Hamerman JA, *et al.*. cGAS-mediated control of blood-stage malaria promotes *Plasmodium*-specific germinal center responses. *JCI Insight*. 2018; 3(2): 94142.

Hansen DS, Obeng-Adjei N, Ly A, Ioannidis LJ, Crompton PD. Emerging concepts in T follicular helper cell responses to malaria. *Int J Parasitol*. 2017; 47(2-3):105-110.

Haynes NM, Allen CDC, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1 high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol*. 2007; 179(8): 5099-108.

Heiber, A., Spielmann T.. (2014) Preparation of parasite extracts and western blot Analysis. *Bio-protocol*. 4: 1-10. [acesso em abr 2017]. Disponível em: <https://bio-protocol.org/pdf/bio-protocol1136.pdf>.

Hill DL, Eriksson EM, Li Wai Suen CS, Chiu CY, Ryg-Cornejo V, Robinson LJ, *et al.* Opsonising antibodies to *P. falciparum* merozoites associated with immunity to clinical malaria. *PLoS One*, 2013; 8(9):e74627.

James KR, Soon MSF, Sebina I, Fernandez-Ruiz D, Davey G, Liligeto UN, *et al.*. IFN regulatory factor 3 balances Th1 and T follicular helper immunity during nonlethal blood-stage *Plasmodium* infection. *J Immunol*. 2018; 200(4):1443-56.

Janse, C. J., Ramesar, J., Waters, A. P.. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc*. 2006; 1(1):346-345.

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

Kerfoot SM, Yaari G, Patel FR, Johnson KL, Gonzalez DG, Kleinstein SH, *et al.*. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity*. 2011; 34(6):947-60.

Khusmith S, Druilhe P, Gentilini M. Enhanced *Plasmodium falciparum* merozoite phagocytosis by monocytes from immune individuals. *Infect Immun*. 1982; 35(3):874-9.

Khusmith S, Druilhe P. Antibody-dependent ingestion of *P. falciparum* merozoites by human blood monocytes. *Parasite Immunol*. 1983; 5(4):357-68.

Krishnegowda G, Hajjar AM, Shu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, Woods AS, Gowda DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*. 2005; 280(9):8606-16.

Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, *et al.* Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat. Commun.* 2012; 3:1034.

Li J, Pattaradilokrat S, Zhu F, Jiang H, Liu S, Hong L, *et al.* Linkage maps from multiple genetic crosses and loci linked to growth – related virulent phenotype in *Plasmodium yoelii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(31):374-82.

Liu X, Yan X, Zhong B, Nurieva RI, Wang A, Wang X, *et al.* Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *J Exp Med.* 2012; 209(10):1841-52.

Locovei S, Bao L, Dahi G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(20):7655-9

Long CA, Daly TM, Kima P, Srivastava, I. Immunity to erythrocytic stages of malarial parasites. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50(4suppl):27-32.

Mackenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem.* 2005; 280(40):33968-76.

Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 2006; 28(1-2):51-60.

Meding SJ, Cheng SC, Simon-Haarhaus B, Langhorne J. Role of gamma interferon during infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Infection and immunity.* 1990; 58(11):3671-8.

Ménard R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes Infect.* 2000; 2(6):633–42.

Metzger WG, Okenu DM, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA, McBride JS, Greenwood BM, Conway DJ. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol.* 2003; 25(6):307-12.

Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. Brasília (DF); 2015.

Ministério da Saúde (BR). Malária [acesso em jul 2017]. Disponível em: <<http://portais.saude.gov.br/saude-de-a-z/malária>>.

Monção-Ribeiro LC, Faffe DS, Santana PT, Vieira FS, da Graça CL, Marques-da-Silva C, *et al.* P2X7 receptor modulates inflammatory and functional pulmonary changes induced by silica. *PLoS ONE.* 2014; 9(10):e110185.

Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery G, Zurawski L, *et al.* Human Blood CXCR5⁺CD4⁺ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity.* 2011; 34(1):108-21.

Myrtek D, Idzko M. Chemotactic activity of extracellular nucleotides on human immune cells. *Purinergic Signal.* 2007;3(1-2): 5-11.

Moormann AM, Sumba PO, Chelimo K, Fang H, Tisch DJ, Dent AE, John CC, Long CA, Vulule J, Kazura JW. Humoral and cellular immunity to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and protection from infection with blood-stage parasites. *J. infection Dis.* 2013; 208(1):149-58

Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential target. *Adv Parasitol.* 2013; 81:77-131.

