

JOAQUIM TEIXEIRA XAVIER JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MOLÉCULAS
PURINÉRGICAS P2X7 E CD39 EM RESPOSTA AO
Trypanosoma cruzi NA FASE AGUDA DE INFECÇÃO
CARDÍACA**

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

São Paulo

2021

JOAQUIM TEIXEIRA XAVIER JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MOLÉCULAS
PURINÉRGICAS P2X7 E CD39 EM RESPOSTA AO
Trypanosoma cruzi NA FASE AGUDA DE INFECÇÃO
CARDÍACA**

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. Dr. José Maria Álvarez Mosig

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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)

Teixeira Xavier Júnior, Joaquim
AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MOLÉCULAS PURINÉRGICAS P2X7
E CD39 EM RESPOSTA AO Trypanosoma cruzi NA FASE
AGUDA DE INFECÇÃO CARDÍACA / Joaquim Teixeira
Xavier Júnior; orientador José Maria Álvarez Mosig.
-- São Paulo, 2021.
78 p.

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

1. ATP. 2. P2X7. 3. CD39. 4. Trypanosoma cruzi.
5. Doença de Chagas. I. Álvarez Mosig, José Maria,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Joaquim Teixeira Xavier Junior

Título da Dissertação: Avaliação do papel de moléculas purinérgicas P2X7 e CD39 em resposta ao *Trypanosoma cruzi* na fase aguda de infecção cardíaca

Orientador(a): Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, de Mestrado em sessão pública realizada a ___ / ___ / ___, considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do papel do receptor P2X7 expresso em cardiomiócitos na patologia cardíaca causada pela infecção por Trypanosoma cruzi", protocolada sob o CEUA nº 4828250219, sob a responsabilidade de **Jose Maria Alvarez Mosig e equipe; Joaquim Teixeira Xavier Junior** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 02/04/2019.

We certify that the proposal "Study of the role of the P2X7 receptor expressed by cardiomyocytes in cardiac pathology caused by Trypanosoma cruzi infection", utilizing 330 Genetically modified mice (GMO) (330 males), 30 Isogenics mice (30 males), protocol number CEUA 4828250219, under the responsibility of **Jose Maria Alvarez Mosig and team; Joaquim Teixeira Xavier Junior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 04/02/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem: **Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia**

Espécie: **Camundongo geneticamente modificado (OGM)** sexo: **Machos** Idade ou peso: **6 a 8 semanas**

Linhagem: **alfa-MHC-MerCreMer (MerCreMer+/+)** **N amostral: 160**

Origem: **Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia**

Espécie: **Camundongo geneticamente modificado (OGM)** sexo: **Machos** Idade ou peso: **6 a 8 semanas**

Linhagem: **P2X7lox+/+** **N amostral: 10**

Origem: **Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia**

Espécie: **Camundongo geneticamente modificado (OGM)** sexo: **Machos** Idade ou peso: **6 a 8 semanas**

Linhagem: **Mer+P2X7lox+/+** **N amostral: 160**

Origem: **Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia**

Espécie: **Camundongos isogênicos** sexo: **Machos** Idade ou peso: **6 a 8 semanas**

Linhagem: **C57BL/6** **N amostral: 30**

São Paulo, 02 de março de 2020



Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**



Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

São Paulo, 25 de maio de 2021
CEUA N 4828250219

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Jose Maria Alvarez Mosig
Área: Imunologia

Título da proposta: "Estudo do papel do receptor P2X7 expresso em cardiomiócitos na patologia cardíaca causada pela infecção por Trypanosoma cruzi".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 001527)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 27/outubro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O projeto tem como objetivo avaliar o papel do P2X7 e CD39 expresso em células imunes durante a infecção cardíaca e esplênica por Trypanosoma cruzi. Anteriormente foram solicitados animais para avaliar o papel de P2X7, mas para o novo objetivo que é a molécula CD39 não há animais CD39KO ainda inclusos. Desta forma, o pedido visa incluir camundongos completamente Knockouts para CD39. Dos parametros avaliados: Análise de mortalidade, parasitemia, patologia, transcrição de fatores inflamatórios, infiltrado celular, ativação celular no coração e baço de camundongos CD39KO infectados com T. cruzi cepa Y: Grupo 1) Camundongos CD39KO não infectados. (N = 8 camundongos); 3 repetições. Grupo 2) Camundongos CD39KO infectados (N = 8 camundongos); 3 repetições. Grupo 3) Camundongos WT não infectados (N = 8 camundongos); 3 repetições. Grupo 4) Camundongos WT infectados. (N = 8 camundongos); 3 repetições. Subtotal: 48 camundongos C57BL/6 CD39KO e 48 camundongos C57BL/6 WT. Total: 96 camundongos, sendo todos C57BL/6 CD39KO. OBS: Não há possibilidade de redução de animais por grupo, uma vez que é necessário um coração inteiro para cara experimento proposto, sendo assim serão 4 corações para análises de citometria de fluxo e 4 corações para rtPCR e histológicas. ".

Comentário da CEUA: "Solicitação aprovada."



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha família e amigos, que de alguma forma ajudaram na elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar saúde, sabedoria e a chance de ter caminhado até aqui. Com sua permissão e auxílio acredito que soube aproveitar da melhor forma as chances que obtive durante meu mestrado.

Agradeço a minha mãe Ronilda, ao meu Pai Joaquim e as minhas irmãs Gisele e Josilene por toda ajuda durante minha caminhada, proporcionando amor, carinho e depositando orações silenciosas em mim.

Agradeço a minha namorada e eterna companheira Gislane por estar comigo desde o início e por todo amor, carinho e noite em claro me auxiliando com discussões sempre enriquecedoras.

Agradeço ao Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig por me aceitar como seu aluno de mestrado e ter sido meu mentor nesta caminhada acadêmica, sempre presente e com muita paciência e vontade de compartilhar conhecimento. Pessoa no qual tenho enorme carinho e respeito como profissional e cidadão.

Agradeço a Prof^a. Maria Regina pelas discussões sempre muito ricas. Pesquisadora extremamente bem-sucedida e talentosa com quem tive o prazer de compartilhar laboratório.

Agradeço ao Técnico Rogério Nascimento por toda a experiência e paciência que teve para me auxiliar nos experimentos, discussões e manutenção do laboratório e animais.

Agradeço aos membros do laboratório da professora Maria Luiza Barreto Chaves, em especial a técnica Marina Fevereiro por todo o apoio com as técnicas de bioquímica.

Agradeço aos funcionários do Biotério, sem exceção, que trabalharam arduamente para manter minimamente o fornecimento de animais em meio a pandemia. Sem eles não haveria experimentos.

Agradeço a Maria Eni, exemplo de secretaria e amiga, que tantas vezes nos salva em vários aspectos.

Agradeço a todos os amigos de laboratório pela amizade, brincadeiras e companhia agradável todos os dias no ambiente de trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma me influenciaram e me levaram a ser o profissional que me tornei.

Agradeço ao CNPq, CAPES e FAPESP que disponibilizaram a verba necessária para que os experimentos fossem feitos e pela bolsa de mestrado fornecida pelo CNPq.

Agradeço também aos camundongos que deram suas vidas para que essa pesquisa fosse realizada e para que todas as descobertas que tanto nos auxiliam hoje acontecessem.

XAVIER-JUNIOR, J. T. Avaliação do papel de moléculas purinérgicas P2X7 e CD39 em resposta ao *Trypanosoma cruzi* na fase aguda de infecção cardíaca. 2021. Dissertação (Mestrado Departamento de Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma importante causa de miocardite aguda e cardiomiopatia crônica no mundo. *T. cruzi* é capaz de infectar e se replicar em diversos tipos celulares, podendo levar à morte celular por necrose, liberando sinais de perigo, como o ATP. O ATP extracelular pode ser reconhecido pelo canal iônico P2X7, podendo assim atuar na ativação celular. No entanto, a superestimulação deste receptor pode levar à morte celular por piroptose ou necrose. Entretanto, a ectonucleotidase CD39 é capaz de hidrolizar ATP em ADP e AMP, controlando os níveis de ATP extracelular. Desta forma, neste trabalho avaliamos o papel do P2X7 e CD39 no coração durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 foram infectados e foi observado um aumento no número de células com expressão de P2X7 e CD39, assim como dos transcritos para *P2rx7*, no coração dos animais infectados. Animais *P2rx7*^{-/-} infectados não apresentaram diferenças no peso corporal, parasitemia sanguínea, peso do coração e infiltrado celular no tecido cardíaco quando comparados com animais C57BL/6 infectados. Entretanto, foi observado aumento nos transcritos de DNA satélite *T.c. 18s* de *T. cruzi*, assim como de mRNA para *IL-10* no coração de animais *P2rx7*^{-/-} infectados. Junto a isto, foi observada diminuição nos transcritos de *IL-6* e *IFN-γ* no coração destes animais. Além disto, na análise proteica, o coração de animais *P2rx7*^{-/-} infectados apresentou redução nos níveis de *IFN-γ* e *IL-1β* e aumento de *IL-10* e *IL-12p70* quando comparados com C57BL/6 igualmente infectados, indicando que células efetoras do sistema imune, como macrófagos, monócitos e linfócitos podem estar menos responsivas a infecção por *T. cruzi* no tecido cardíaco destes animais. Não foram observadas diferenças significativas na ativação de linfócitos ou polarização de macrófagos M1 e M2. Animais *CD39*^{-/-} não apresentaram diferenças no peso, mas foi observado aumento na parasitemia sanguínea no dia 6 de infecção, assim como aumentos de DNA satélite de *T. cruzi* no coração destes animais quando comparados com animais C57BL/6 infectados. Além disso, foi encontrado um número maior de células CD45⁺ no coração dos animais *CD39*^{-/-} infectados, bem como de células T CD4⁺ e CD8⁺, assim como de

monócitos inflamatórios Ly6C^{hi}Ly6G⁻ quando comparados com animais C57BL/6 infectados. Estes dados sugerem que a molécula P2X7 pode desempenhar papel na ativação de macrófagos e sua ausência pode culminar no possível agravamento do parasitismo cardíaco. Ainda, CD39 provavelmente atua no controle da resposta inflamatória no tecido cardíaco, uma vez que sua ausência, a princípio, parece estar agravando o quadro da doença na fase aguda.

Palavras-chave: ATP, P2X7, CD39, sinalização purinérgica, *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas.

XAVIER-JUNIOR, J. T. Evaluation of the role of P2X7 and CD39 purinergic molecules in response to *Trypanosoma cruzi* in the acute phase of cardiac infection. 2021. Thesis (Master degree Immunology Department) – Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is an important cause of acute and chronic cardiomyopathy worldwide. *T. cruzi* is capable of infecting and replicating in several cell types, which can lead to cell death by necrosis, releasing danger signals such as ATP. The extracellular ATP can be recognized by the P2X7 ion channel, thus being able to act in cell activation. However, overstimulation of this receptor can lead to cell death by pyroptosis or necrosis. In the other hand, the CD39 ectonucleotidase hydrolyzes ATP to ADP and AMP, controlling the extracellular ATP levels. Considering that in the heart of *T. cruzi*-infected C57BL/6 mice we observed an increase in the number of cells expressing P2X7 and CD39, as well as in the level of *P2rx7* transcripts, in this work we evaluated the role of P2X7 and CD39 in the heart during an acute phase of infection by *T. cruzi*. *P2rx7*^{-/-} infected animals showed no differences in body weight, blood parasitemia, heart weight and cellular infiltrate in the cardiac tissue when compared to C57BL/6 infected animals. However, an increase in *T.c.* 18s satellite DNA of *T. cruzi* and *IL-10* mRNA transcripts, as well as a decrease in *IL-6* and *IFN-γ* transcripts, was observed in the heart of the infected *P2rx7*^{-/-} animals. Furthermore, in the protein analysis, the heart of *T. cruzi*-infected *P2rx7*^{-/-} animals presented a reduction in the levels of IFN-γ and IL-1β and an increase in IL-10 and IL-12p70 when compared to C57BL/6 equally infected, indicating that in the cardiac tissue of *P2rx7*^{-/-} mice, the effector cells of the immune system, such as macrophages, monocytes and lymphocytes, are less responsive to *T. cruzi* infection. However, no significant differences were observed in lymphocyte activation or macrophage polarization to M1 and M2. *CD39*^{-/-} animals displayed no differences in weight, but an increase in blood parasitemia was observed on day 6 of infection, as well as increases in *T. cruzi* satellite DNA in the heart of these animals when compared to infected C57BL/6 animals. Furthermore, a higher number of CD45⁺ cells was found in the heart of *CD39*^{-/-} infected animals, as well as increases in CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and in Ly6C^{hi}Ly6G⁻ inflammatory monocytes when compared to C57BL/6 infected animals. The data obtained suggest that the P2X7 molecule plays a role in macrophage activation, and its

absence may culminate in the possible worsening of the disease. Furthermore, CD39 probably acts to control the exacerbation of the inflammatory response in the cardiac tissue, since its absence aggravates the disease picture in the acute phase.

Key words: ATP, P2X7, CD39, purinergic signaling, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. CICLO DE VIDA DO PARASITO HEMIFLAGELADO <i>T. CRUZI</i>	12
FIGURA 2. RESPOSTA IMUNE AO <i>T. CRUZI</i>	14
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA ANALISE DE CÉLULAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.	26
FIGURA 4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P2X7 E DAS ECTONUCLEOTIDASES CD39 E CD73 EM CARDIOMIÓCITOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 ADULTOS.....	30
FIGURA 5. CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO E EXPRESSÃO DE P2X7, CD39 E CD73 NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS POR <i>T. CRUZI</i>	32
FIGURA 6. AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E TRANSCRITOS INFLAMATÓRIOS NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E <i>P2X7</i> ^{-/-} APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i>	34
FIGURA 7. PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO CORAÇÃO DE ANIMAIS INFECTADOS POR <i>T. CRUZI</i>	36
FIGURA 8. AVALIAÇÃO DE CÉLULAS IMUNES INFILTRANTES NO CORAÇÃO DE ANIMAIS C57BL/6 E <i>P2X7</i> ^{-/-} APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i>	38
FIGURA 9. PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS NO CORAÇÃO DE ANIMAIS <i>P2RX7</i> ^{-/-} APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO COM <i>T. CRUZI</i>	40
FIGURA 10. PERFIL DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS NO CORAÇÃO DE ANIMAIS <i>P2RX7</i> ^{-/-} APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO COM <i>T. CRUZI</i>	42
FIGURA 11. AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E TRANSCRITOS INFLAMATÓRIOS NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E <i>CD39</i> ^{-/-} APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i>	44
FIGURA 12. AVALIAÇÃO DE CÉLULAS IMUNES INFILTRANTES NO CORAÇÃO DE ANIMAIS C57BL/6 E <i>CD39</i> ^{-/-} APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i>	46
FIGURA 13. EXPRESSÃO DE P2X7 EM ANIMAIS MERCRE ⁺ P2RX7FL ^{+/+}	50

LISTA DE ABREVIATURAS

CD- *Cluster Differentiation*

FcARI- Receptor Fc de alta afinidade

STAT- Signal Transducers and Activators of Transcription

IFN- Interferon

APC- Célula apresentadora de antígeno

TCR- Receptor de células T

ATP- Adenosina Trifosfato

ADP- Adenosina difosfato

AMP- Adenosina monofosfato

TNF- Fator de necrose tumoral

Th- *T helper*

Tfh- *T helper* folicular

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

IL- Interleucina

Tmx- Tamoxifeno

DAMP – Padrões moleculares associados ao dano

PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Doença de Chagas	10
1.2. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	11
1.3. Cardiomiopatia chagásica	12
1.4. Resposta imune sistêmica e cardíaca contra o <i>T. cruzi</i>	13
1.5. Os receptores purinérgicos	15
1.6. P2X7 na infecção por <i>T. cruzi</i>	16
1.7. As ecotnucleotidases, hidrolases de ATP	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. Uso de animais e comitê de ética	22
3.2. Obtenção da colônia de animais MerCre ⁺ P2rx7fl ^{+/+}	22
3.3. Genotipagem dos animais gerados	22
3.4. Tratamento com tamoxifeno para ativação de Cre recombinase	23
3.5. Infecção com <i>T. cruzi</i> cepa Y	23
3.6. Análises de transcritos inflamatórios por rtPCRq	23
3.7. Análise histopatológica	25
3.8. Análise por citometria de fluxo	25
3.9. Análise de bioplex	25
3.10. Estratégia de análise por citometria de fluxo	26
3.11. Análise estatística	26
4. RESULTADOS	29
4.1. Avaliação da expressão de P2X7 e ectonucleotidases CD39 e CD73 em cardiomiócitos e leucócitos cardíacos	29
4.2. Aumento do número de células que expressam P2X7 e CD39 observado após infecção por <i>T. cruzi</i>	30
4.3. Avaliação do fenótipo cardíaco e transcritos inflamatórios em animais P2rx7 ^{-/-} após 10 dias de infecção por <i>T. cruzi</i>	33
4.4. Produção de citocinas no coração de animais P2rx7 ^{-/-} após 10 dias de infecção com <i>T. cruzi</i> . 35	
4.5. Avaliação do infiltrado inflamatório no coração de animais P2rx7 ^{-/-} após 10 dias de infecção por <i>T. cruzi</i>	36

4.6.	Perfil de ativação de macrófagos e linfócitos no coração de animais <i>P2rx7^{-/-}</i> após 10 dias de infecção com <i>T. cruzi</i>	38
4.7.	Avaliação de fenótipo cardíaco e transcritos inflamatórios em animais <i>CD39^{-/-}</i> após 10 dias de infecção por <i>T. cruzi</i>	43
4.8.	Avaliação do infiltrado inflamatório no coração de animais <i>CD39^{-/-}</i> após 10 dias de infecção por <i>T. cruzi</i>	45
4.9.	Desenvolvimento de modelo animal <i>Mer⁺P2rx7fl^{+/+}</i>	46
5.	DISCUSSÃO	51
6.	CONCLUSÕES.....	59
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e constitui um grave problema socioeconômico e de saúde pública, principalmente no continente americano, englobando 21 países da América Central, Norte e Sul. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima a existência de seis a sete milhões de pessoas cronicamente infectadas por *T. cruzi* no mundo (WHO, 2020), levando a óbito cerca de 12.500 pessoas anualmente. No Brasil, estima-se que cerca de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas (MSF, 2018), onde entre 1999 e 2007, estima-se que a doença causou cerca de cinquenta e três mil mortes (Martins-Melo et al., 2012). A doença de Chagas continua sendo uma zoonose negligenciada, além de ser uma das causas de miocardite aguda e cardiomiopatia crônica em áreas endêmicas da América Latina (Barbosa et al., 2015).

A transmissão do *T. cruzi* é mediada principalmente por insetos vetores hematófagos da subfamília Triatominae (Reduviidae). O parasito, que se encontra e replica no intestino do inseto, pode infectar um mamífero após a picada deste. Isto ocorre porque o inseto libera o parasito em suas fezes próximo a ferida causada pela picada e, ao coçar, o indivíduo pode colocar as fezes do inseto em contato com a ferida e assim ser infectado pelo parasito. Além desta forma canônica de transmissão, há outras formas de infecção, tais como transmissão oral por alimentos contaminados, transplante de órgãos, transmissão vertical da mãe para o feto ou acidentes laboratoriais (CDC, 2021).

