

**ÉRIKA MACHADO DE SALLES**

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

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria  
Regina D'Império Lima  
Versão Original

São Paulo  
2011

## RESUMO

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

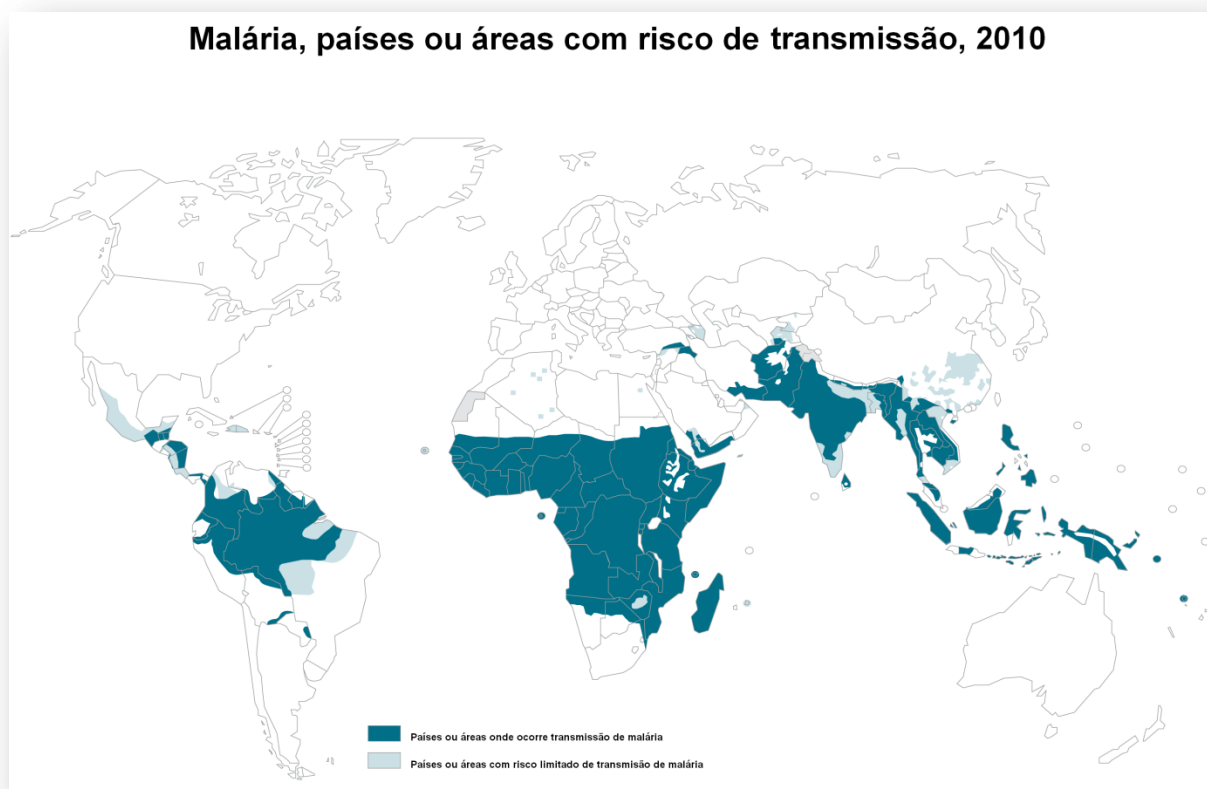
**Keywords:** *P. chabaudi*; damage signals; ATP; P2X7

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Aspectos gerais da malária humana

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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



## 1.2 Modelo de infecção pelo *Plasmodium chabaudi*

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

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

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

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

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

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

### 1.3 Mecanismos de liberação de ATP

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

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

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

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

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

#### **1.4 Função dos receptores purinérgicos na resposta imunológica**

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

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

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

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

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

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

*Fonte:* Adaptado de Trautmann ( 2009).

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

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

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

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

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

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

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



## **2 CONCLUSÃO**

---

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

## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS\*

Adinolfi, E., M. G. Callegari, et al. "Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth." *Mol Biol Cell*. 2005; 16(7): 3260-72.

Akkaya, C., E. Shumilina, et al. "The Plasmodium falciparum-induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway." *Pflugers Arch*. 2009; 457(5): 1035-47.

Angulo, I., M. Fresno "Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria." *Clin Diagn Lab Immunol*. 2009; 9(6): 1145-52.

Artavanis-Tsakonas, K. and E. M. Riley. "Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes." *J Immunol*. 2002; 169(6): 2956-63.

Aswad, F., G. Dennert. "P2X7 receptor expression levels determine lethal effects of a purine based danger signal in T lymphocytes." *Cell Immunol*. 2006 243(1): 58-65.

Bagnaresi, P., et al. Unlike the synchronous Plasmodium falciparum and P. chabaudi infection, the P. berghei and P. yoelii asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int J Gen Med*. 2009; v.2: 47-55

Belnoue, E., M. Kayibanda, et al. "On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria." *J Immunol*. 2002; 169(11): 6369-75.

Bours, M. J., E. L. Swennen, et al. "Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation." *Pharmacol Ther*. 2006; 112(2): 358-404.

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Available from:  
[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html) [2007 May 22]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fredholm, B. B., I. J. AP, et al. "International Union of Pharmacology. XXV.

Nomenclature and classification of adenosine receptors." *Pharmacol Rev.* 2001; 53(4): 527-52.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Langhorne, J., F. M. Ndungu, et al. "Immunity to malaria: more questions

than answers." *Nat Immunol.* 2008; 9(7): 725-32.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Merckx, A., G. Bouyer, et al. (2009). "Anion channels in Plasmodium-



falciparum-infected erythrocytes and protein kinase A." Trends Parasitol. 25(3): 139-44.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Seixas, E., J. F. Moura Nunes, et al. "The interaction between DC and *Plasmodium berghei/chabaudi*-infected erythrocytes in mice involves direct

cell-to-cell contact, internalization and TLR." *Eur J Immunol.* 2009; 39(7): 1850-63.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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