North, R. A. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev.* 2002; 82(4), 1013–1067.

Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, *et al.*. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity.* 2008; 29(1):138–49.

Nurieva RI, Podd A, Chen Y, Alekseev AM, Yu M, Qi X, *et al.*. STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function. *J Biol Chem.* 2012; 287(14):11234-9.

Obeng-Adjei N, Traore B, Crompton PD, Tran TM, Yazew TB, Skinner J, *et al.* Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children Article Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria. *Cell Rep.* 2015; 13(2):425–39.

Omer FM, de Souza JB, Riley EM. Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol.* 2003; 171(10):5430-6.

Organização Pan-Americana de Saúde [internet]. Brasília: Casos de malária aumentam na região das Américas; 2018 [acesso em mai 2018]. Disponível em:<https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812>.

Pérez-Mazliah D, Ng DH, Freitas do Rosário AP, McLaughlin S, Mastelic Gavillet B, Sodenkamp J, *et al.*. Disruption of IL-21 signaling affects T cell-B cell interactions and abrogates protective humoral immunity to malaria. *PLoS Pathogens.* 2015; 11(3): e1004715.

Pérez-Mazliah D, Nguyen MP, Hosking C, McLaughlin S, Lewis MD, Tumwine I, *et al.*. Follicular helper T cells are essential for elimination of *Plasmodium* infection. *EBioMedicine.* 2017; 24:216-230.

Perry JA, Olver CS, Burnett RC, Avery AC. Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. *J Immunol.* 2005; 174 (10):5921-5.

Polley SD , Conway DJ , Cavanagh DR , McBride JS , Lowe BS , Williams TN , Mwangi TW , Marsh K . High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya. *Vaccine.* 2006; 24(19):4233-46.

Pombo DJ, Lawrance G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, Anderson K, Mahakunkijcharoen Y, Martin LB, Wilson D, Elliott S, Elliott S, Eisen DP, Weinberg JB, Saul A, Good MF. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet*. 2002; 360(9333):610-7.

Proietti M, Cornacchione V, Rezzonico Jost T, Romagnani A, Faliti C E, Perruzza L, *et al.*. ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper number in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism. *Immunity*. 2014; 41(5):789-801.

Raja AI, Cai Y, Reiman JM, Groves P, Chakravarty S, Mcphun V, *et al.* Chemically attenuated blood-stage *Plasmodium yoelii* parasites induce long-lived and strain-transcending protection. *Infect Immun*. 2016; 84(8):2274–88.

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2006; 2(2):409-30.

Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, *et al.* Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89(5):1890-3.

Salles ÉM, Menezes MN, Siqueira R, Borges da Silva H, Amaral EP, Castillo-Méndez SI, *et al.* P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. *PLoS Pathogens*. 2017; 13(8): e1006595.

Sayles PC, Wassom DL. *Plasmodium yoelii*: Antibody Response in Resistant Mouse Strains and Susceptible. *Experimental Parasitology*. 1991; 73, 241–248.

Sebina I, Fogg LG, James KR, Soon MSF, Akter J, Bryce S, *et al.* IL-6 promotes CD4⁺ T-cell and B-cell activation during *Plasmodium* infection. *Parasite Immunol*. 2017; 39(10).

Sebina I, James KR, Soon MSF, Fogg LG, Best SE, Labastida Rivera F. *et al.* IFNAR1-signalling obstructs ICOS-mediated humoral immunity during non-lethal blood-stage *Plasmodium* infection. *PLoS Pathogens*. 2016; 12(11): e1005999.

Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(6):469-78.

Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J. Exp Med*. 1993; 177(1):145-53

Silvie O, Mota MM, Matuschewski K, Prude M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr Opin Microbiol*. 2008; 11(4):352–9.

Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, *et al.* Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun*. 2009; 77(3):1165-74.

Steinberg TH, Buisman HP, Greenberg S, Di Virgillio F, Silverstein SC. Effects of extracellular ATP on mononuclear phagocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 603:120-9.

Stephens R, Culleton RL, Lamb TJ. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends Parasitol.* 2012; 28(2):73-82.

Stubbs J, Olugbile S, Saidou B, Simporé J, Corradin G, Lanzavecchia A. Strain-transcending Fc-dependent killing of *Plasmodium falciparum* by merozoite surface protein 2 allele-specific human antibodies. *Infect Immun.* 2011; 79(3):1143-52.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 2006; 313:1287-90.

Tan SY, Ahana A. Charles Laveran (1845-1922): Nobel laureate pioneer of malaria. *Singapore Med J.* 2009; 50(7):657–8.

Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(6):412-26.

Taylor SR, Gonzalez-Begne M, Dewhurst S, Chimini G, Higgins CF, Melvin JE, Elliott JI. Sequential shrinkage and swelling underlie P2X7-stimulated lymphocyte phosphatidylserine exposure and death. *J Immunol.* 2008; 180(1):300-8.

Taylor RR, Allen SJ, Greenwood BM, Riley EM. IgG3 antibodies to Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. *Am. J. Tro. Med. Hyg.* 1998; 58(4):406-13.

Taylor RR, Smith DB, Robinson VJ, McBride JS, Riley EM. Human antibody response to Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass. *Infect Immun.* 1995; 63(11):4382-8.

Teo A, Feng G, Brown GV, Beeson JG, Rogerson SJ. Functional antibodies and protection against blood-stage Malaria. *Trends Parasitol.* 2016; 32(11):887-98.

Tran TM, Li S, Doumbo S, Doumtabe D, Huang CY, Dia S, Bathily A, Sangala J, Kone Y, Traore A, Niangaly M, Dara C, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo OK, Traore B, Crompton PD. An intensive longitudinal cohort study of Malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to *Plasmodium falciparum* infection. *Clin Infect Dis.* 2013; 57(1):40–47.

Tran TM, Samal B, Kirkness E, Crompton PD. Systems immunology of human malaria. *Trends Parasitol.* 2012; 28(6):248-57.

Ueffing K, Abberger H, Westendorf AM, Matuschewski K, Buer J, Hansen W. Conventional CD11c high dendritic cells are important for T cell priming during the initial phase of *Plasmodium yoelii* infection, but are dispensable at later time points. *Front Immunol.* 2017;8:1333

World Health Organization [internet]. Geneva: World Malaria Report 2017; 2017 [acesso em: jan. 2018]. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf>>.

Woehrle T, Yip L, Elkhail A, Y Sumi, Chen Y, Yao Y *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.

Xu H, Liu J, Cui X, Zuo Y, Zhang Z, Li Y, *et al.*. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in lupus patients is associated with autoantibody production in a CD40L-dependent manner. *Cell Immunol*. 2015; 295(1):46-51.

Zander RA, Guthmiller JJ, Graham AC, Pope RL, Burke BE, Carr DJ, *et al.*. Type I Interferons Induce T Regulatory 1 Responses and Restrict Humoral Immunity during Experimental Malaria. *PLoS Pathog*. 2016; 12(10):e1005945.

Zander RA, Obeng-Adjei N, Guthmiller JJ, Kulu DI, Li J, Ongoiba A, *et al.*. PD-1 co-inhibitory and OX40 co-stimulatory crosstalk regulates helper T cell differentiation and anti-*Plasmodium* humoral immunity. *Cell Host Microbe*. 2015; 17(5):628–641.

APÊNDICE A – P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria

RESEARCH ARTICLE

P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria

Érika Machado de Salles^{1*}, Maria Nogueira de Menezes¹, Renan Siqueira², Henrique Borges da Silva^{1,2}, Eduardo Pinheiro Amaral¹, Sheyla Inês Castillo-Méndez¹, Isabela Cunha¹, Alexandra dos Anjos Cassado¹, Flávia Sarmiento Vieira¹, David Nicholas Olivieri³, Carlos Eduardo Tadokoro⁴, José Maria Alvarez¹, Robson Coutinho-Silva^{5,6}, Maria Regina D'Império-Lima^{1*}

1 Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Department of Laboratory Medicine and Pathology, Center of Immunology, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, United States, **3** Escuela Superior de Enfermería Informática, Universidad de Vigo, Vigo, Spain, **4** Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil, **5** Programa de Imunobiologia, Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **6** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Pesquisa Translacional em Saúde e Meio Ambiente da Região Amazônica, Rio de Janeiro, Brazil

* erika.salles@gmail.com (EMS); relima@usp.br (MRDL).