Após a infecção por *T. cruzi*, e período de incubação, inicia-se a fase aguda, normalmente assintomática, com duração de aproximadamente dois meses. Contudo, cerca de 2% dos infectados morrem devido à miocardite ou meningo-encefalite aguda. Nesta fase, podem ser observados números elevados de parasitos na corrente sanguínea e nos tecidos, o que promove uma resposta imune expressiva, com produção de altos níveis de citocinas e ativação de linfócitos T e B (Junqueira et al., 2010 e Rodrigues et al., 2011). Apesar de bastante efetiva, a resposta imune ao *T. cruzi* não elimina por completo a presença do parasito, em tal forma que um pequeno número de parasitos poderá ser detectado no sangue e alguns tecidos por toda a vida do hospedeiro. Cerca de 60-70% dos indivíduos na fase crônica são assintomáticos, enquanto que os

30-40% restantes manifestam cardiomiopatia, e/ou problemas digestivos por conta do desenvolvimento de megacólon ou megaesôfago (Machado et al., 2012).

1.2. Ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo de vida do parasito é complexo, envolvendo hospedeiros mamíferos e vetores insetos. O *T. cruzi* apresenta, basicamente, quatro estágios de vida, sendo: epimastigota, trypomastigota metacíclico, amastigota e trypomastigota sanguícola. A fase epimastigota é uma fase de replicação no intestino do inseto vetor, isto é, antes da infecção do hospedeiro vertebrado. Ainda no intestino do inseto vetor, o *T. cruzi* se diferencia para o estágio trypomastigota metacíclico, sendo esta uma fase com capacidade infectiva, mas não replicativa do parasito, liberada nas fezes do vetor. Ao atingir a corrente sanguínea do homem e outros mamíferos, os trypomastigotas metacíclicos podem infectar diferentes tipos celulares, como macrófagos e células musculares, e dessa forma se diferenciar em amastigotas intracelulares, estágio de alta replicação parasitária por fissão binária. Após a replicação, amastigotas se diferenciam em trypomastigotas sanguícolas e rompem a célula infectada, podendo infectar novas células e prosseguir na sua expansão por repetidos ciclos. Eventualmente, após a sucção sanguínea do hospedeiro vertebrado pelo inseto vetor, os tripomastigotas poderão chegar ao intestino deste. (CDC, 2021) (Figura 1).

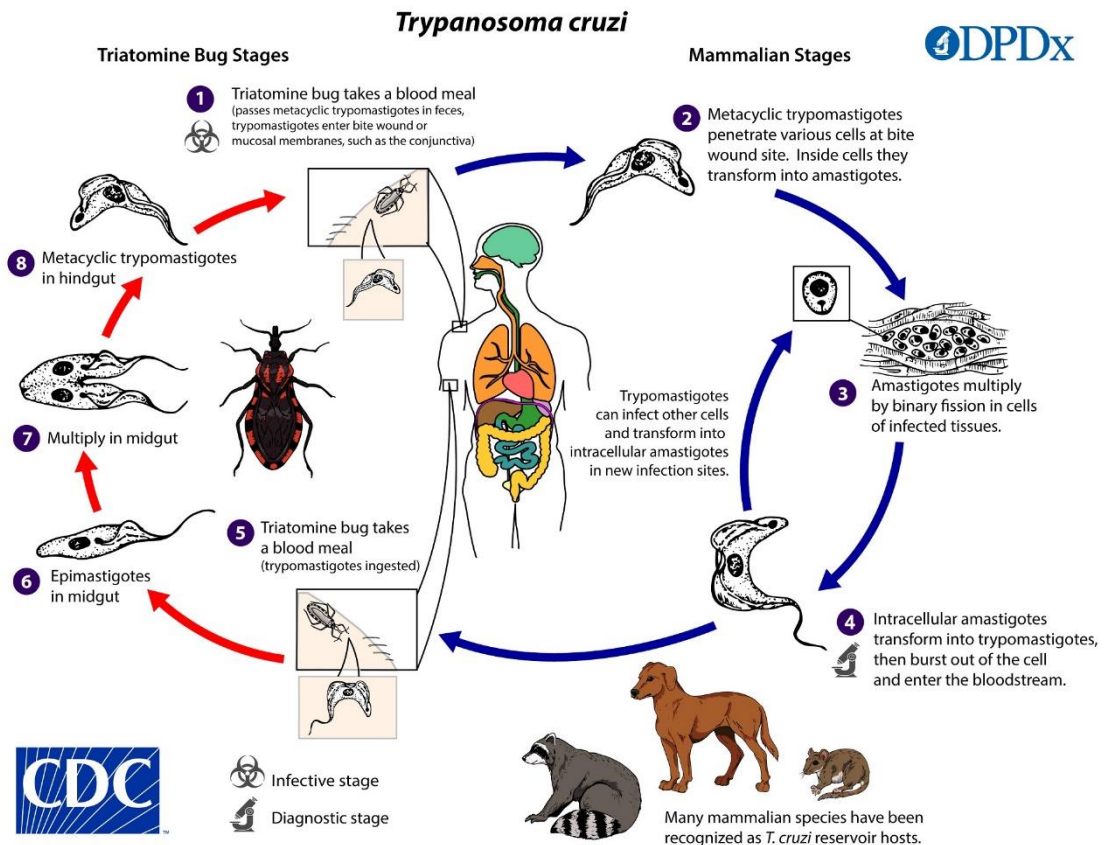


Figura 1. Ciclo de vida do parasito hemiflagelado *T. cruzi*. O inseto vetor hematófago, ao picar o hospedeiro vertebrado, libera em suas fezes a fase trypomastigota metacíclico do parasito. Desta forma, o parasito é capaz de infectar células do hospedeiro no local lesado ou regiões de mucosa, dependendo do local da picada. Ao infectar estas células, o parasito se diferencia em amastigotas intracelulares, que se replicam por fissão binária. Após a replicação, o parasito se diferencia em trypomastigostas e rompem a célula infectada, podendo infectar novas células ou eventualmente voltar ao intestino do inseto, pela sucção do sangue do animal vertebrado por este. No intestino do inseto o parasito se diferencia em epimastigotas, fase replicante, e ao tomar a porção terminal do intestino do inseto, se diferenciam em trypomastigotas metacíclicos podendo infectar novos hospedeiros vertebrados (CDC, 2021).

1.3. Cardiomiopatia chagásica

Passada a fase aguda, uma fração considerável das pessoas infectadas pelo *T. cruzi* apresenta comprometimento cardíaco ou digestivo, e raramente ambos, sendo que o quadro mais devastador é a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (Marin-Neto, 2007). Esta complicação resulta em uma relevante taxa de mortalidade por conta do desenvolvimento de arritmias e insuficiência cardíaca congestiva (Research Priorities for Chagas Disease, 2012).

No modelo experimental murino a miocardite aguda é uma manifestação comum da infecção pelo *T. cruzi*. Esta patologia decorre da invasão do tecido cardíaco pelo parasita num período no qual a resposta imune *T. cruzi*-específica é incipiente e os níveis de parasitemia elevados. Ainda, em determinadas linhagens de camundongos infectados por parasitas de algumas cepas, os animais mostram lesões cardíacas crônicas, que se assemelham, a nível histopatológico, ao quadro de CCC humano (Marinho et al., 2004).

A causa da CCC humana, assim como da murina, é ainda desconhecida. Embora originalmente considerada o resultado de uma reação autoimune, pelo fato de a intensidade de resposta na fase crônica não ser proporcional aos níveis de *T. cruzi* encontrados no coração (Cunha-Neto et al., 1995 e Biolo et al., 2010), dados obtidos de pacientes chagásicos e camundongos cronicamente infectados sugerem que a patologia cardíaca crônica está relacionada à persistência do parasita no tecido cardíaco. Neste contexto, o desenvolvimento das lesões resulta não somente da destruição celular causada pelo parasita, mas também da ação do infiltrado inflamatório destinado à eliminação deste (Rassi, 2012). Desta forma, apesar de uma contribuição da autoimunidade não ter sido totalmente descartada, o problema central da CCC parece ser a persistência de *T. cruzi* no tecido cardíaco (Jones et al., 1993 e Tarleton, 2001).

1.4. Resposta imune sistêmica e cardíaca contra o *T. cruzi*

No indivíduo infectado, o reconhecimento e resposta ao *T. cruzi* depende da imunidade inata e adquirida. Macrófagos e células dendríticas reconhecem o parasito por TLRs 2,4 e 6 extracelulares, bem como TLRs 7 e 9 intracelulares e produzem citocinas como IL-12 e TNF- α . A IL-12 induz polarização de Linfócitos CD4⁺ Th₀ para Th₁ e ativam células *natural killer* (NK), sendo duas das principais células produtoras de IFN- γ (Andrade et al., 2014). Os macrófagos também participam na destruição do *T. cruzi* intracelular principalmente após serem polarizados em perfil pró-inflamatório (M1) pelo IFN- γ produzido pelos linfócitos T e células NK, e assim produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (Figura 2) (Abrahamsohn, 1998). Uma vez instaurada a resposta adquirida específica, anticorpos IgG produzidos por células B desempenham um papel fundamental na remoção das formas extracelulares do *T. cruzi*. Células TCD8⁺ *T. cruzi*-específicas são fundamentais e importantes na detecção e

destruição das células infectadas pelo parasito (Figura 2) (Marinho et al., 2007), e, como indicado acima, células T CD4⁺ e CD8⁺ otimizam a atividade tripanocida dos macrófagos através da produção de IFN- γ (Marinho et al., 2009).

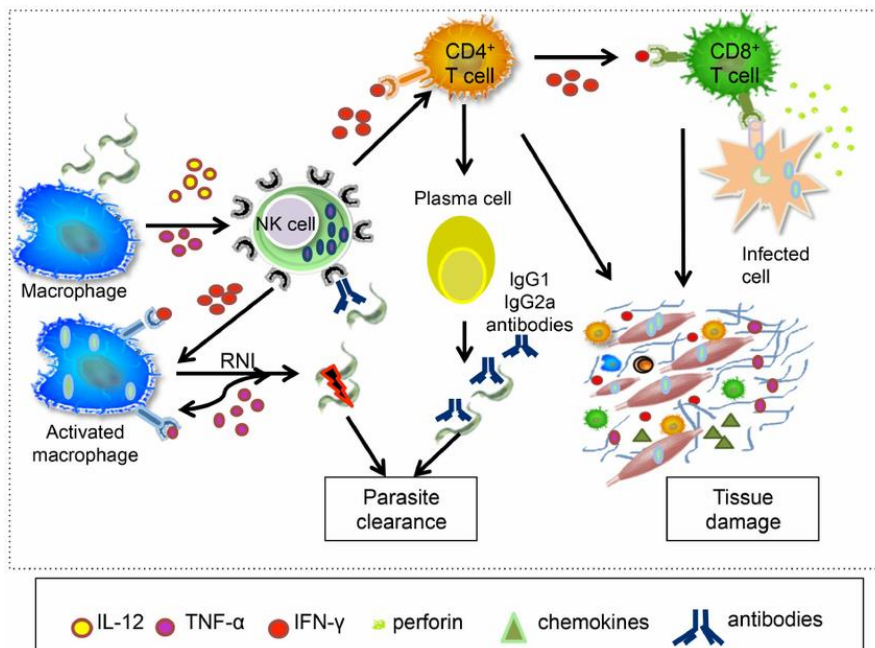


Figura 2. **Resposta imune ao *T. cruzi*.** A resposta imune contra o parasito se dá inicialmente pela imunidade inata, com ativação de macrófagos que são capazes de reconhecer padrões de patógenos (PAMPs) do parasito e responder ao mesmo com produção de citocinas como IL-12, TNF- α e IFN- γ , bem como moléculas efetoras como espécies reativas de nitrogênio (RNI), que auxiliam no controle tissular do crescimento parasitário no tecido. Paralelamente, células apresentadoras de antígeno como macrófagos e células dendríticas migram para órgãos linfoides e dão início a resposta imune adaptativa, como ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, assim como linfócitos B que diferenciam em células plasmáticas. A ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ auxilia na polarização microbicida de macrófagos, capaz de controlar o crescimento parasitário. Junto a isto, células T CD8⁺ auxiliam na eliminação de células infectadas pelo parasito pela liberação de perforinas e granzimas nestas células. Por outro lado, células plasmáticas passam por estágio de maturação para produção de anticorpos opsonizantes e neutralizantes para auxiliar na eliminação do parasito (Andrade et al., 2014).

Os mecanismos imunes acima citados também operam no coração infectado pelo *T. cruzi*, uma vez que além dos macrófagos residentes, moléculas solúveis, tais como anticorpos, assim como células mieloides e linfoides ganham acesso ao coração inflamado. Entretanto, a participação das células estruturais cardíacas (cardiomiócitos, fibroblastos, assim como células endoteliais e da musculatura lisa dos vasos) na infecção pelo parasita não é bem elucidada, exceto o fato de serem alvos da invasão, ou agirem promovendo as modificações vasculares que permitem o recrutamento celular, ou a reconstrução do tecido

lesado. Diversos grupos de pesquisa têm avaliado a resposta *in vitro* ao *T. cruzi* por cardiomiócitos isolados de camundongos neonatos, destacando-se a produção de citocinas e quimiocinas (Machado et al., 2000; Goldenberg et al., 2009). Além disto, em relação a estudos *in vivo*, o nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente que os cardiomiócitos, principais vítimas na CCC, também contribuem *in vivo* à resposta imune cardíaca contra o parasito. Assim, no animal infectado pelo *T. cruzi* por um período de 10-30 dias foi observado que os cardiomiócitos são ativados através de receptores que utilizam o adaptador MyD88, sinalização que resulta em aumento significativo da produção local de quimiocinas e citocinas (Santana et al., 2018).

1.5. Os receptores purinérgicos

ATP é uma molécula altamente energética, utilizada pelas células em suas atividades de manutenção e sinalização intracelular (Joyce et al., 1995), síntese de ácidos nucleicos (Beuning e Karin, 2000) e neurotransmissão (Larsson et al., 2011). Entretanto, em microambiente de dano tecidual, onde ocorre morte celular por necrose, há extravasamento de conteúdo intracelular e, conseqüentemente, alta concentração de ATP extracelular (Seminario-Vidal et al., 2009), um mediador classificado como DAMP que ativa diversas células através de receptores purinérgicos, como o P2X7.

Descritos originalmente no sistema nervoso (Burnstock, 1976), os receptores purinérgicos, receptores que respondem a purinas tais como ATP e adenosina, podem ser classificados em 2 grupos, P1 e P2 (Burnstock, 1978). O grupo P1 reconhece basicamente a molécula adenosina, produto derivado da hidrólise de ATP por proteínas ectonucleotidasas CD39 e CD73. O grupo P2 inclui os receptores P2Y, que são receptores acoplados a proteína G, e os P2X, que são canais iônicos e compreendem receptores que vão de P2X1 a P2X7 (Dubyak et al., 2007). O P2X7 é amplamente expresso em diversos tipos celulares. Assim, no coração, este receptor é expresso por diferentes células, o que inclui cardiomiócitos, células epiteliais e musculares dos vasos e fibroblastos, assim como células residentes do sistema imune (Barth et al., 2010; Pflieger et al., 2012; Mazzola et al., 2008; Cosentino et al., 2012).

Na inflamação, o ATP extracelular que se liga ao P2X7 funciona como segundo sinal para ativação de inflamassoma NLRP3, o que leva a produção de

ROS e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-18 e outras citocinas via ativação do fator de transcrição *NF κ B*, potencializando a resposta imune local (Di Virgilio et al., 2017). Entretanto, em um microambiente de morte celular exacerbada, o acúmulo de ATP extracelular pode, através do P2X7, ativar o canal iônico panexina e liberar altas concentrações de ATP da própria célula que está sendo ativada (Boyce et al., 2017). Esta liberação de ATP pode levar a exaustão mitocondrial, produção de ROS, desbalanço iônico e consequente morte celular, o que gera mais DAMPs e pode levar a uma piora na resposta inflamatória (Savio et al., 2018; Zhang et al., 2018).

1.6. P2X7 na infecção por *T. cruzi*

O receptor P2X7 é largamente estudado em infecções virais, bacterianas e parasitárias, assim como em doenças autoimunes e câncer (Di Virgilio, 2017). Em nosso laboratório, Sales e colaboradores mostraram que, na infecção por *Plasmodium chabaudi*, o direcionamento da resposta imune para perfil Th1 está relacionado com a ativação do P2X7R nas células T CD4+ parasito-específicas (Salles et al., 2017). Ainda, na infecção murina causada por *Mycobacterium tuberculosis* de alta virulência, a sinalização por P2X7 determina um aumento da patologia no pulmão, assim como maior infiltrado leucocitário, uma vez que há maior sinalização e recrutamento celular pelas células residentes do tecido (Amaral et al., 2014).

Poucos trabalhos têm abordado o papel do P2X7 na infecção pelo *T. cruzi*. No modelo murino de infecção foi originalmente descrito o envolvimento do P2X7 na morte dos timócitos CD4⁺CD8⁺ na fase aguda. Timócitos provenientes de camundongos infectados se mostraram mais susceptíveis ao ATP extracelular que aqueles de animais não infectados, fenômeno que ocorreria pela abertura de poros na membrana celular (Mantuano-Barradas et al., 2003). No entanto, em um trabalho posterior do mesmo grupo, utilizando camundongos *P2rx7^{-/-}* na infecção pelo *T. cruzi*, não foi possível reproduzir os resultados *in vitro* observados acima, e ainda, observou-se que a ausência do P2X7 não resulta em mudança significativa na curva de parasitemia ou na atrofia tímica, levando a conclusão de que o P2X7 pode estar envolvido neste processo, mas não exerce papel principal (Cascabulho et al., 2008). Em outro trabalho foi mostrado que o P2X7 é ativado nos mastócitos que infiltram o tecido cardíaco do

camundongo infectado pelo *T. cruzi*, mas o P2X7 não foi o principal indutor de morte destas células (Meuser-Batista et al., 2011).

1.7. As ectonucleotidases, hidrolases de ATP

Ectonucleosídeo trifosfato hidrolases (Entpds) são ectoenzimas capazes de hidrolisar e controlar os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Estas proteínas transmembrana são encontradas em diversos tipos celulares e participam de variados processos fisiológicos, como fluxo sanguíneo, ativação e recrutamento celular (Burnstock, 2018). Das 7 ectonucleotidases conhecidas (Entpd 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8), a Entpd1 ou CD39 é amplamente estudada por sua capacidade particular de hidrolisar ATP em ADP + Pi e ADP em AMP + Pi. Junto a isto, a ecto-5'-nucleotidase ou CD73 é capaz de hidrolisar AMP em adenosina + Pi. Mutuamente estas duas proteínas são capazes de controlar os níveis de ATP extracelular pela geração de adenosina (Burnstock, 2018). A adenosina, produto formado da hidrólise do ATP, ativa receptores P1. Receptores P1 são receptores acoplados a proteína G e são subdivididos em A1, A2_A, A2_B e A3. A sinalização via receptores P1 medeia atividades cardiovasculares e no sistema nervoso central. A sinalização via adenosina aumenta a atividade de células Treg que por sua vez suprimem a atividade de células T efetoras e atividade pró inflamatória de células mieloides (Antonioli et al., 2019). Por este fato, o uso de bloqueadores de ectonucleotidases e receptores de adenosina como tratamento adjuvante tem sido proposto para tratamento de diferentes tipos de tumores (Sek et al., 2018).

Em doenças infecciosas, Amaral e colaboradores demonstraram que o uso de antagonista de receptores de adenosina aumenta o número de células T efetoras CD69⁺, bem como produção de IFN- γ no pulmão de animais infectados por *M. tuberculosis* (Amaral et al., 2019). Na infecção por *T. cruzi*, Ponce e colaboradores propuseram que o tratamento de animais com inibidores da atividade de CD73 promove aumento de macrófagos inflamatórios infiltrantes no coração dos animais infectados, bem como aumento de citocinas pró-inflamatórias, o que auxiliaria na resolução da doença (Ponce et al., 2016).

Neste contexto, o esclarecimento do papel do ATP, que sinaliza via P2X7, na patologia cardíaca aguda decorrente da infecção pelo *T. cruzi* é assunto de

grande importância. Isto se dá pelo fato do ATP estar envolvido na ativação celular e produção de citocinas cruciais na resposta a infecções como *M. tuberculosis* e *P. chabaudi*, tendo possível papel também na patologia cardíaca durante a infecção por *T. cruzi*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Compreender o papel do receptor P2X7 e da ectonucleotidase CD39 no coração de camundongos durante a fase aguda de infecção por *T. cruzi*

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de P2X7 e ectonucleotidasas CD39 e CD73 na população de células cardíacas de camundongos;
- Avaliar a expressão de P2X7 e ectonucleotidasas CD39 e CD73 na população de células cardíacas após infecção por *T. cruzi*;
- Avaliar o fenótipo cardíaco e infiltrado inflamatório em animais *P2rx7^{-/-}*;
- Avaliar a ativação de células imunes no coração de animais *P2rx7^{-/-}* após infecção por *T. cruzi*;
- Gerar um modelo Cre-lox de estudo de P2X7 especificamente em cardiomiócitos;
- Avaliar o fenótipo cardíaco e infiltrado inflamatório em animais *CD39^{-/-}*.

3. METODOLOGIA

3.1. Uso de animais e comitê de ética

Camundongos C57BL/6, MerCreMer^{+/+}, P2rx7fl^{+/+}, P2X7^{-/-} e CD39^{-/-}, todos com *background* C57BL/6, foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Imunologia do ICB-USP. Todos os procedimentos experimentais seguiram o regulamento nacional de diretrizes éticas para a experimentação e bem-estar dos camundongos do Conselho Nacional de Saúde e Experimentação Animal do Colégio Brasileiro (COBEA). Além disso, os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Saúde Animal da USP, com o número de licenciamento: 4828250219.

3.2. Obtenção da colônia de animais MerCreMer^{+/+}P2rx7fl^{+/+}

Camundongos MerCreMer^{+/+} foram cruzados com camundongos P2rx7fl^{+/+} para obter uma geração F1 (MerCreMer^{+/-}P2rx7fl^{+/-}) 100% heterozigota. Estes camundongos F1 foram cruzados novamente entre si para obter animais F2 (MerCreMer^{+/+}P2rx7fl^{+/+}) 100% homozigotos para o gene P2rx7fl. Para o gene MerCreMer não é possível verificar se o animal é homozigoto ou heterozigoto, uma vez que se trata de um transgene presente em um cromossomo artificial e não existe um gene WT para comparação. No entanto isto não é problema, uma vez que uma única cópia da recombinase Cre gerada é suficiente para a deleção gênica.

Os animais parentais e as diferentes progênies foram genotipados em relação à presença dos genes MerCreMer e P2rx7fl, assim como do gene P2X7 WT. A genotipagem foi realizada por PCR convencional utilizando DNA extraído de sangue da cauda e pares de “primers” específicos para estes genes/transgenes.

3.3. Genotipagem dos animais gerados

Para análise do gene P2rx7fl e do transgene MerCreMer, foi utilizada a técnica de PCR. A reação de amplificação foi realizada em um volume de 20µl contendo 1µl de DNA (50 ng/ml), 0,5µl dos *primers* específicos para cada molécula (12,5 pmol/cada) (Invitrogen), 10µl de *Dreamtaq* (Invitrogen). As sequências dos primers estão descritas a seguir:

Tabela 1. Primers utilizados para genotipagem dos animais transgênicos.

MerCreMer	Sequência
-----------	-----------

MerCreMer-F	5'-ATACCGGAGATCATGCAAGC-3'
MerCreMer-R	5'-AGGTGGACCTGATCATGGAG-3'
controle positivo interno-F	5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'
controle positivo interno-R	5'-GTAGGAGGTAATTCTAGCATCATCC-3'
P2rx7fl	Sequência
P2rx7fl-F	5'-CCATGAGCATCATCCTGACTT-3'
P2rx7fl-R	5'-CATTCTCCGTCACCTCTGCTA-3'
LAR3	5'-CACCGGGTTCTTCTGTTAGTCC-3'

3.4. Tratamento com tamoxifeno para ativação de Cre recombinase

Para que o gene Cre fosse induzido e clivasse a sequência gênica do receptor P2X7 nos camundongos MerCreMer⁺P2rx7fl^{+/+} foi necessário tratar os animais com tamoxifeno. O tratamento foi realizado por via intraperitoneal utilizando 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) (Sigma), dissolvido em óleo de milho (Sigma) na concentração de 10mg/mL a 37°C *overnight*. Os animais receberam doses diárias de 20mg/kg em 100ul, por 5 dias (Sohal et al., 2001).

3.5. Infecção com *T. cruzi* cepa Y

T. cruzi foi mantido por passagens semanais em animais A/J. Animais experimentais de *background* C57BL/6 foram infectados via intravenosa com 200 microlitros de sangue diluído contendo 5x10³ tripomastigotas. A parasitemia foi determinada por microscopia, com lâminas contendo 5ul de sangue da cauda dos animais infectados.

3.6. Análises de transcritos inflamatórios por rtPCRq

Nos camundongos, após perfusão com PBS para eliminar o sangue dos tecidos, o RNA foi extraído da parte posterior do coração. Todas as amostras de tecido foram maceradas em nitrogênio líquido, para evitar degradação do RNA, e processadas em 600µl de solução buffer. O RNA total foi obtido utilizando o Kit RNeasy Mini (Qiagen, Germantown, Maryland, USA) seguindo o protocolo do fabricante. Um micrograma de RNA foi convertido em cDNA por incubação com

transcriptase reversa. Após a obtenção de cDNA os transcritos de inflamatórios foram quantificados por rtPCRq. Foi utilizado o ensaio platinum SYBR Green (Invitrogen) e 4 pmol/ul de *primers* específicos para *Tc. 18s*, *IFN-γ*, *Arg1*, *TNF-α*, *iNOS*, *IL-6*, *IL-10* e *TGF-β* (Tabela 2). A quantificação de cDNA específico para as diferentes moléculas foi realizada usando o equipamento e software ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Os cálculos foram feitos por quantificação relativa, utilizando *GAPDH* (Tabela 2) como controle endógeno.

Tabela 2. *Primers* utilizados em análise por rtPCRq

Primers	Sequência
<i>Tc. 18s-F</i> <i>Tc. 18s-R</i>	5'-TTGAATTGAGGGCCTCTAAGG-3' 5'-AAAGGTACCACTCCCCTGTTT-3'
<i>IFN-γ-F</i> <i>IFN-γ-R</i>	5'-GCGTCATTGAATCACACCTG-3' 5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3'
<i>Arg1-F</i> <i>Arg1-R</i>	5'-AAAGCTGGTCTGCTGGAAAA-3' 5'-ACAGACCGTGGGTTCTTCAC-3'
<i>TNF-α-F</i> <i>TNF-α-R</i>	5'-CCCCAAAGGGATGAGAAGTT-3' 5'-CACTTGGTGGTTTGCTACGA-3'
<i>iNOS-F</i> <i>iNOS-R</i>	5'-GGCAGCCTGTGAGCACTTTG-3' 5'-GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC-3'
<i>IL-6-F</i> <i>IL-6-R</i>	5'-ATGGATGCTACCAAACCTGGAT-3' 5'-TGAAGGACTCTGGCTTTGTCT-3'
<i>IL-10-F</i> <i>IL-10-R</i>	5'-AAGGACCAGCTGGACAACAT-3' 5'-TCATTTCCGATAAGGCTTGG-3'
<i>TGF-β-F</i> <i>TGF-β-R</i>	5'-TGACGTCCTGGAGTTGTACGG-3' 5'-GGGTTTCATGTCATGGATGGTGC-3'
<i>GAPDH-F</i> <i>GAPDH-R</i>	5'-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3' 5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3'

3.7. Análise histopatológica

Para o estudo histopatológico, os animais foram eutanasiados e o coração, previamente perfundido, foi isolado e a parte anterior foi fixada em formol 10%. Após a fixação, o coração foi mantido em etanol 70% e em água, nas duas horas anteriores ao processamento para coloração com hematoxilina e eosina. Os corações foram emblocados em parafina para realização dos cortes. A leitura histopatológica de cada lâmina foi feita avaliando o ventrículo esquerdo do coração.

3.8. Análise por citometria de fluxo

As células presentes no coração dos camundongos não infectados e infectados por *T. cruzi* foram avaliadas por citometria de fluxo. O coração dos animais foi coletado e o excesso de sangue foi retirado bombeando o coração em PBS. Em seguida os corações inteiros foram digeridos com solução de digestão (colagenase e DNase IV 0,5 mg/mL por 30 minutos sob agitação à 37°C). Após dissociação enzimática, a suspensão celular foi filtrada em *cell stainer* com poros de 70µm para a retirada de tecido excedente. As células provenientes do processamento coração dos animais infectados e controles foram coletadas, contadas e plaqueadas na concentração de 1x10⁶ células/poço, para serem depois marcadas com os anticorpos anti-cTnT, anti-CD45, anti-CD11b, anti-Ly6c, anti-Ly6G, anti-CD4, anti-CD8, anti-P2X7, anti-CD39, anti-CD73, anti-CD44, anti-CD69, anti-CD62L, anti-STAT1, anti-STAT3, anti-F4/80 e anti-IAb.

3.9. Análise de bioplex

A parte posterior do coração dos animais de grupos controles e infectados foram processados e o sobrenadante coletado e mantido sob temperatura de -80°C. As moléculas contidas nas amostras de sobrenadante foram quantificadas por Bioplex (Merk Millipore, USA) utilizando o *Kit Mouse cytokine/chemokine panel 1* (Cat. No. MCYTMAG-70K-PX32). Foram quantificadas as seguintes moléculas: IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), TNFα. As análises foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante.

3.10. Estratégia de análise por citometria de fluxo

Para avaliação de células do tecido cardíaco por citometria de fluxo foram utilizadas 3 diferentes estratégias de análise. Em todas as estratégias foram selecionados *singlets*, seguido de *gate* contendo cardiomiócitos e leucócitos (Fig. 3A) ou apenas leucócitos (Fig. 3B-C). Em todas as estratégias foram selecionadas apenas células vivas (*Live and dead* negativas). A partir disso, foram realizadas as análises subsequentes como demonstrado na figura 3.

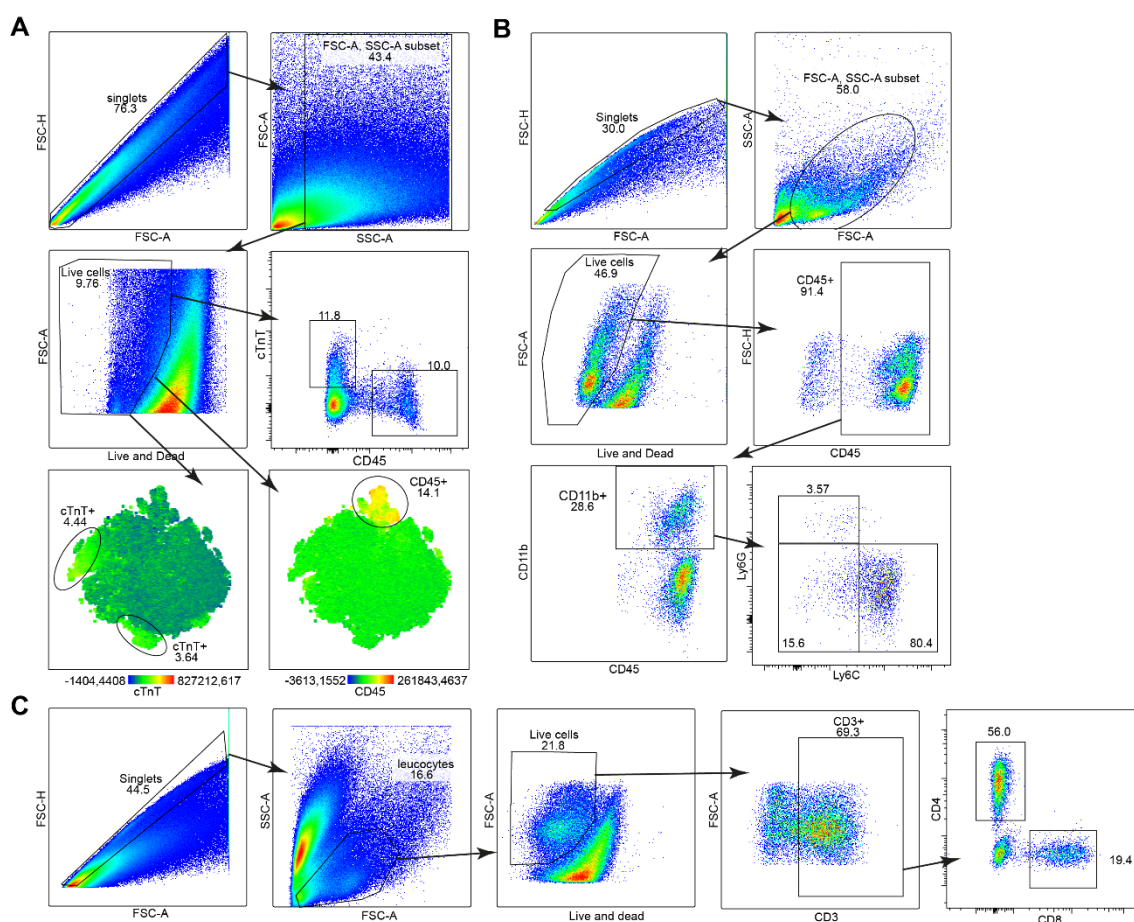


Figura 3. Representação das estratégias utilizadas para análise de células por citometria de fluxo. Em A estratégia de *gates* utilizada para avaliar células cardíacas cTnT⁺ e CD45⁺ presentes no coração (A). Em B e C estratégia de *gates* utilizada para avaliar infiltrado de leucócitos no tecido cardíaco de animais infectados, sendo células mieloides (B) e linfoides (C).

3.11. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no software GraphPad Prism v.7 (San Diego, California, USA). Teste T paramétrico foi utilizado para análises

comparando dois grupos. E teste OneWay ANOVA paramétrico com pós-teste Tukey foi utilizado para comparação de três ou mais grupos. Considerou-se diferenças significativas quando $*p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da expressão de P2X7 e ectonucleotidases CD39 e CD73 em cardiomiócitos e leucócitos cardíacos

O coração de animais C57BL/6 sadios foi coletado para análise em citometria de fluxo. Na análise por tSNE (*t-distributed stochastic neighbor embeddin*), capaz de organizar populações celulares por assimilação de marcadores, foi observada a presença de duas populações de cardiomiócitos, marcadas por cTnT⁺ (*cardiac troponin T*), cTnT.1 e cTnT.2 (Fig. 4A). As populações de cardiomiócitos se diferenciam principalmente pelo seu tamanho e pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores para P2X7, CD39 e CD73 (Fig. 4A-B). Além disso, a população de células CD45⁺ residentes do tecido cardíaco também apresenta expressão destas moléculas, mas com intensidade menor à observada em cardiomiócitos (Fig. 4C-D).

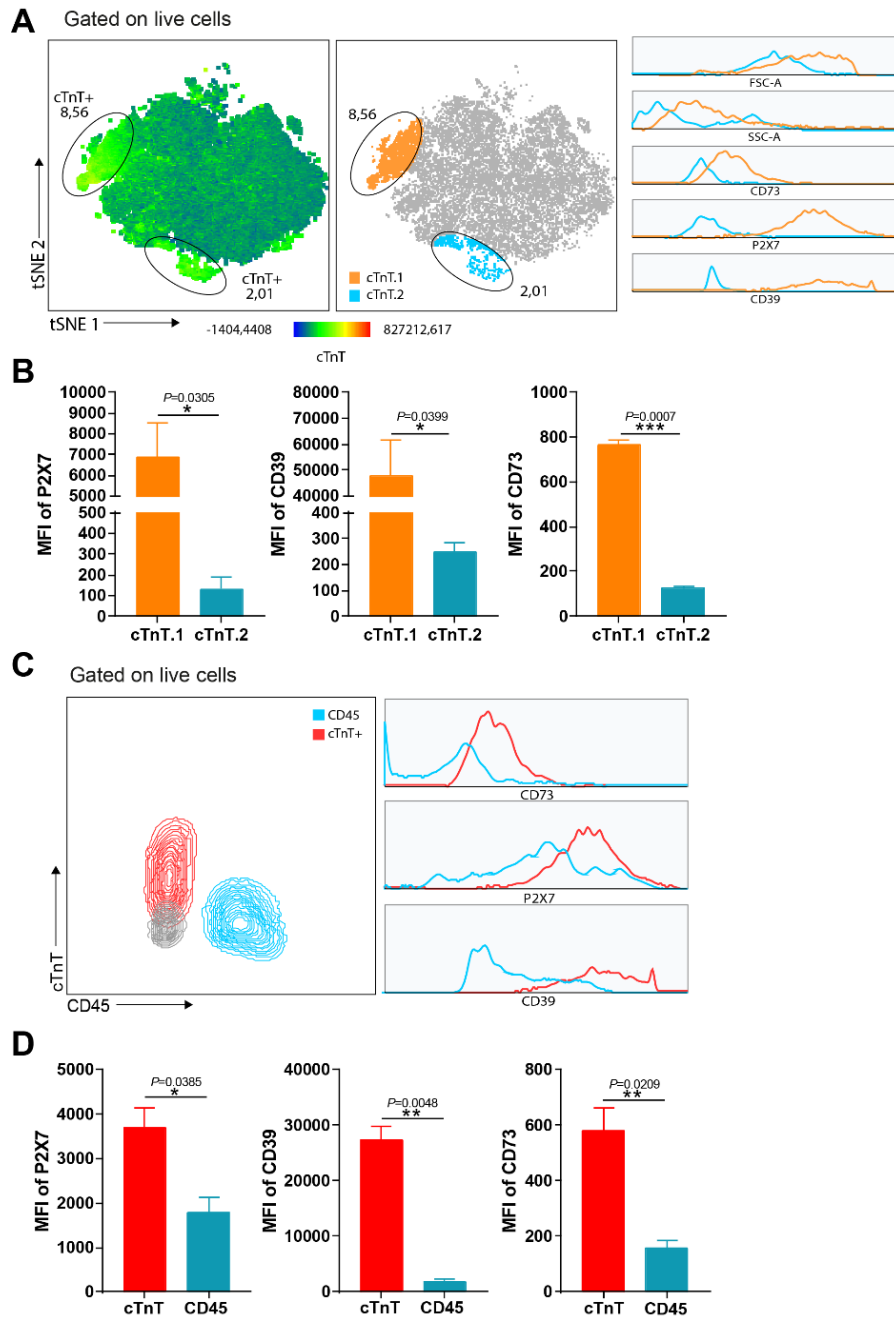


Figura 4. Avaliação da expressão de P2X7 e das ectonucleotidases CD39 e CD73 em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6 adultos. Tamanho (FSC-A), granulosidade (SSC-A) e expressão de CD73, P2X7 e CD39 em duas diferentes populações de cardiomiócitos (cTnT.1 e cTnT.2) observadas em meta-análise de aproximação tSNE e MFI (A, B). Expressão de CD73, P2X7 e CD39 em cardiomiócitos, cTnT⁺ (vermelho), e leucócitos, CD45⁺ (azul) (C, D). Dados expressos por média e desvio padrão. Teste T paramétrico. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas e ns indicam que não há diferenças estatísticas significativas. * $p < 0,05$.