OPEN ACCESS

Citation: Salles ÉM, Menezes MN, Siqueira R, Borges da Silva H, Amaral EP, Castillo-Méndez SI, et al. (2017) P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. *PLoS Pathog* 13(8): e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005595>

Editor: Jean Langhorne, Francis Crick Institute, UNITED KINGDOM

Received: March 22, 2017

Accepted: August 21, 2017

Published: August 31, 2017

Copyright: © 2017 Salles et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil) grants, 2010/51150-4, 2013/07140-2 and 2015/20432-8 (MRDL) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) grants, 303676/2014-0 and 448765/2014-4 (MRDL). EMS received a PhD fellowship from FAPESP (2011/

Abstract

A complete understanding of the mechanisms underlying the acquisition of protective immunity is crucial to improve vaccine strategies to eradicate malaria. However, it is still unclear whether recognition of damage signals influences the immune response to *Plasmodium* infection. Adenosine triphosphate (ATP) accumulates in infected erythrocytes and is released into the extracellular milieu through ion channels in the erythrocyte membrane or upon erythrocyte rupture. The P2X7 receptor senses extracellular ATP and induces CD4 T cell activation and death. Here we show that P2X7 receptor promotes T helper 1 (Th1) cell differentiation to the detriment of follicular T helper (Tfh) cells during blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. The P2X7 receptor was activated in CD4 T cells following the rupture of infected erythrocytes and these cells became highly responsive to ATP during acute infection. Moreover, mice lacking the P2X7 receptor had increased susceptibility to infection, which correlated with impaired Th1 cell differentiation. Accordingly, IL-2 and IFN γ secretion, as well as T-bet expression, critically depended on P2X7 signaling in CD4 T cells. Additionally, P2X7 receptor controlled the splenic Tfh cell population in infected mice by promoting apoptotic-like cell death. Finally, the P2X7 receptor was required to generate a balanced Th1/Tfh cell population with an improved ability to transfer parasite protection to CD4-deficient mice. This study provides a new insight into malaria immunology by showing the importance of P2X7 receptor in controlling the fine-tuning between Th1 and Tfh cell differentiation during *P. chabaudi* infection and thus in disease outcome.

APÊNDICE B – The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models

LETTER

doi:10.1038/nature18296

The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models

Fernanda R. Cugola^{1,2*}, Isabella R. Fernandes^{1,2*}, Fabiele B. Russo^{1,2*}, Beatriz C. Freitas², João L. M. Dias¹, Katia P. Guimarães¹, Cecília Benazzato¹, Nathalia Almeida¹, Graciela C. Pignatari^{1,2}, Sarah Romero², Carolina M. Polonio⁴, Isabela Cunha⁴, Carla L. Freitas⁴, Wesley N. Brandão⁴, Cristiano Rossato⁴, David G. Andrade⁴, Daniele de P. Faria⁵, Alexandre T. Garcez⁵, Carlos A. Buchpiget⁵, Carla T. Braconi⁶, Erica Mendes⁶, Amadou A. Sall⁷, Paolo M. de A. Zanotto⁶, Jean Pierre S. Peron⁴, Alysso R. Muotri² & Patrícia C. B. Beltrão-Braga^{1,8}

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* (family *Flaviviridae*) and was first described in 1947 in Uganda following blood analyses of sentinel *Rhesus* monkeys¹. Until the twentieth century, the African and Asian lineages of the virus did not cause meaningful infections in humans. However, in 2007, vectored by *Aedes aegypti* mosquitoes, ZIKV caused the first noteworthy epidemic on the Yap Island in Micronesia². Patients experienced fever, skin rash, arthralgia and conjunctivitis³. From 2013 to 2015, the Asian lineage of the virus caused further massive outbreaks in New Caledonia and French Polynesia. In 2013, ZIKV reached Brazil, later spreading to other countries in South and Central America³. In Brazil, the virus has been linked to congenital malformations, including microcephaly and other severe neurological diseases, such as Guillain-Barré syndrome^{4,5}. Despite clinical evidence, direct experimental proof showing that the Brazilian ZIKV (ZIKV^{BR}) strain causes birth defects remains absent⁶. Here we demonstrate that ZIKV^{BR} infects fetuses, causing intrauterine growth restriction, including signs of microcephaly, in mice. Moreover, the virus infects human cortical progenitor cells, leading to an increase in cell death. We also report that the infection of human brain organoids results in a reduction of proliferative zones and disrupted cortical layers. These results indicate that ZIKV^{BR} crosses the placenta and causes microcephaly by targeting cortical progenitor cells, inducing cell death by apoptosis and autophagy, and impairing neurodevelopment. Our data reinforce the growing body of evidence linking the ZIKV^{BR} outbreak to the alarming number of cases of congenital brain malformations. Our model can be used to determine the efficiency of therapeutic approaches to counteracting the harmful impact of ZIKV^{BR} in human neurodevelopment.