4.2. Aumento do número de células que expressam P2X7 e CD39 observado após infecção por *T. cruzi*

Durante processos inflamatórios e infecciosos diversos com dano celular, observa-se recrutamento de células expressando o receptor P2X7 no microambiente infeccioso (Fowler et al., 2014; Amaral et al., 2014; Salles et al., 2017). Estudos demonstraram que P2X7 está envolvido na ativação de inflamassoma NLRP3, bem como na ativação de caspase-1 e produção de IL-1 β (Riteal et al., 2010; Mortaz et al., 2012). Ainda, P2X7 é um canal iônico, o que aumenta o influxo de cálcio e extravasamento de ATP, que funciona como retroalimentação deste canal de forma autócrina ou parácrina (Yip et al., 2009). Estes fatores culminam no recrutamento e ativação de células imunes no tecido lesado. Desta forma, avaliou-se transcritos e células P2X7⁺ no coração de animais C57BL/6 após 10 dias de infecção por 5x10³ tripomastigotas de *T. cruzi* de cepa Y.

O coração dos animais foi coletado para análises de infiltrado e transcritos inflamatórios após 10 dias de infecção. Na análise histológica foi observado alto número de células inflamatórias infiltrantes (setas verdes) no tecido conjuntivo em volta do coração, assim como no miocárdio, dos animais infectados (*T.c.*), caracterizando pericardite e miocardite. Além disso, foram encontrados ninhos de amastigotas de *T. cruzi* (setas pretas) em alguns cardiomiócitos (Fig. 5A). Foi observado também aumento nos transcritos de mRNA para *P2rx7*, bem como de *TFN- α* e *Nlrp3*, indicando que estas proteínas podem estar aumentadas no coração dos animais infectados (Fig. 5B). A frequência e número total de células CD45⁺, que caracterizam leucócitos está aumentada nos animais infectados quando comparados com controles não infectados (NI) (Fig. 5C), corroborando com o observado na análise histológica. O número de células cTnT⁺ expressando P2X7 não difere entre controle e infectado, bem como o número de células CD73⁺ (Fig. 5D-E). Entretanto, na análise por tSNE dentro de células CD45⁺ foi observado um aumento na frequência de células CD11b⁺, CD4⁺ e CD8⁺ e observa-se, nos histogramas, aumento de células que expressam altos níveis de P2X7 e CD39, mas não células que expressam CD73, no coração dos animais infectados (Fig. 5F). O aumento do número de células CD11b⁺, CD4⁺ e CD8⁺ é confirmado pelo número total de células no coração (Fig. 5G).

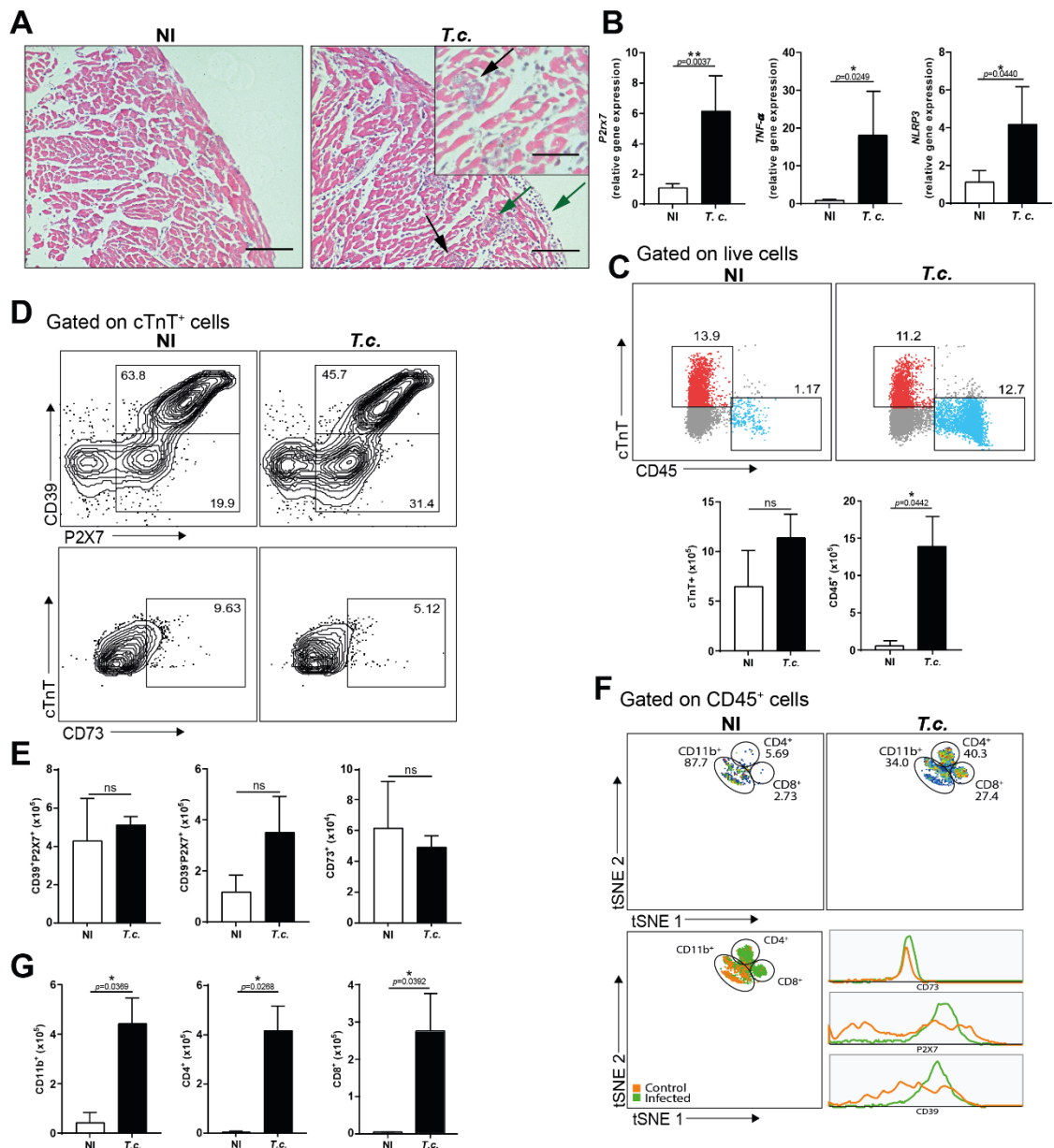


Figura 5. **Caracterização do infiltrado inflamatório e expressão de P2X7, CD39 e CD73 no coração de camundongos C57BL/6 infectados por *T. cruzi*.** Presença de células inflamatórias (setas verdes) e ninhos de amastigotas (setas pretas), caracterizando miocardite e pericardite nos animais infectados (A). Aumento de transcritos inflamatórios, como *P2x7*, *TNF- α* e *NLRP3* no coração de animais infectados (B). Aumento de células CD45⁺ (azul), caracterizando o aumento na frequência e número dos leucócitos que infiltram o coração, e manutenção da população de cardiomiócitos cTnT⁺ (vermelho) nos animais infectados (C). Expressão de CD73, P2X7 e CD39 em cardiomiócitos (cTnT⁺) (D), e número total de cardiomiócitos P2X7⁺CD39⁺, P2X7⁺CD39⁻ e CD73⁺ (E), nos animais controle e infectados. Expressão de P2X7, CD73, e CD39 pelas células CD11b⁺, CD4⁺ e CD8⁺ na população de células CD45⁺ (F), e número total de células CD11b⁺, células CD4⁺ e CD8⁺ (G) dos animais controle e infectados. A expressão relativa dos genes foi determinada pelo $\Delta\Delta CT$ em relação ao gene *housekeeping GAPDH*. Dados expressos por média e desvio padrão. Teste T paramétrico. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas e ns indicam que

não há diferenças estatísticas significativas. * $p < 0,05$. Aumento de 20x, com ampliação de 40x no ninho de amastigota.

4.3. Avaliação do fenótipo cardíaco e transcritos inflamatórios em animais $P2rx7^{-/-}$ após 10 dias de infecção por *T. cruzi*

Após observarmos que aumenta o número de células imunes e também a expressão de P2X7 após a infecção com *T. cruzi*, avaliou-se o fenótipo cardíaco e transcritos inflamatórios no coração de camundongos $P2rx7^{-/-}$ infectados por *T. cruzi*, com o objetivo de investigar a influência desta molécula durante a infecção cardíaca. Assim como anteriormente, os camundongos foram infectados por 5×10^3 tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y por 10 dias.

Como observado por Cascabulho e colaboradores (Cascabulho et al., 2008), não foram observadas diferenças significativas na parasitemia de animais $P2rx7^{-/-}$ quando comparados com animais C57BL/6. Junto a isto, não foram observadas diferenças no peso dos animais infectados (*T.c.*) quando comparados com animais não infectados (NI) de ambos os grupos (Fig. 6A). Entretanto, os transcritos de DNA satélite para *T. cruzi* no coração de animais $P2rx7^{-/-}$ apresentaram aumento significativo quando comparado com o dos animais C57BL/6 (Fig. 6C). O fenótipo cardíaco apresentado na análise histológica demonstrou a presença de células infiltrantes (setas verdes) e ninhos de amastigotas (setas pretas) nos animais infectados de ambos C57BL/6 e $P2rx7^{-/-}$ (Fig. 6B). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas no peso total do coração, bem como na massa relativa do órgão ao peso total do animal. Ainda, mesmo apresentando aumento de leucócitos CD45⁺ nos animais infectados (*T.c.*) em relação aos não infectados (NI) de ambas as linhagens, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos $P2rx7^{-/-}$ e C57BL/6 infectados (Fig. 6D). Por fim, observou-se diminuição de transcritos de mRNA para *IFN- γ* e *IL-6*, e aumento de transcritos para *Arg1* e *IL-10* no coração de animais $P2rx7^{-/-}$ quando comparados com animais C57BL/6 (Fig. 6E).

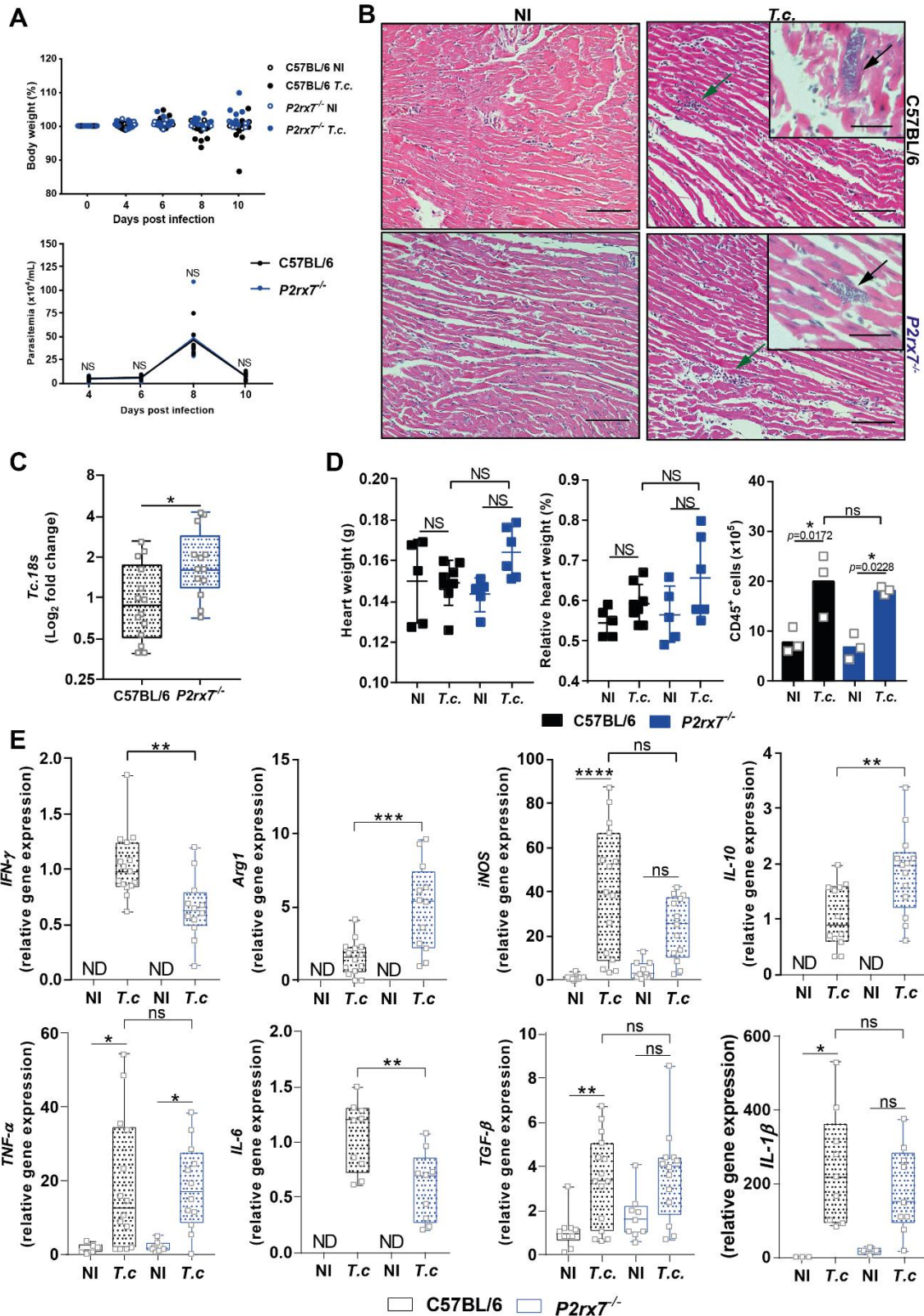


Figura 6. Avaliação do perfil fenotípico e transcritos inflamatórios no coração de camundongos C57BL/6 e $P2X7^{-/-}$ após 10 dias de infecção por *T. cruzi*. Os animais foram infectados por *T. cruzi* e foi avaliado o peso, bem como a parasitemia dos animais infectados a cada dois dias (4,6,8,10) (A). Presença de células inflamatórias (setas verdes) e ninhos de amastigotas (setas pretas), caracterizando miocardite nos animais

infectados **(B)**. Ainda, foi avaliada a presença de transcritos de *T. cruzi* estimando o DNA satélite *T.c. 18s* do parasito no coração **(C)**. Aumento do peso do coração, bem como aumento da massa relativa do coração em relação ao peso total do animal, e aumento no número de células CD45⁺ no coração de animais C57BL/6 e *P2X7*^{-/-} infectados (*T.c.*), se comparados aos camundongos não infectados (NI) **(D)**. Expressão de transcritos inflamatórios para *IFN-γ*, *Arg1*, *iNOS*, *IL-10*, *TNF-α*, *IL-6*, *TGF-β*, *IL-1β* no coração de animais não infectados (NI) e infectados (*T.c.*) **(E)**. A expressão relativa dos genes foi determinada pelo $\Delta\Delta CT$ em relação ao gene *housekeeping GAPDH*. Dados expressos por média e desvio padrão. Teste T paramétrico. Teste OneWay ANOVA paramétrico, pós-teste Tukey. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas e ns indicam que não há diferenças estatísticas significativas. **p*<0,05. Aumento de 20x, com ampliação de 40x no ninho de amastigota.

4.4. Produção de citocinas no coração de animais *P2rx7*^{-/-} após 10 dias de infecção com *T. cruzi*.

Além das análises de biologia molecular, foi avaliada a produção de citocinas no coração dos animais de ambos os grupos, C57BL/6 e *P2rx7*^{-/-} infectados por *T. cruzi*.

Foi observado, assim como nas análises por rtPCRq, diminuição na produção de IFN-γ e aumento na produção de IL-10 (Fig. 7A-B) nos animais *P2rx7*^{-/-} infectados em relação aos camundongos C57BL/6 infectados. Diferente do observado nas análises de biologia molecular, a produção de IL-1β apresentou queda na análise de citocinas no coração dos camundongos *P2rx7*^{-/-} infectados em relação à dos camundongos C57BL/6 infectados (Fig. 7C). Diferente disso, IL12(p70) aumentou no coração de animais *P2rx7*^{-/-} infectados (Fig. 7D), enquanto que IL-6 e TNF-α não apresentaram diferenças significativas no coração dos dois grupos infectados (Fig. 7E-F). Além dos dados observados em bioplex, foi realizada uma correlação do valor quantificado para cada citocina com os respectivos valores encontrados para transcritos de *T.c. 18s* no coração de cada animal (Fig. 7A-F). Isto se deu porque a infiltração de *T. cruzi* no coração dos animais foi muito heterogênea, exigindo, além disso, um alto N para que o resultado fosse confiável. Desta forma, a correlação demonstrou que, em animais C57BL/6, a produção de IFN-γ é dependente da carga parasitária presente no coração, uma vez que quando a carga tende a aumentar, a produção de IFN-γ também aumenta. Entretanto o mesmo não ocorre para animais *P2rx7*^{-/-}, que independente da carga parasitária mantém níveis basais de produção (Fig.

7A). Por outro lado, A produção de IL-10 nos animais *P2rx7*^{-/-} é constantemente superior a produção observada por animais C57BL/6 (Fig. 7B).

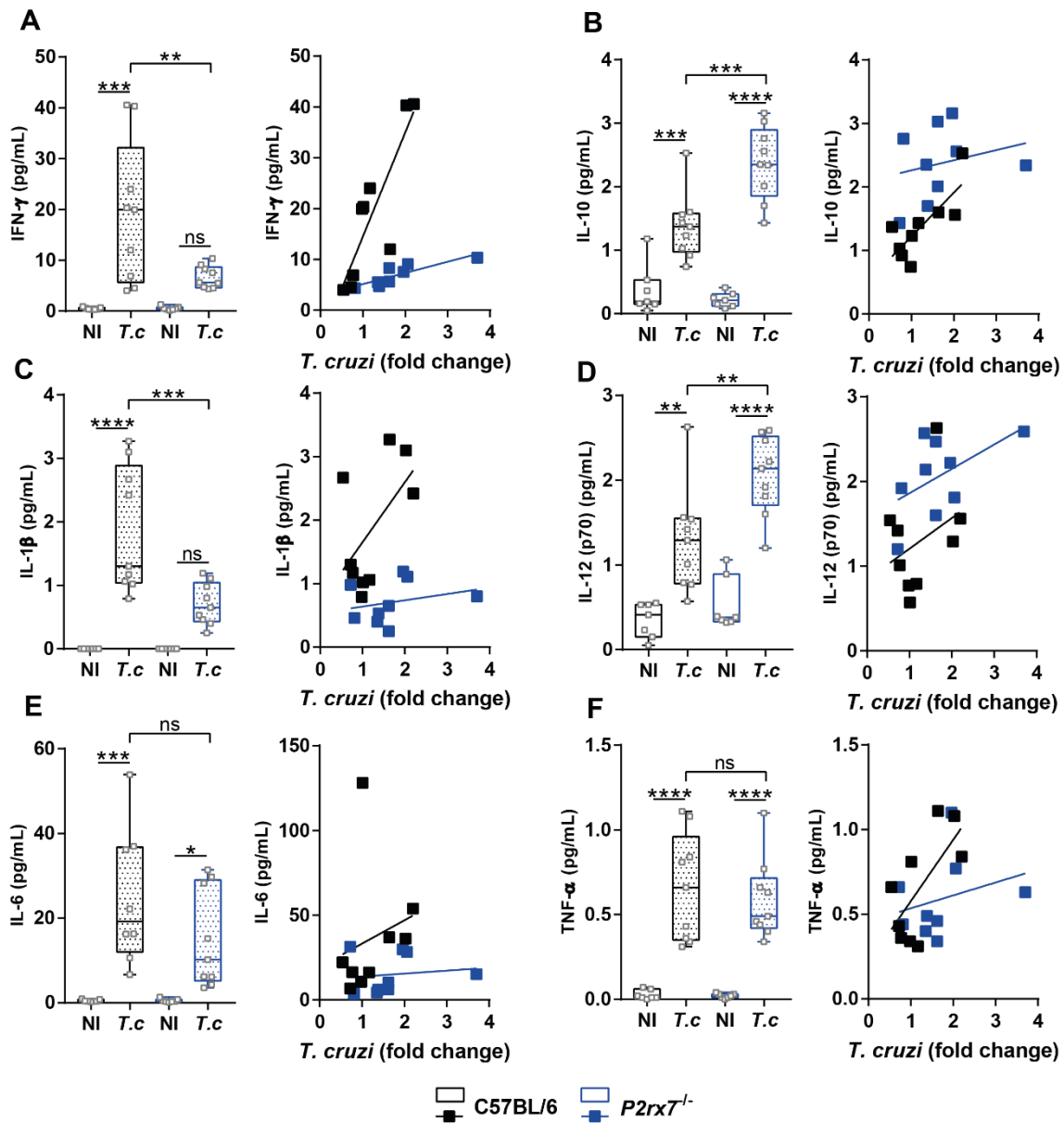


Figura 7. Perfil de produção de citocinas no coração de animais infectados por *T. cruzi*. Avaliou-se a produção de IFN- γ , IL-10, IL-1 β , IL-12 (p70), IL-6 e TNF- α , no coração de animais C57BL/6 e *P2rx7*^{-/-} não infectados (NI) e infectados (*T.c.*) (A-F, gráficos à esquerda). Correlação entre quantidade de transcritos para Tc. 18s e produção de citocinas em cada um dos animais demonstrada nos gráficos de linha (A-F, gráficos à direita). Dados expressos por média e desvio padrão. Teste OneWay ANOVA paramétrico, pós-teste Tukey. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas e ns indicam que não há diferenças estatísticas significativas. * $p < 0,05$.

4.5. Avaliação do infiltrado inflamatório no coração de animais *P2rx7*^{-/-} após 10 dias de infecção por *T. cruzi*

Além do fenótipo e transcritos inflamatórios, foi avaliada a composição de células mieloides (CD11b⁺) e linfoides (CD3⁺) no coração dos animais C57BL/6 e *P2rx7*^{-/-} infectados por *T. cruzi*. Observou-se aumento da frequência e número de monócitos (Ly6C^{hi}Ly6G⁻), mas não de neutrófilos (Ly6C⁻Ly6G^{hi}) e outras células mieloides (Ly6C⁻Ly6G⁻) em ambos os animais infectados (*T.c.*) quando comparados com controles não infectados (NI). Entretanto, não houve diferença no número de células quando comparados os camundongos C57BL/6 e *P2rx7*^{-/-} infectados (Fig. 8A-B). Foi observado, também, aumento do número de células T CD4⁺ e CD8⁺ em ambos os animais infectados quando comparados com controles não infectados. Entretanto, semelhante às células mieloides, não houve diferença no número total de células T CD4⁺ e CD8⁺ nos animais C57BL/6 e *P2rx7*^{-/-} infectados (Fig. 8C-D).

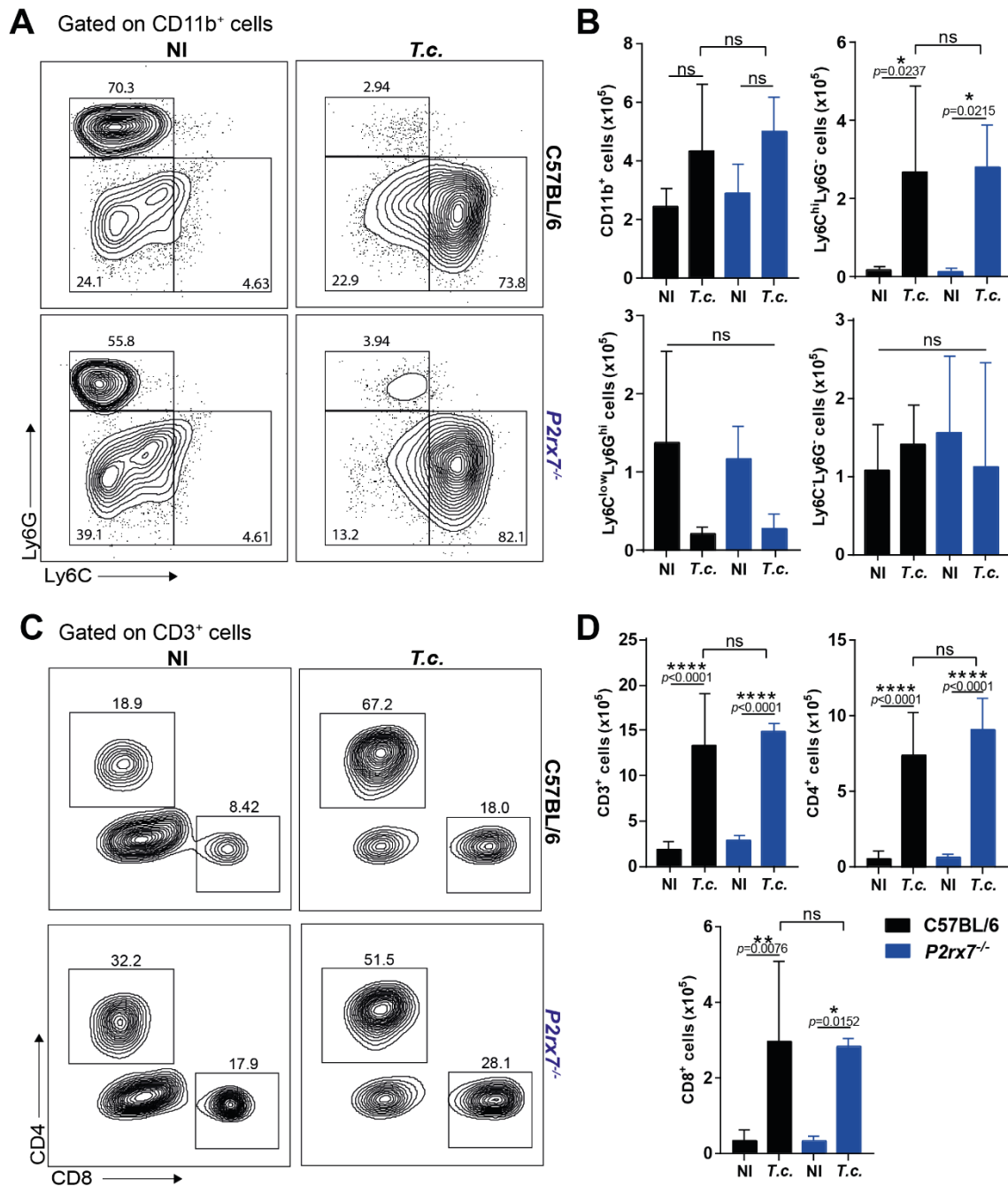


Figura 8. Avaliação de células imunes infiltrantes no coração de animais C57BL/6 e P2X7^{-/-} após 10 dias de infecção por *T. cruzi*. Avaliação da frequência (A) e número total (B) de células CD11b⁺, polimorfonucleares Ly6C^{low}Ly6G^{hi}, monócitos Ly6C^{hi}Ly6G⁻ e Ly6C⁻Ly6G⁻. Frequência (C) e número de células (D) CD3⁺, TCD4⁺ e TCD8⁺ no coração de animais não infectados (NI) e infectados (T.c.). Dados expressos por média e desvio padrão. Teste T paramétrico. Teste OneWay ANOVA paramétrico, pós-teste Tukey. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas e ns indicam que não há diferenças estatísticas significativas. * $p < 0,05$.

4.6. Perfil de ativação de macrófagos e linfócitos no coração de animais P2rx7^{-/-} após 10 dias de infecção com *T. cruzi*.

Com base nos resultados acerca de transcritos e citocinas inflamatórias, buscamos avaliar a ativação de macrófagos e linfócitos após a infecção com *T. cruzi*. Desta forma, no coração dos animais C57BL/6 e *P2rx7^{-/-}* infectados e controles avaliamos a expressão de fatores classicamente envolvidos na polarização de macrófagos, como STAT1 para perfil M1, ou pró-inflamatório, e STAT3 para perfil M2, ou reparador. A população de macrófagos foi determinada pela expressão dos marcadores CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺IAb⁺ (Fig. 9A). Não foram encontradas diferenças significativas entre células positivas para STAT1 e STAT3 entre macrófagos no tecido cardíaco de animais C57BL/6 e *P2rx7^{-/-}* infectados (Fig. 9 B-E). Porém diferenças importantes foram observadas, em ambas as linhagens C57BL/6 e *P2rx7^{-/-}*, entre os grupos não infectados e infectados.

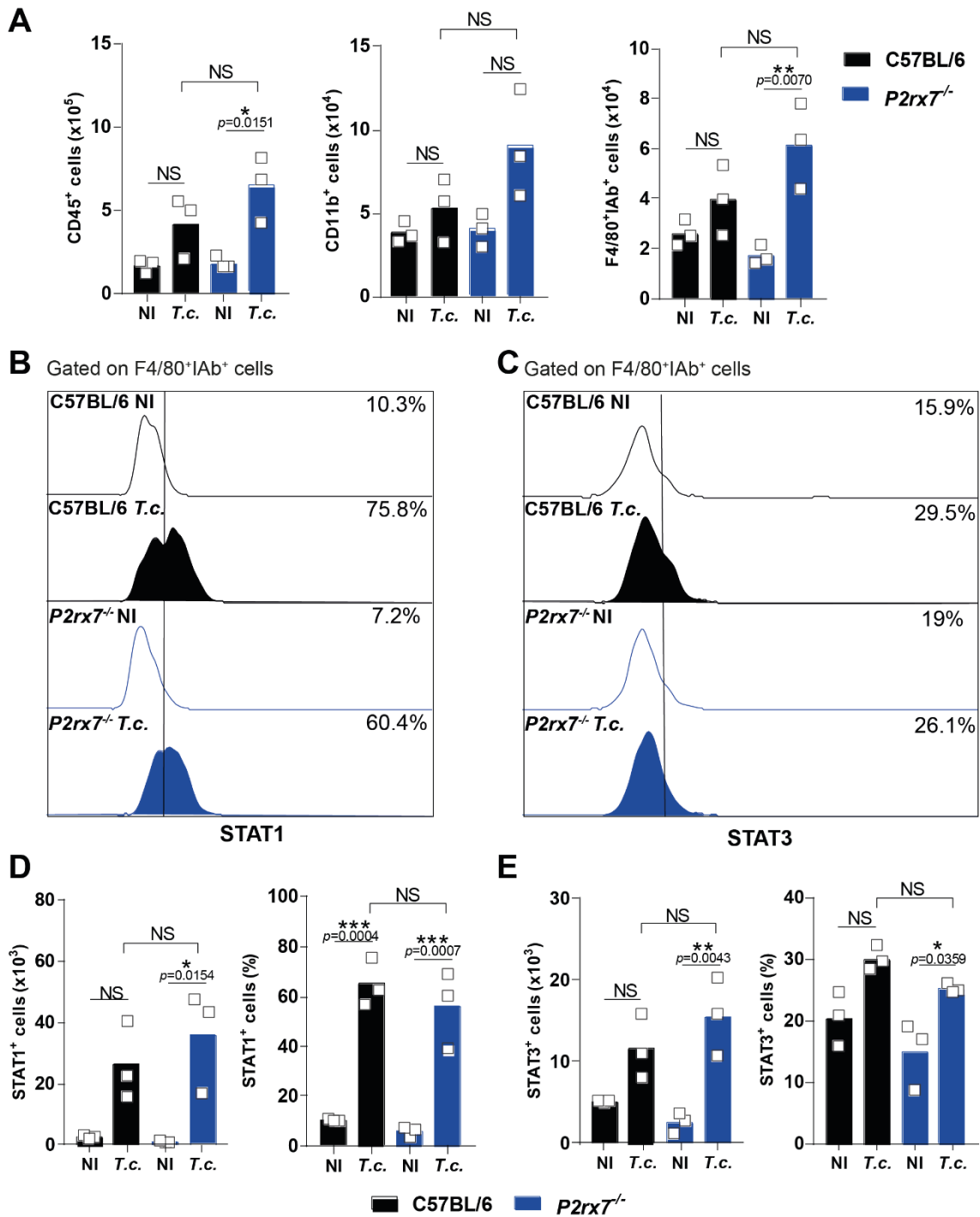


Figura 9. Perfil de ativação de macrófagos no coração de animais *P2rx7^{-/-}* após 10 dias de infecção com *T. cruzi*. Avaliação do número de células CD45⁺, CD11b⁺ e F4/80⁺IAb⁺ (A). Frequência e número total de macrófagos STAT1⁺ (B-D) e STAT3⁺ (C-D) no coração de animais não infectados (NI) e infectados (T.c.). Dados expressos por média e desvio padrão. Teste OneWay ANOVA paramétrico, pós-teste Tukey. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas e ns indicam que não há diferenças estatísticas significativas. * $p < 0,05$.

Além de macrófagos, foi avaliada também a ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ que infiltram o coração dos camundongos C57BL/6 e *P2rx7^{-/-}* infectados e

não infectados. A população de linfócitos efetores foi determinada pela expressão dos marcadores CD62L⁻CD44⁺CD69⁺ (Fig. 10A). Ainda, na população de células T CD4⁺ efectoras (CD62L⁻CD44⁺) foi avaliada a expressão de Tbet, fator de transcrição de linfócitos Th1, e Foxp3, fator de transcrição que caracteriza Linfócitos T_{reg}. Não foram encontradas diferenças significativas na frequência e número de células positivas para Tbet e Foxp3 entre linfócitos no tecido cardíaco de animais C57BL/6 e *P2rx7*^{-/-} (Fig. 10B-E).

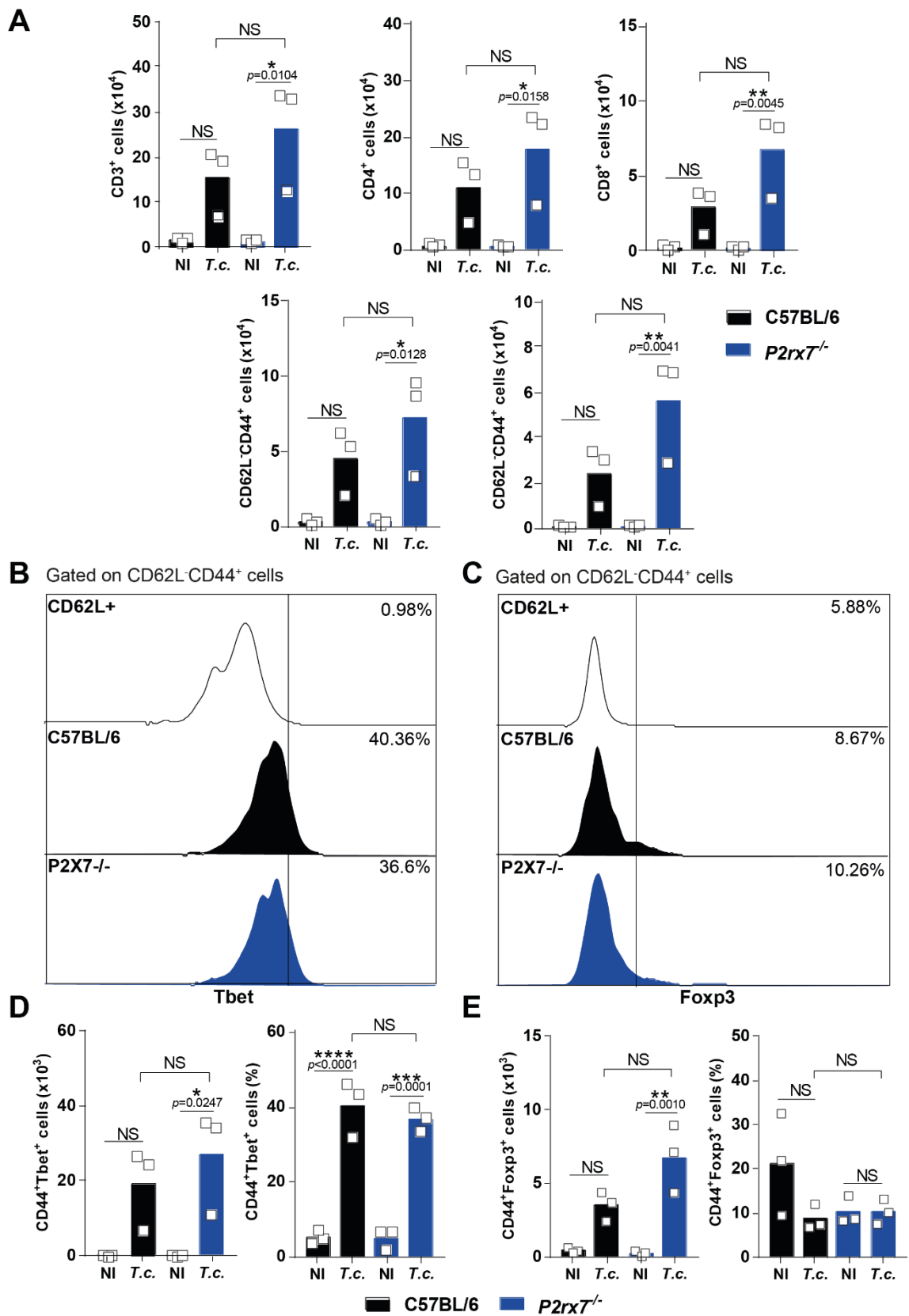


Figura 10. Perfil de ativação de linfócitos no coração de animais *P2rx7*^{-/-} após 10 dias de infecção com *T. cruzi*. Avaliação do número de células T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺

(A). Frequência e número total de células CD4⁺CD44⁺Tbet⁺ (B-D) e CD4⁺CD44⁺Foxp3⁺ (C-D) no coração de animais não infectados (NI) e infectados (*T.c.*). Dados expressos por média e desvio padrão. Teste OneWay ANOVA paramétrico, pós-teste Tukey. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas e ns indicam que não há diferenças estatísticas significativas. * $p < 0,05$.

4.7. Avaliação de fenótipo cardíaco e transcritos inflamatórios em animais CD39^{-/-} após 10 dias de infecção por *T. cruzi*

Como descrito anteriormente, a molécula CD39 é capaz de clivar o ATP extracelular e diminuir a sinalização via receptores P2, como o P2X7. Desta forma, avaliou-se o papel de CD39 e conseqüentemente da não hidrólise do ATP em animais infectados por *T. cruzi*. Assim como os animais *P2rx7^{-/-}*, animais *CD39^{-/-}* e C57BL/6 foram infectados com 5×10^3 tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y durante 10 dias e foram realizadas análises fenotípicas e de transcritos inflamatórios no coração destes animais.

Semelhante aos animais *P2rx7^{-/-}*, os animais *CD39^{-/-}* infectados (*T.c.*) não apresentaram diferenças no peso corporal quando comparados com controle não infectado (NI) ou animais C57BL/6 infectados (*T.c.*). Entretanto, observou-se aumento na parasitemia no dia 6, mas não em outros dias de análise (Fig. 11A), e aumento nos transcritos de mRNA de *T. cruzi* nos animais *CD39^{-/-}* infectados quando comparados com C57BL/6 infectados (Fig. 11C). A análise histológica apresentou maior prevalência de células infiltrantes (setas verdes) no coração de animais *CD39^{-/-}* quando comparados com animais C57BL/6 igualmente infectados (Fig. 11B). Não foram observadas diferenças significativas na massa relativa do coração de ambos, *CD39^{-/-}* e C57BL/6 infectados. Entretanto, a marcação de CD45⁺ no coração dos animais infectados comprova maior infiltrado leucocitário nestes animais (Fig. 11D). Ainda, foram observadas diferenças nos transcritos para *IFN- γ* , *iNOS*, *IL-6* e *IL-10* no coração destes animais, onde todos estão aumentados nos animais *CD39^{-/-}* quando comparados com C57BL/6 igualmente infectados (Fig. 11E).