The recent increase in microcephaly cases in Brazil has been associated with the outbreak of Zika virus (ZIKV)⁷, originating from an Asian-lineage strain that can be spread by *Aedes aegypti* mosquitoes⁸. The Brazilian ZIKV (ZIKV^{BR}) has been detected in the placenta and amniotic fluid of two women with microcephalic fetuses^{9–11} and in the blood of microcephalic newborns^{10,12}, suggesting that the virus can cross the placental membrane. The virus has also been identified in the brains and retinas of microcephalic fetuses^{11–13}. However, there is no direct evidence of the mechanism by which ZIKV^{BR} causes brain malformations. A previous study revealed that the African ZIKV (ZIKV^{AF}, strain MR-766) has the ability to infect human skin cells¹⁴. Neurons and astrocytes in the mouse brain could also be infected, inducing hippocampal degeneration and necrosis of pyramidal cells

7 days post-infection¹⁵. More recently, ZIKV^{AF} was also shown to infect human pluripotent stem cell (hPSC)-derived neural progenitor cells (NPCs) *in vitro*, which induced apoptotic cell death¹⁶. These studies were performed using the MR-766 ZIKV^{AF} strain isolated in Uganda in 1947, which shares 87–90% sequence similarity with the Polynesian and Brazilian isolates¹⁷. Nevertheless, because severe congenital malformations were not reported for African isolates, there is a need to study the association of ZIKV with microcephaly and birth defects with isolates from affected localities, such as the ZIKV^{BR} strain. Therefore, there is an urgent need to develop model systems to determine the relationship between infection with the ZIKV^{BR} strain and birth defects.

We used ZIKV^{BR} isolated from a febrile case in the state of Paraíba, in the northeast of Brazil in 2015 (see Methods). To evaluate the causal relationship between ZIKV^{BR} and birth defects, including brain malformation during development, we first used a murine experimental model in which SJL and C57BL/6 pregnant mice were infected with ZIKV^{BR}, evaluating newborns immediately after birth (Extended Data Fig. 1a). Notably, similar to ZIKV^{BR}-infected human newborns^{18,19}, pups born from the SJL ZIKV^{BR}-infected pregnant females displayed clear evidence of whole-body growth delay or intra-uterine growth restriction (IUGR)²⁰ compared to pups born from the mock-infected controls (Fig. 1a, b). Using a qPCR assay, we confirmed the presence of ZIKV^{BR} genomic RNA in several tissues of newborn animals, observing significantly more viral RNA in the brain, confirming the neurotropic nature of the virus (Fig. 1c).

Microcephaly is perhaps the most dramatic of the birth defects reported in ZIKV^{BR}-infected newborns^{4,18,19}. Mouse models often fail to reproduce the severely reduced brain size and pathological alterations found in human patients^{21,22}, probably owing to significant differences in gestation time and brain development between the two species. Nevertheless, upon close inspection of the ZIKV^{BR}-infected mice brains, we noticed cortical malformations in the surviving animals, with reduced cell number and cortical layer thickness, signs associated with microcephaly in humans (Fig. 1d–f). At a cellular level, the neurons in the cortex, thalamus and hypothalamus displayed a ‘vacuolar nuclei’ appearance. This morphology was characterized by central emptiness and marginalized chromatin pattern with nuclear debris, suggesting ongoing cellular death (Fig. 1d and Extended Data Fig. 2). In addition, we also noticed apparent ocular abnormalities, reminiscent of that observed in human patients²³ (Fig. 1g). Thus, SJL infected pups presented congenital malformations compatible with ZIKV^{BR}-infected human newborns. While the impact of ZIKV^{BR}

¹University of São Paulo, Department of Surgery, Stem Cell Laboratory, São Paulo, São Paulo 05508-270, Brazil. ²University of California San Diego, School of Medicine, Department of Pediatrics/ Rady Children's Hospital San Diego, Department of Cellular & Molecular Medicine, Stem Cell Program, La Jolla, California 92037-0695, USA. ³Tsimco, The Biotech Company, São Paulo, São Paulo 01401-000, Brazil. ⁴University of São Paulo, Department of Immunology, Neuroimmune Interactions Laboratory, São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil. ⁵University of São Paulo, Department of Radiology and Oncology, USP School of Medicine, São Paulo, São Paulo 05403-010, Brazil. ⁶University of São Paulo, Department of Microbiology, Institute of Microbiology Sciences, Laboratory of Molecular Evolution and Bioinformatics, São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil. ⁷Instituto Pasteur in Dakar, Dakar 220, Sénégal. ⁸University of São Paulo, School of Arts, Sciences and Humanities, Department of Obstetrics, São Paulo, São Paulo 03828-000, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.