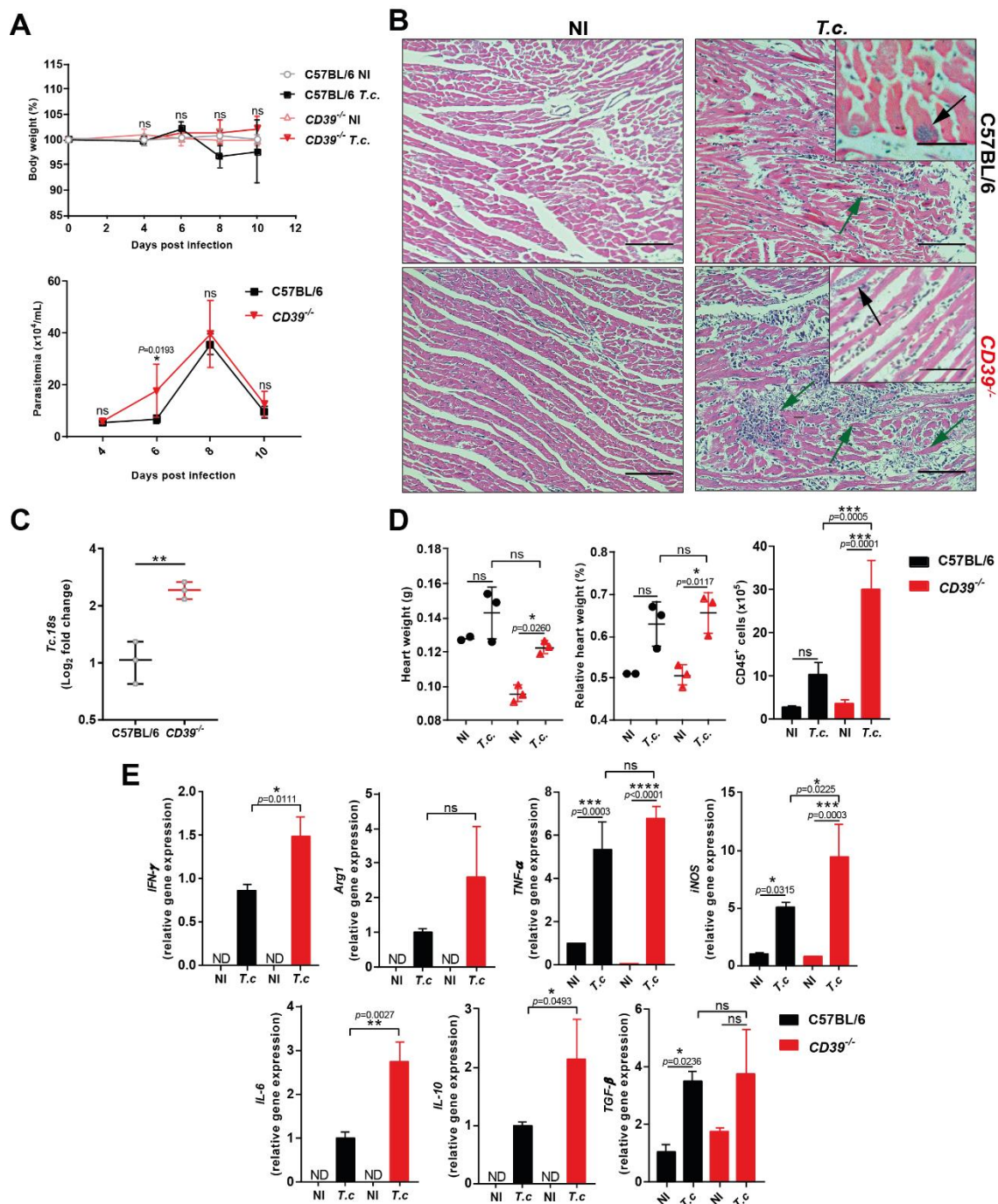


Figura 11. Avaliação do perfil fenotípico e transcritos inflamatórios no coração de camundongos C57BL/6 e CD39^{-/-} após 10 dias de infecção por *T. cruzi*. Animais foram infectados por *T. cruzi* e foi avaliado o peso e a parasitemia, a cada dois dias (4,6,8,10), dos animais infectados (A). Presença de células inflamatórias (setas verdes) e ninhos de amastigotas (setas pretas), caracterizando miocardite nos animais infectados (B). Ainda, foi avaliada a presença de transcritos de *T. cruzi* estimando mRNA 18s no coração (C). Aumento do peso do coração, bem como aumento da massa relativa do coração em relação ao peso total do animal, e aumento no número de células CD45⁺ no coração de animais infectados (T.c.) em relação aos não infectados (NI) (D). Expressão de transcritos inflamatórios para IFN- γ , Arg1, TNF- α , iNOS, IL-6, IL-10, TGF- β no coração de animais não infectados (NI) e infectados (T.c.) (E). A expressão relativa

dos genes foi determinada pelo $\Delta\Delta CT$ em relação ao gene *housekeeping GAPDH*. Dados expressos por média e desvio padrão. Teste T paramétrico. Teste OneWay ANOVA paramétrico, pós-teste Tukey. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas e ns indicam que não há diferenças estatísticas significativas. * $p < 0,05$. Aumento de 20x, com ampliação de 40x no ninho de amastigota.

4.8. Avaliação do infiltrado inflamatório no coração de animais *CD39*^{-/-} após 10 dias de infecção por *T. cruzi*

Além das características fenotípicas e transcritos inflamatórios, foram avaliadas a composição de células mieloides (CD11b⁺) e linfoides (CD3⁺) no coração dos animais *CD39*^{-/-} e C57BL/6 igualmente infectados por *T. cruzi*. Observou-se aumento da frequência e número de monócitos (Ly6C^{hi}Ly6G⁻) e outras células mieloides (Ly6C⁻Ly6G⁻), mas não de neutrófilos (Ly6C⁻Ly6G^{hi}) em ambos os animais infectados (*T.c.*), indicando maior infiltrado de células mieloides em animais *CD39*^{-/-} (Fig. 12A-B). Junto a isto, foi observado aumento do número de células T CD4⁺ e CD8⁺ em ambos os animais infectados, indicando também maior infiltrado de células T no coração de animais *CD39*^{-/-} (Fig. 12C-D).

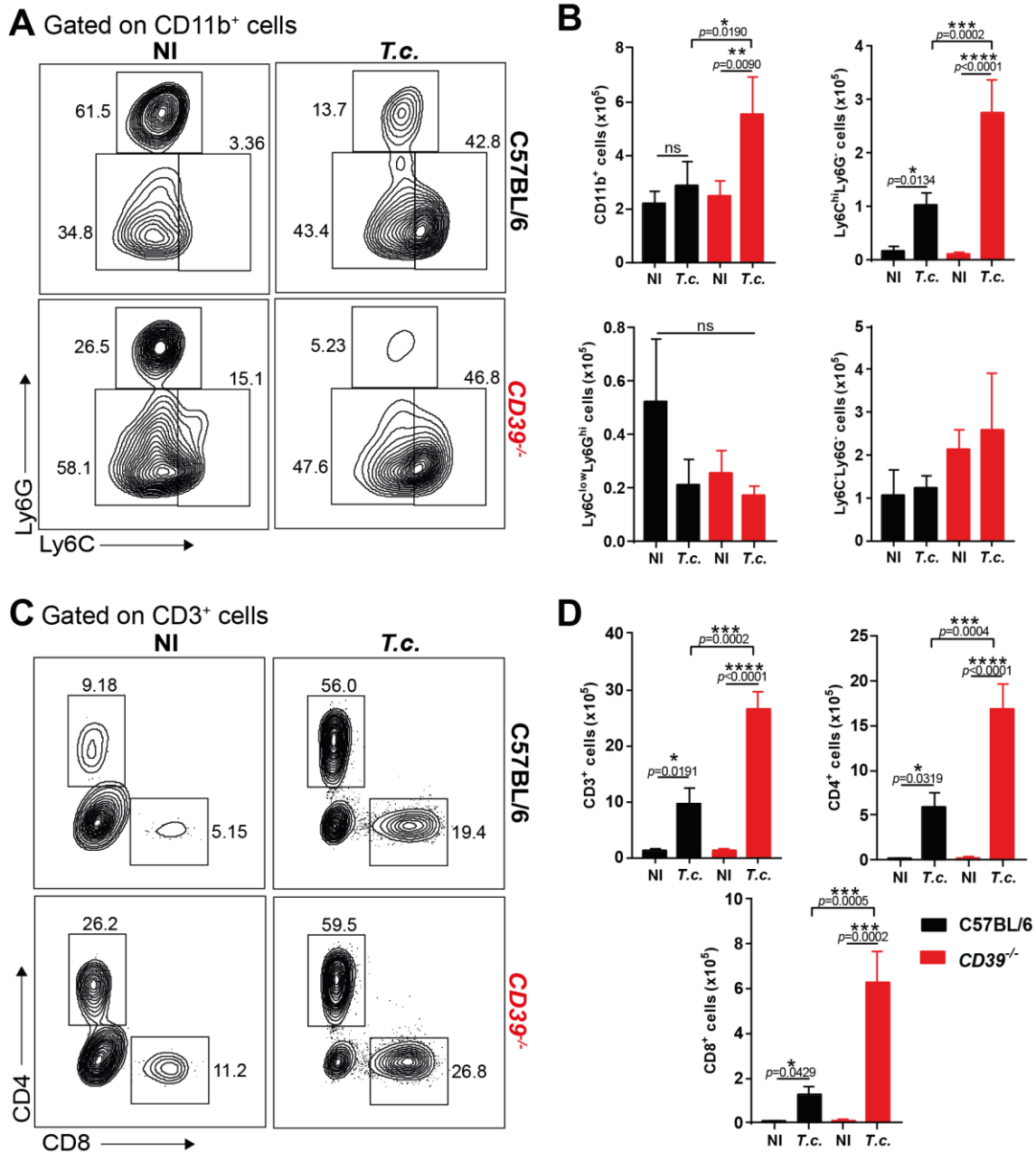


Figura 12. Avaliação de células imunes infiltrantes no coração de animais C57BL/6 e CD39^{-/-} após 10 dias de infecção por *T. cruzi*. Avaliação da frequência (A) e número total de células (B) CD11b⁺, polimorfonucleares Ly6C^{low}Ly6G^{hi}, monócitos Ly6C^{hi}Ly6G⁻ e Ly6C⁻Ly6G⁺. Frequência (C) e número de células (D) CD3⁺, TCD4⁺ e TCD8⁺ no coração de animais não infectados (NI) e infectados (T.c.). Dados expressos por média e desvio padrão. Teste T paramétrico. Teste OneWay ANOVA paramétrico, pós-teste Tukey. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas e ns indicam que não há diferenças estatísticas significativas. * $p < 0,05$.

4.9. Desenvolvimento de modelo animal Mer⁺P2rx7fl^{+/+}

A partir dos resultados observados anteriormente a respeito da expressão de P2X7 em cardiomiócitos e sabendo-se da importância destas células durante a instauração da doença cardíaca na infecção *T. cruzi*, buscou-se desenvolver

um modelo animal Cre-Lox onde P2X7 não estaria presente somente em cardiomiócitos. Para isso, utilizou-se animais MerCreMer, que possuem em seu genoma a sequência de uma recombinase CRE (sob controle do promotor da cadeia alfa de miosina cardíaca), ligada à sequência de um receptor de estrógeno modificado que responde ao tratamento com tamoxifeno, mas não ao estrógeno produzido pelo camundongo (Sohal et al., 2001). Este tipo de construção foi idealizado para promover exclusivamente em cardiomiócitos a excisão de qualquer gene flanqueado por sequências loxP (“floxed”, ou “fl”) após tratamento com a referida droga.

Camundongos MerCreMer (MerCre^{+/+}) foram inicialmente cruzados com camundongos P2rx7fl^{+/+} dando origem a uma geração F1, totalmente heterozigota MerCre^{+/-}P2rx7fl^{+/-}. Após, camundongos da geração F1 foram cruzados entre si, dando origem à geração F2, da qual foram selecionados camundongos que expressam P2rx7fl em homozigose (P2rx7fl^{+/+}) junto a MerCre⁺ (o fato do gene MerCreMer estar localizado em um cromossomo artificial impossibilita distinguir se este está em homozigose ou heterozigose. Entretanto, após o tratamento com tamoxifeno uma única cópia de MerCreMer é capaz de realizar a clivagem dos dois alelos de P2rx7fl para formar casais com animais P2rx7fl^{+/+} (Fig. 13A). Através deste último cruzamento obteve-se uma prole constituída por camundongos MerCre^{-/-}P2rx7fl^{+/+} (P2rx7fl^{+/+}) e MerCre⁺P2rx7fl^{+/+}, sendo estes os grupos experimentais de interesse. Na literatura, o protocolo da administração de tamoxifeno (tmx) varia com doses entre 20 e 80mg/kg (Sohal et al., 2001; Li et al., 2005). Afim de avaliar qual a dose máxima que não resulta na morte dos animais, camundongos MerCre⁺, sensíveis ao tratamento com tmx, foram tratados com doses de 20, 40 e 80 mg/kg de tmx, aplicadas durante cinco dias. Foi observado que camundongos tratados com 40 ou 80mg/kg morreram durante o tratamento, tendo sobrevivido somente animais tratados com 20mg/kg (Fig. 13B). Após a geração dos animais e padronização da concentração de tmx a ser utilizada no tratamento (Fig. 13A-B), avaliou-se a expressão de mRNA para *P2rx7* no coração de animais C57BL/6 e camundongos que albergam o gene P2rx7fl^{+/+}. Na ausência de tratamento com tamoxifeno, os animais P2rx7fl^{+/+} expressam no coração níveis muito inferiores de transcrição do gene *P2rx7* se comparado ao dos camundongos C57BL/6 e

MerCreMer^{+/+} (MerCre^{+/+}) (Fig. 13C). De início, este resultado sugeria que animais P2rx7^{fl+/+} seriam o controle experimental ideal para avaliar se o tratamento com tamoxifeno seria eficaz na deleção do gene P2rx7^{fl} nos animais MerCre⁺P2rx7^{fl+/+}. Para confirmar esta hipótese, animais P2rx7^{fl+/+} e MerCre⁺P2rx7^{fl+/+} foram tratados com 20mg/kg de tmx durante cinco dias e a expressão de *P2rx7* foi avaliada (Fig. 13D). Entretanto, diferente do esperado, não foram encontradas diferenças significativas na expressão de mRNA para *P2rx7* no coração dos animais P2rx7^{fl+/+} e MerCre⁺P2rx7^{fl+/+} tratados com tamoxifeno e ainda, os valores de expressão de P2X7 no coração destes camundongos mostraram-se muito baixos. Contudo, como a análise via rtPCRq não é seletiva, apresentando níveis de P2rx7 no coração inteiro e não só em cardiomiócitos, avaliamos, via citometria de fluxo, a expressão de P2X7 em cardiomiócitos (cTnT⁺) e a comparamos com aquela observada em leucócitos cardíacos (CD45⁺) (Fig. 13E). Uma vez que o modelo de deleção é célula-específica, deveríamos encontrar P2X7 em leucócitos, mas não em cardiomiócitos. Observou-se que células cTnT⁺ de ambos os camundongos tratados com tamoxifeno além de apresentarem MFI inferior àqueles observados em animais C57BL/6 (Fig. 4B-D), não apresentaram diferenças significativas entre si na expressão de P2X7, bem como no número total de células cTnT⁺P2X7⁺ (Fig. 13F). O mesmo foi observado, porém em níveis mais elevados, nas células CD45⁺ (Fig. 13G).

Com isso, chegou-se a conclusão de que o presente modelo de tratamento em animais MerCre⁺P2rx7^{fl+/+} não é funcional, uma vez que, além da expressão de P2X7 e *P2rx7* nos animais P2rx7^{fl+/+} (com ou sem MerCre) ser inferior à observada em animais C57BL/6, o tratamento com tmx não apresentou efetividade no processo de deleção gênica.

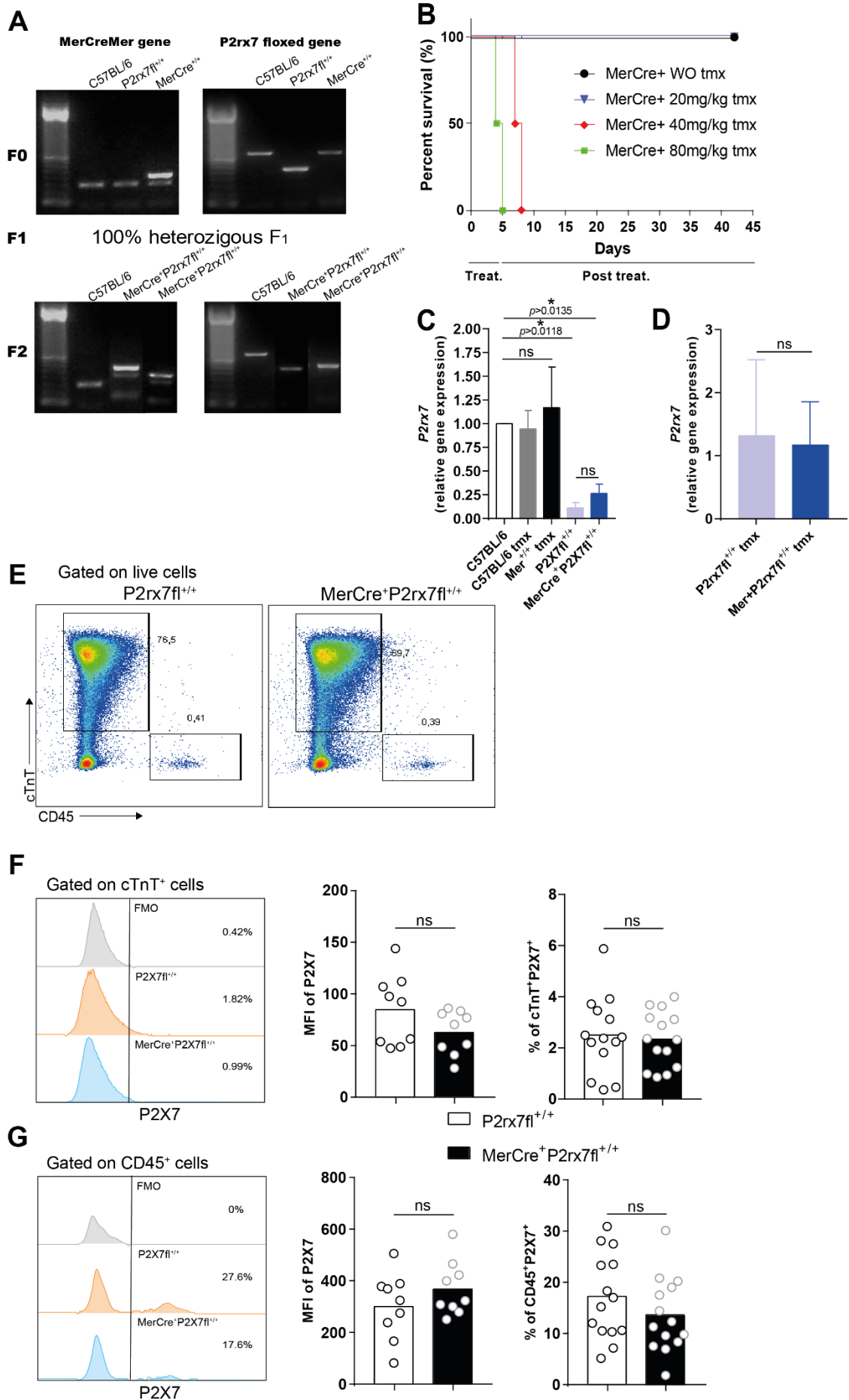


Figura 13. **Expressão de P2X7 em animais MerCre⁺P2rx7fl^{+/+}**. Esquema utilizado para a geração de camundongos MerCre⁺P2rx7fl^{+/+}: Camundongos MerCreMer^{+/+} foram cruzados com camundongos P2rx7fl^{+/+} (F0) dando origem a geração F1, totalmente heterozigota (MerCreMer^{+/-}P2X7fl^{+/-}). Animais F1 foram cruzados entre si, resultando na geração F2, da qual selecionamos os camundongos MerCreMer⁺P2rx7fl^{+/+}, ou seja animais que expressam P2X7fl em homozigose e também expressam Mer (por se tratar de um cromossomo artificial, no gene Mer não é possível distinguir a homo da heterozigose pela genotipagem). Como última etapa, os camundongos MerCreMer⁺P2rx7fl^{+/+} da geração F2 foram cruzados com camundongos P2X7fl^{+/+} para obtermos os camundongos do grupo experimental MerCre⁺P2rx7fl^{+/+} **(A)**. Avaliação da sobrevivência dos animais MerCreMer^{+/+} tratados com tamoxifeno por 5 dias em três diferentes doses, 20, 40 e 80mg/kg **(B)**. Avaliação da expressão relativa de *P2rx7* no coração de animais contendo o gene *P2rx7* (C57BL/6, WT) ou P2rx7fl^{+/+}, determinada pelo $\Delta\Delta CT$ em relação ao gene *housekeeping GAPDH*. Animais P2rx7fl^{+/+} expressam cerca de 20% de transcritos de *P2rx7* quando comparados com animais WT **(C)**. Expressão de *P2rx7* em animais Mer⁺P2rx7^{+/+} e animais P2rx7fl^{+/+} tratados com 20mg/kg de tamoxifeno durante 5 dias **(D)**. Expressão de P2X7 (estimada por citometria de fluxo) em células cTnT⁺ (cardiomiócitos) e CD45⁺ (leucócitos) no coração de animais P2rx7fl^{+/+} e MerCre⁺P2rx7fl^{+/+}, ambos tratados com tamoxifeno **(E, F, G)**. Dados expressos por média e desvio padrão. Teste T paramétrico. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas e ns indicam que não há diferenças estatísticas significativas. **p*<0,05.

5. DISCUSSÃO

O canal iônico P2X7 é amplamente expresso em células imunes, como linfócitos, monócitos, macrófagos, entre outras (Lenertz et al., 2011; Morandini et al., 2014; Dí Virgílio et al., 2017). Esta molécula é encontrada também em células não imunes como células endoteliais e fibroblastos (Harrington e Mitchell, 2004; Ponnussamy et al., 2011), estando envolvida no reconhecimento de ATP (Surprenant et al., 1996), que em condições fisiológicas é encontrado em baixas concentrações no meio extracelular, sendo no coração 40nmol/L (Kuzmin et al., 1998). Nestas condições essa molécula pode agir como transmissor entre células nervosas, endoteliais e musculares do tecido cardíaco (Vassort, 2001). Contudo, durante um processo de injúria e dano tecidual, grandes quantidades de ATP são liberadas no meio extracelular, aumentando a sinalização pelo canal iônico P2X7 e por ectonucleotidases CD39 e CD73, capazes de hidrolisar ATP/ADP em AMP e AMP em adenosina, respectivamente (Savio et al., 2018). Cardiomiócitos expressam P2X7 (Barth et al., 2010; Mazrouei et al., 2015). Entretanto, a expressão de ectonucleotidases CD73 e CD39 é dita como não existente (Bönner et al., 2012). Diferente do demonstrado por Bönner, nossos achados mostraram não só a expressão de P2X7, mas também das ectonucleotidases CD39 e CD73, em cardiomiócitos de animais C57BL/6.

Os cardiomiócitos expressam P2X7 e ectonucleotidases CD39 e CD73 constitutivamente. Barth e colaboradores, demonstraram pela primeira vez em 2010 a presença de P2X7 em cardiomiócitos de camundongos adultos (Barth et al., 2010), indicando que este receptor pode estar envolvido no reconhecimento e sinalização via ATP por estas células. Entretanto, o papel desta molécula em cardiomiócitos ainda não é bem elucidado, uma vez que a quantidade de ATP presente no coração em condições fisiológicas é incapaz de ativar o P2X7 (Kuzmin et al., 1998). O ATP extracelular presente no coração inicialmente exerce efeito cronotrópico e ionotrópico positivo em ação sinérgica a outras moléculas que atuam sobre receptores β adrenérgicos, auxiliando na contração muscular (Mei et al., 2001). Entretanto, a presença prolongada de ATP no coração pode acarretar arritmias pelo desbalanço de Ca^{2+} nas células cardíacas por constante sinalização purinérgica (Gurung et al., 2009). Por outro lado, a adenosina gerada pela degradação do ATP exerce efeito cronotrópico e

ionotrópico negativo nas células ventriculares, auxiliando no controle da contração muscular (Froldi et al., 1994).

Além do papel da adenosina na contração muscular, estudos demonstraram que camundongos transgênicos com alta expressão de CD39, ou com alta expressão de CD39 especificamente no coração, sofrem menos impacto durante o processo de isquemia-reperfusão quando comparados com animais C57BL/6 não transgênicos. Isto se dá pelo aumento da hidrólise de ATP e aumento dos níveis de adenosina, que sinaliza via receptor A_{2B} , capaz de induzir fosforilação de moléculas protetivas ao dano mitocondrial causado durante a injúria cardíaca (Cai et al., 2011; Smith et al., 2017). Com isso, a expressão pelas células cardíacas de moléculas capazes de clivar ATP, sugere desempenhem um papel auxiliar na proteção deste tecido a injúrias.

P2X7 é descrito como ativador celular quando há concentrações de ATP superiores a 1mM (Coutinho-Silva e Persechini, 1997). Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que, em linfócitos T $CD4^+$, esta molécula induz diferenciação de linfócitos Th1 e controla o número de células Th foliculares no baço, auxiliando na proteção de camundongos infectados com *P. chabaudi* (Salles et al., 2017). Entretanto, Amaral e colaboradores demonstraram que a presença desta molécula colabora com a piora da doença durante infecção por cepa virulenta de *M. tuberculosis* (Amaral et al., 2014). Estes dados reforçam a hipótese de que a ação do P2X7 é dependente do microambiente, e principalmente da concentração de ATP extracelular presente no tecido lesado. A respeito disso, Savio e colaboradores mostraram que o estímulo controlado de P2X7 é requerido para a melhora de doenças inflamatórias. Entretanto, o super estímulo deste canal aumenta a morte celular, aumentando o dano tecidual (Savio et al., 2018).

Trabalhos anteriores avaliando o papel de P2X7 na infecção por *T. cruzi* demonstraram que não há diferença na geração de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, bem como nenhuma diferença fenotípica ou na parasitemia de animais *P2rx7^{-/-}* quando comparados com controle C57BL/6 (Cascabulho et al., 2008). Entretanto, nada foi avaliado em relação à patologia cardíaca, ou ao papel do P2X7 nos cardiomiócitos dos animais infectados. Sabe-se que *T. cruzi* induz a

abertura dos canais de panexina 1 (panx1), sendo este importante no processo de invasão *in vitro* de cardiomiócitos. Barría e colaboradores investigaram a indução de panx1, canal que quando aberto aumenta a concentração de ATP extracelular. O aumento de ATP extracelular pode aumentar a concentração de Ca^{2+} intracelular pela ativação de receptor P2Y1, podendo contribuir para a manutenção dos ninhos de amastigotas de *T. cruzi* durante o processo de replicação nos cardiomiócitos (Barría et al., 2018).

Uma vez que a ativação do canal P2X7 por ATP pode gerar moléculas pró-inflamatórias como IL-1b e IL-18, bem como ativar processos de morte celular (Di Virgilio, 2013), a molécula CD39 deveria ser capaz de controlar esse processo pela sua capacidade de hidrolisar ATP em ADP e AMP (Sichardt e Nieber, 2007). Esta enzima, assim como o P2X7, é expressa por diversos tipos celulares, incluindo células imunes (Jacob et al., 2013). Por sua capacidade única de hidrólise e capacidade supressora da adenosina gerada ao sinalizando via receptores A_2 , CD39 tem sido considerada um *checkpoint* imunológico (Tan et al., 2016). O ATP auxilia na polarização de linfócitos Th_1 , ao passo que esta polarização aumenta a secreção de IL-2 e citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ nestas células (Yip et al., 2009). Isto parece ocorrer uma vez que o gradiente de Ca^{2+} gerado na sinalização via receptores P2 auxilia na translocação de NFAT para o núcleo (Jurger et al., 2011). Por outro lado, células T regulatórias (Treg) expressam altas quantidades de CD39, que é capaz de clivar o ATP extracelular, diminuindo a polarização das células Th_1 , levando a diminuição da produção de IL-2 e citocinas pró-inflamatórias (Dwyer et al., 2010). Ainda, com o auxílio de CD73 para a geração de adenosina, as Tregs são capazes de induzir aumento de cAMP no meio intracelular que ativa cascata de produção de IL-10, citocina supressora de linfócitos Th_1 bem como monócitos e macrófagos M1 (Zhao et al., 2017). Em câncer, o uso de bloqueadores de CD39 auxilia na geração de T reativas ao tumor, sendo a resposta imune mais efetiva (Allard et al., 2016). Em nossos resultados, observamos aumento do número de células $CD45^+CD39^+$ em animais infectados por *T. cruzi*, indicando que esta molécula pode estar atuando no controle da resposta cardíaca ao parasito. Ainda, a presença desta molécula em cardiomiócitos, além de auxiliar na replicação e sobrevivência de *T. cruzi*, pode contribuir na regulação negativa de células efetoras contra o parasito.

Como demonstrado por nosso grupo em animais infectados por *P. chabaudi*, a presença de P2X7 pode acarretar melhora na doença, bem como diminuição da parasitemia (Sales et al., 2017). Entretanto, a presença desta molécula durante a infecção por formas graves de *M. tuberculosis* desempenha papel na piora da doença pulmonar (Amaral et al., 2014). Nos resultados aqui descritos, observou-se que, como demonstrado por Cascabulho e colaboradores, a curva de parasitemia de animais *P2rx7^{-/-}* não se diferencia daquela dos animais C57BL/6. Entretanto, ao analisar o coração dos animais *P2rx7^{-/-}* observamos aumento nos transcritos para *T. cruzi*. Diferentemente, o peso do coração e o recrutamento ao tecido cardíaco de leucócitos CD45⁺ não apresentaram diferenças entre os grupos *P2rx7^{-/-}* e C57BL/6 infectados. Nos animais *P2rx7^{-/-}* NI, entretanto, o peso do coração é naturalmente maior que o dos animais C57BL/6 NI (Sarti et al., 2020). Neste trabalho, os autores demonstram que P2X7 é crucial na manutenção da estrutura mitocondrial, uma vez que animais *P2rx7^{-/-}* apresentam mitocôndrias de menor tamanho e problemas na contração quando comparados aos animais C57BL/6. Ainda, as células cardíacas dos animais *P2rx7^{-/-}* podem estar menos reativas ao dano tissular cardíaco causado durante injúrias, como infarto do miocárdio (Yin et al., 2017). Dessa forma, a tendência de aumento encontrada na análise do peso do coração dos animais infectados pode indicar maior severidade na doença cardíaca, aumentando a disfunção e possivelmente a insuficiência cardíaca neste. Ademais, no coração do camundongo *P2rx7^{-/-}* infectado foi observado aumento nos transcritos de mRNA para *IL-10* e *Arg-1*, que codifica arginase 1 (ARG1), assim como da produção de IL-10. Sabe-se que, em macrófagos, o acúmulo de adenosina extracelular, gerada na clivagem de ATP por ectonucleotidases, aumenta os níveis de AMPc intracelular, que atua na ativação da cascata de transcrição de *Arg1* (Zhao et al., 2017; Sheldon et al., 2013). A ARG1 é expressa principalmente por macrófagos reparadores, ou M2, tendo papel crucial no controle de produção de óxido nítrico (NO) nessas células, uma vez que utiliza do mesmo substrato, L-arginina, para a síntese de L-ornitina e poliaminas, envolvidas no crescimento, replicação e diferenciação celular (Latour et al., 2020). Ainda, diversos parasitos como *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii* e *Giardia lamblia*, são capazes de induzir aumento na expressão de ARG1 em macrófagos como mecanismo de evasão da resposta imune via NO (Osorio

et al., 2014; Woods et al., 2013; Maloney et al., 2014). Em adição, Stepin e colaboradores demonstraram que o tratamento de macrófagos murinos *in vitro* com Cruzipaína (proteína abundante em *T. cruzi*) é capaz de induzir polarização M2 e consequente aumento de ARG1 nos macrófagos, auxiliando na replicação do parasito (Stepin et al., 2004). Junto a isto no camundongo *P2rx7^{-/-}* infectado foi observado aumento de transcritos de mRNA para *IL-10*, citocina que classicamente funciona como inibidora da resposta macrofágica, inibindo com isso a produção de citocinas pró inflamatórias por estas células. Ainda, em concordância com esta observação, no camundongo *P2rx7^{-/-}* infectado foi observada diminuição de transcritos para *IFN-γ* e *IL-6*, bem como diminuição da produção de *IFN-γ* e *IL-1β*. *IFN-γ* é uma das citocinas mais importantes na resposta contra o *T. cruzi*, uma vez que ativa macrófagos para produção de moléculas nocivas ao parasito, auxiliando no controle do crescimento do mesmo. A produção de *IL-1β* é também fator importante no controle do crescimento parasitário, uma vez que é produzida pela ativação de inflamassoma NLRP3, o qual é ativado por, entre outros fatores, um sinal de dano, que pode ser induzido por P2X7. A ausência desta citocina no camundongo *P2rx7^{-/-}* infectado indica que provavelmente os macrófagos e outras células produtoras de *IL-1β* estão provavelmente tendo problemas com a ativação. O conjunto destes resultados indica que *T. cruzi* possa estar se beneficiando da ausência de P2X7 nas células presentes no coração durante a infecção. Em suma, a sinalização via P2X7 pode desempenhar papel crucial na polarização de macrófagos.

Acerca da composição de células imunes no tecido cardíaco, não foram encontradas diferenças no número total ou frequência celular. Estes resultados indicam que P2X7 pode não estar envolvido na migração de células imunes para o coração infectado por *T. cruzi* após 10 dias de infecção. Ainda que P2X7 esteja envolvido no processo de migração celular em diferentes tipos de câncer (Giannuzzo et al., 2015; Ji et al., 2018; Park et al., 2019), outros receptores purinérgicos, sinalizados por ATP, como P2Y2 e P2X4, estão estritamente envolvidos no processo de migração celular para um tecido lesado. Muller e colaboradores demonstraram que P2Y2 medeia a migração de células dendríticas e eosinófilos durante inflamação pulmonar alérgica. Os autores mostraram que animais deficientes de P2Y2 reduzem a produção de ROS e a

liberação do conteúdo dos grânulos de eosinófilos, e consequente patogênia asmática (Müller et al., 2010). Ledderose demonstrou em 2018 que a ativação de linfócitos e consequente aumento de ATP intracelular leva a extravasamento de ATP para o meio extracelular, podendo atuar de forma autócrina na ativação de P2X4 nestas células (Ledderose et al., 2018). Desta forma, P2X7 pode estar envolvido na ativação celular, principalmente de células mieloides e estruturais, mas não na migração para o coração infectado, uma vez que não há diferença no número de células mieloides e linfoides na análise por citometria de fluxo.

A expressão de CD39 é dada como regulador de ativação celular, e considerada um *check point* imunológico (Tan et al., 2016). Devido a este fato, a ausência desta molécula pode levar a um processo inflamatório exacerbado, uma vez que o mecanismo de supressão via CD39 em células Treg não estaria funcional (Dwyer et al., 2010). Desta forma, no camundongo *CD39^{-/-}*, o acúmulo de ATP extracelular no tecido lesado corrobora para a ativação de células T efectoras (Jurger et al., 2011). O aumento nos transcritos de *IFN-γ* observados no coração destes animais pode ser explicado pela ativação e infiltração de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no tecido cardíaco. Além disso, nos camundongos *CD39^{-/-}* infectados foi observado aumento nos transcritos de *IL-6* e *iNOS*, indicando que monócitos e macrófagos infiltrantes no tecido cardíaco podem estar ativados em perfil M1, ou pró-inflamatório. Entretanto, o grande número de células CD45⁺ bem como aumento de transcritos inflamatórios, caracterizando inflamação exacerbada no coração de animais *CD39^{-/-}*, não impacta na redução da parasitemia sanguínea e transcritos de *T. cruzi* no coração desses animais quando comparados com animais C57BL/6 infectados. Os resultados observados indicam que a resposta exacerbada gerada na ausência de CD39 no coração de animais *CD39^{-/-}* pode ser a consequência do aumento da parasitemia e dos transcritos para *T. cruzi* no tecido cardíaco. Por outro lado, algum mecanismo da CD39 ainda não descrito pode auxiliar na proteção dos animais C57BL/6 à infecção por *T. cruzi*. Desta forma, o aumento da replicação parasitária pela susceptibilidade dos animais *CD39^{-/-}* desencadearia uma resposta imune exacerbada nos tecidos infectados, como o tecido cardíaco.

Junto ao aumento da inflamação, o maior número de células CD11b⁺ e CD3⁺ indica que a sinalização via ATP para migração de células imunes para o

coração pode estar aumentada nos animais *CD39*^{-/-} quando comparados com C57BL/6 infectados. Como dito anteriormente, receptores como P2Y2 estão envolvidos na migração de granulócitos e células dendríticas para o pulmão de camundongos asmáticos, o que leva a piora da doença (Müller et al., 2010). Ainda, via P2X4, células T CD4⁺ migram para o tecido inflamado (Ledderose et al., 2018). Em ambas as situações o ATP atua como quimio-atrativo nas células alvo. Desta forma, a não degradação do ATP extracelular em animais *CD39*^{-/-} pode estar atuando de forma sistêmica, recrutando células não só para o coração, mas também para outros tecidos e órgãos infectados pelo *T. cruzi*. Entretanto, o aumento da inflamação cardíaca nos camundongos *CD39*^{-/-}, assim como o aumento no número de células CD11b⁺ e CD3⁺ que infiltram este órgão, poderiam ser simplesmente o reflexo da maior carga parasitária sistêmica nestes animais.

A nossa tentativa de utilizar um camundongo com deficiência seletiva de P2X7 nos cardiomiócitos não foi bem-sucedido como consequência de problemas técnicos. Assim, o modelo de tratamento proposto para geração de animais MerCre⁺P2rx7fl^{+/+} não apresentou funcionalidade, uma vez que, além da expressão de P2X7 e *P2rx7* nos cardiomiócitos dos animais P2rx7fl^{+/+} (com ou sem MerCre) ser muito inferior à observada em animais C57BL/6, o tratamento com tmx não se mostrou efetivo no processo de deleção gênica. Desta forma, tornando inviável o estudo do P2X7 exclusivamente em cardiomiócitos.

6. CONCLUSÕES

No coração do camundongo infectado pelo *T. cruzi*, tanto os cardiomiócitos como os leucócitos infiltrantes expressam as moléculas P2X7, CD73 e CD39 na sua superfície.

Os camundongos *P2rx7^{-/-}* não apresentaram grandes diferenças na parasitemia, mas apresentaram aumento de transcritos de *T. cruzi* no tecido cardíaco quando comparados com animais C57BL/6.

A ausência de P2X7 compromete parcialmente o controle local do *T. cruzi* pelos monócitos e macrófagos que infiltram o coração infectado. Isto é sugerido pelo ambiente menos inflamatório presente no dia 10 p.i. no coração dos animais *P2rx7^{-/-}* infectados, com aumento dos transcritos de *Arg1* e *IL-10*, diminuição dos transcritos das citocinas pró-inflamatórias *IFN-γ* e *IL-6*, e dos transcritos de *iNOS*, quando comparado com o perfil dos animais C57BL/6 infectados.

O coração dos animais *CD39^{-/-}* apresentou um fenótipo muito diferente daquele observado em animais C57BL/6, com aumento de leucócitos infiltrantes e aumento de transcritos inflamatórios, um conjunto de resultados que indica um processo de inflamação exacerbada.

Contudo, a resposta imune exacerbada no coração dos animais *CD39^{-/-}* infectado não consegue levar a uma diminuição dos transcritos para *T. cruzi* (quando comparados aos animais C57BL/6). Porém, o fato dos camundongos *CD39^{-/-}* mostrarem parasitemia mais elevada que os camundongos C57BL/6, nos impede concluir se a resposta imune cardíaca destes animais apresenta algum problema que contribui à permanência local do parasita.

De qualquer forma, acreditamos que ambos o P2X7 e CD39 exerçam papel importante na progressão da doença cardíaca aguda, e eventualmente, impactar na fase crônica, um quadro normalmente ausente no camundongo C57BL/6 infectado pelo *T. cruzi* da cepa Y.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- <https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas>
- Martins-Melo, F. R., Alencar, C. H., Ramos Jr, A. N., & Heukelbach, J. (2012). Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999–2007. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(2), e1508.
- Barbosa MP, Carmo AA, Rocha MO, Ribeiro AL. Ventricular arrhythmias in Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015 Jan-Feb;48(1):4-10. doi: 10.1590/0037-8682-0003-2014. Epub 2015 Feb 13. PMID: 25714933.
- https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html
- Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D. C., Melo, M. B., Ropert, C., Rodrigues, M. M., & Gazzinelli, R. T. (2010). The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert reviews in molecular medicine*, 12.
- Rodrigues, M. M., Oliveira, A. C., & Bellio, M. (2012). The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *Journal of Parasitology Research*, 2012.
- Machado, F. S., Dutra, W. O., Esper, L., Gollob, K. J., Teixeira, M. M., Factor, S. M., ... & Garg, N. J. (2012, November). Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 34, No. 6, pp. 753-770). Springer-Verlag.
- Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., & Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 115(9), 1109-1123.
- World Health Organization. (2012). *Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis*. World Health Organization.
- Marinho, C. R., Bucci, D. Z., Dagli, M. L. Z., Bastos, K. R., Grisotto, M. G., Sardinha, L. R., ... & Alvarez, J. M. (2004). Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. *Infection and Immunity*, 72(4), 2350-2357.
- Cunha-Neto, E., Duranti, M., Gruber, A., Zingales, B., De Messias, I., Stolf, N., ... & Kalil, J. (1995). Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3541-3545.
- Biolo, A., Ribeiro, A. L., & Clausell, N. (2010). Chagas cardiomyopathy—where do we stand after a hundred years?. *Progress in cardiovascular diseases*, 52(4), 300-316.
- Rassi, A., & de Rezende, J. M. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics*, 26(2), 275-291.
- Jones, E. M., Colley, D. G., Tostes, S., Lopes, E. R., Vnencak-Jones, C. L., & McCurley, T. L. (1993). Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 48(3), 348-357.
- Tarleton, R. L. (2001). Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 550-554.
- Abrahamsohn, I. A. (1998). Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(1), 117-121.
- Marinho, C. R. F., Nuñez-Apaza, L. N., Martins-Santos, R., Bastos, K. R. B., Bombeiro, A. L., Bucci, D. Z., ... & Alvarez, J. M. (2007). IFN- γ , But Not Nitric Oxide or Specific IgG, is Essential for the In vivo Control of Low-virulence Sylvio

- X10/4 *Trypanosoma cruzi* Parasites. *Scandinavian journal of immunology*, 66(2-3), 297-308.
- Marinho, C. R., Nunez-Apaza, L. N., Bortoluci, K. R., Bombeiro, A. L., Bucci, D. Z., Grisotto, M. G., ... & Alvarez, J. M. (2009). Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. *Microbes and Infection*, 11(13), 1037-1045.
 - Machado, F. S., Martins, G. A., Aliberti, J. C., Mestriner, F. L., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2000). *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, 102(24), 3003-3008.
 - dos Santos Goldenberg, R. C., Iacobas, D. A., Iacobas, S., Rocha, L. L., de Azevedo Fortes, F. D. S., Vairo, L., ... & Spray, D. C. (2009). Transcriptomic alterations in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microbes and Infection*, 11(14-15), 1140-1149.
 - Santana, D. Y., Salgado, R. M., Fevereiro, M., do Nascimento, R. S., Fonseca, R., Câmara, N. O. S., ... & Álvarez, J. M. (2018). MyD88 activation in cardiomyocytes contributes to the heart immune response to acute *Trypanosoma cruzi* infection with no effect on local parasite control. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(8), e0006617.
 - Barth, K., Pflieger, C., Linge, A., Sim, J. A., Surprenant, A., Steinbronn, N., ... & Kasper, M. (2010). Increased P2X7R expression in atrial cardiomyocytes of caveolin-1 deficient mice. *Histochemistry and cell biology*, 134(1), 31-38.
 - Joyce, C. M., & Steitz, T. A. (1995). Polymerase structures and function: variations on a theme?. *Journal of Bacteriology*, 177(22), 6321.
 - Beuning, P. J., & Musier-Forsyth, K. (2000). Hydrolytic editing by a class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8916-8920.
 - Larsson, M., Sawada, K., Morland, C., Hiasa, M., Ormel, L., Moriyama, Y., & Gundersen, V. (2012). Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cerebral Cortex*, 22(5), 1203-1214.
 - Seminario-Vidal, L., Kreda, S., Jones, L., O'Neal, W., Trejo, J., Boucher, R. C., & Lazarowski, E. R. (2009). Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of rho-and Ca²⁺-dependent signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20638-20648.
 - Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *Journal of theoretical biology*, 62(2), 491-503.
 - Burnstock, G. A. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormone: A Multidisciplinary Approach*, 107-118.
 - Dubyak, G. R. (2007). Go it alone no more—P2X7 joins the society of heteromeric ATP-gated receptor channels. *Molecular pharmacology*, 72(6), 1402-1405.
 - Pflieger, C., Ebeling, G., Bläsche, R., Patton, M., Patel, H. H., Kasper, M., & Barth, K. (2012). Detection of caveolin-3/caveolin-1/P2X7R complexes in mice atrial cardiomyocytes in vivo and in vitro. *Histochemistry and cell biology*, 138(2), 231-241.
 - Mazzola, A., Amoroso, E., Beltrami, E., Lecca, D., Ferrario, S., Cosentino, S., ... & Abbracchio, M. P. (2008). Opposite effects of uracil and adenine nucleotides on the survival of murine cardiomyocytes. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(2), 522-536.
 - Cosentino, S., Banfi, C., Burbiel, J. C., Luo, H., Tremoli, E., & Abbracchio, M. P. (2012). Cardiomyocyte death induced by ischaemic/hypoxic stress is differentially affected by distinct purinergic P2 receptors. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(5), 1074-1084.

- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., & Falzoni, S. (2017). The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity*, *47*(1), 15-31.
- Boyce, A. K., & Swayne, L. A. (2017). P2X7 receptor cross-talk regulates ATP-induced pannexin 1 internalization. *Biochemical Journal*, *474*(13), 2133-2144.
- Savio, L. E., de Andrade Mello, P., da Silva, C. G., & Coutinho-Silva, R. (2018). The P2X7 receptor in inflammatory diseases: angel or demon?. *Frontiers in pharmacology*, *9*, 52.
- Zhang, J., Liu, D., Zhang, M., & Zhang, Y. (2019). Programmed necrosis in cardiomyocytes: mitochondria, death receptors and beyond. *British journal of pharmacology*, *176*(22), 4319-4339.
- Ryg-Cornejo, V., Ioannidis, L. J., Ly, A., Chiu, C. Y., Tellier, J., Hill, D. L., ... & Kallies, A. (2016). Severe malaria infections impair germinal center responses by inhibiting T follicular helper cell differentiation. *Cell reports*, *14*(1), 68-81.
- de Salles, É. M., de Menezes, M. N., Siqueira, R., da Silva, H. B., Amaral, E. P., Castillo-Méndez, S. I., ... & Tadokoro, C. E. (2017). P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. *PLoS pathogens*, *13*(8), e1006595.
- Amaral, E. P., Ribeiro, S. C., Lanes, V. R., Almeida, F. M., de Andrade, M. R., Bomfim, C. C. B., ... & Alvarez, J. M. (2014). Pulmonary infection with hypervirulent *Mycobacteria* reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS Pathog*, *10*(7), e1004188.
- Mantuano-Barradas, M., Henriques-Pons, A., Araújo-Jorge, T. C., Di Virgilio, F., Coutinho-Silva, R., & Persechini, P. M. (2003). Extracellular ATP induces cell death in CD4+/CD8+ double-positive thymocytes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*, *5*(15), 1363-1371.
- Cascabulho, C. M., Menna-Barreto, R. F. S., Coutinho-Silva, R., Persechini, P. M., & Henriques-Pons, A. (2008). P2X 7 modulatory web in *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology research*, *103*(4), 829-838.
- Meuser-Batista, M., Corrêa, J. R., Carvalho, V. F., de Carvalho, C. F. D. P., da Cruz Moreira, O., Batista, M. M., ... & Silva, R. C. (2011). Mast cell function and death in *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of pathology*, *179*(4), 1894-1904.
- Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, *2*, 2398212818817494.
- Antonioli, L., Fornai, M., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2019). Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much. *Immunology letters*, *205*, 9-15.
- Sek, K., Mølck, C., Stewart, G. D., Kats, L., Darcy, P. K., & Beavis, P. A. (2018). Targeting adenosine receptor signaling in cancer immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12), 3837.
- Amaral, E. P., Machado de Salles, É., Barbosa Bomfim, C. C., Salgado, R. M., Almeida, F. M., de Souza, P. C., ... & D'Império-Lima, M. R. (2019). Inhibiting adenosine receptor signaling promotes accumulation of effector CD4+ T cells in the lung parenchyma during severe tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, *219*(6), 964-974.
- Ponce, N. E., Sanmarco, L. M., Eberhardt, N., García, M. C., Rivarola, H. W., Cano, R. C., & Aoki, M. P. (2016). CD73 inhibition shifts cardiac macrophage polarization toward a microbicidal phenotype and ameliorates the outcome of experimental Chagas cardiomyopathy. *The Journal of Immunology*, *197*(3), 814-823.
- Sohal, D. S., Nghiem, M., Crackower, M. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Tymitz, K. M., ... & Molkenstin, J. D. (2001). Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circulation research*, *89*(1), 20-25.

- Lenertz, L. Y., Gavala, M. L., Zhu, Y., & Bertics, P. J. (2011). Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions. *Immunologic research*, 50(1), 22-38.
- Morandini, A. C., Savio, L. E., & Coutinho-Silva, R. (2014). The role of P2X7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. *Biomed J*, 37(4), 169-77.
- Harrington, L. S., & Mitchell, J. A. (2004). Novel role for P2X receptor activation in endothelium-dependent vasodilation. *British journal of pharmacology*, 143(5), 611-617.
- Ponnusamy, M., Ma, L., Gong, R., Pang, M., Chin, Y. E., & Zhuang, S. (2011). P2X7 receptors mediate deleterious renal epithelial-fibroblast cross talk. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 300(1), F62-F70.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., & Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 272(5262), 735-738.
- Kuzmin, A. I., Lakomkin, V. L., Kapelko, V. I., & Vassort, G. (1998). Interstitial ATP level and degradation in control and postmyocardial infarcted rats. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 275(3), C766-C771.
- Vassort, G. (2001). Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purineric agonist in the myocardium. *Physiological reviews*, 81(2), 767-806.
- Mazrouei, S., Sharifpanah, F., Bekhite, M. M., Figulla, H. R., Sauer, H., & Wartenberg, M. (2015). Cardiomyogenesis of embryonic stem cells upon purineric receptor activation by ADP and ATP. *Purineric signalling*, 11(4), 491-506.
- Bönner, F., Borg, N., Burghoff, S., & Schrader, J. (2012). Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. *PLoS one*, 7(4), e34730.
- Mei, Q., & Liang, B. T. (2001). P2 purineric receptor activation enhances cardiac contractility in isolated rat and mouse hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 281(1), H334-H341.
- Gurung, I. S., Kalin, A., Grace, A. A., & Huang, C. L. H. (2009). Activation of purineric receptors by ATP induces ventricular tachycardia by membrane depolarization and modifications of Ca²⁺ homeostasis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 47(5), 622-633.
- Frolidi, G., Pandolfo, L., Chinellato, A., Ragazzi, E., Caparrotta, L., & Fassina, G. (1994). Dual effect of ATP and UTP on rat atria: which types of receptors are involved?. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 349(4), 381-386.
- Cai, M., Huttinger, Z. M., He, H., Zhang, W., Li, F., Goodman, L. A., ... & He, G. (2011). Transgenic over expression of ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolase-1 protects against murine myocardial ischemic injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 51(6), 927-935.
- Smith, S. B., Xu, Z., Novitskaya, T., Zhang, B., Chepurko, E., Pu, X. A., ... & Gumina, R. J. (2017). Impact of cardiac-specific expression of CD39 on myocardial infarct size in mice. *Life sciences*, 179, 54-59.
- Fowler, B. J., Gelfand, B. D., Kim, Y., Kerur, N., Tarallo, V., Hirano, Y., ... & Pittman, K. (2014). Nucleoside reverse transcriptase inhibitors possess intrinsic anti-inflammatory activity. *Science*, 346(6212), 1000-1003.
- Riteau, N., Gasse, P., Fauconnier, L., Gombault, A., Couegnat, M., Fick, L., ... & Ryffel, B. (2010). Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(6), 774-783.

- Mortaz, E., Adcock, I. M., Shafei, H., Masjedi, M. R., & Folkerts, G. (2012). Role of P2X7 receptors in release of IL-1 β : a possible mediator of pulmonary inflammation. *Tanaffos*, 11(2), 6.
- Yip, L., Woehrle, T., Corriden, R., Hirsh, M., Chen, Y., Inoue, Y., ... & Junger, W. G. (2009). Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *The FASEB Journal*, 23(6), 1685-1693.
- Coutinho-Silva, R., & Persechini, P. M. (1997). P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 273(6), C1793-C1800.
- Barría, I., Güiza, J., Cifuentes, F., Zamorano, P., Sáez, J. C., González, J., & Vega, J. L. (2018). Trypanosoma cruzi infection induces pannexin-1 channel opening in cardiac myocytes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(1), 105-112.
- Di Virgilio, F. (2013). The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. *Pharmacological reviews*, 65(3), 872-905.
- Sichardt, K., & Nieber, K. (2007). Adenosine A 1 receptor: Functional receptor-receptor interactions in the brain. *Purinergic Signalling*, 3(4), 285-298.
- Tan, D. B., Ong, N. E., Zimmermann, M., Price, P., & Moodley, Y. P. (2016). An evaluation of CD39 as a novel immunoregulatory mechanism invoked by COPD. *Human Immunology*, 77(10), 916-920.
- Junger, W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology*, 11(3), 201-212.
- Dwyer, K. M., Hanidziar, D., Putheti, P., Hill, P. A., Pommey, S., McRae, J. L., ... & Gao, W. (2010). Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *American Journal of Transplantation*, 10(11), 2410-2420.
- Zhao, H., Bo, C., Kang, Y., & Li, H. (2017). What else can CD39 tell us?. *Frontiers in immunology*, 8, 727.
- Allard, B., Beavis, P. A., Darcy, P. K., & Stagg, J. (2016). Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Current opinion in pharmacology*, 29, 7-16.
- Li, J., Patel, V. V., Kostetskii, I., Xiong, Y., Chu, A. F., Jacobson, J. T., ... & Radice, G. L. (2005). Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circulation research*, 97(5), 474-481.
- Sarti, A. C., Vultaggio-Poma, V., Falzoni, S., Missiroli, S., Giuliani, A. L., Boldrini, P., ... & Solini, A. (2020). The P2X7 receptor localizes to the mitochondria, modulates mitochondrial energy metabolism and enhances physical performance. *bioRxiv*.
- Yin, J., Wang, Y., Hu, H., Li, X., Xue, M., Cheng, W., ... & Yan, S. (2017). P2X7 receptor inhibition attenuated sympathetic nerve sprouting after myocardial infarction via the NLRP3/IL-1 β pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(11), 2695-2710.
- Sheldon, K. E., Shandilya, H., Kepka-Lenhart, D., Poljakovic, M., Ghosh, A., & Morris, S. M. (2013). Shaping the murine macrophage phenotype: IL-4 and cyclic AMP synergistically activate the arginase I promoter. *The Journal of Immunology*, 191(5), 2290-2298.
- Latour, Y. L., Gobert, A. P., & Wilson, K. T. (2020). The role of polyamines in the regulation of macrophage polarization and function. *Amino Acids*, 52(2), 151-160.
- Osorio, E. Y., Travi, B. L., da Cruz, A. M., Saldarriaga, O. A., Medina, A. A., & Melby, P. C. (2014). Growth factor and Th2 cytokine signaling pathways converge at STAT6 to promote arginase expression in progressive experimental visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog*, 10(6), e1004165.

- Woods, S., Schroeder, J., McGachy, H. A., Plevin, R., Roberts, C. W., & Alexander, J. (2013). MAP kinase phosphatase-2 plays a key role in the control of infection with *Toxoplasma gondii* by modulating iNOS and arginase-1 activities in mice. *PLoS Pathog*, 9(8), e1003535.
- Maloney, J., Keselman, A., Li, E., & Singer, S. M. (2015). Macrophages expressing arginase 1 and nitric oxide synthase 2 accumulate in the small intestine during *Giardia lamblia* infection. *Microbes and infection*, 17(6), 462-467.
- Stempin, C. C., Tanos, T. B., Coso, O. A., & Cerbán, F. M. (2004). Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *European journal of immunology*, 34(1), 200-209.
- Shieh, C. H., Heinrich, A., Serchov, T., van Calker, D., & Biber, K. (2014). P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF- α in cultured mouse microglia. *Glia*, 62(4), 592-607.
- Solini, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Fellin, R., & Di Virgilio, F. (1999). Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *Journal of cell science*, 112(3), 297-305.
- Sanmarco, L. M., Ponce, N. E., Visconti, L. M., Eberhardt, N., Theumer, M. G., Minguez, Á. R., & Aoki, M. P. (2017). IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(4), 857-869.
- Giannuzzo, A., Pedersen, S. F., & Novak, I. (2015). The P2X7 receptor regulates cell survival, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Molecular cancer*, 14(1), 1-15.
- Ji, Z., Xie, Y., Guan, Y., Zhang, Y., Cho, K. S., Ji, M., & You, Y. (2018). Involvement of P2X7 receptor in proliferation and migration of human glioma cells. *BioMed research international*, 2018.
- Park, M., Kim, J., Phuong, N. T., Park, J. G., Park, J. H., Kim, Y. C., ... & Kang, K. W. (2019). Involvement of the P2X7 receptor in the migration and metastasis of tamoxifen-resistant breast cancer: effects on small extracellular vesicles production. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
- Müller, T., Robaye, B., Vieira, R. P., Ferrari, D., Grimm, M., Jakob, T., ... & Idzko, M. (2010). The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy*, 65(12), 1545-1553.
- Ledderose, C., Liu, K., Kondo, Y., Slubowski, C. J., Dertnig, T., Denicoló, S., ... & Lederer, J. A. (2018). Purinergic P2X4 receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration. *The Journal of clinical investigation*, 128(8), 3583-3594.