

**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."



Prof.a. 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<sup>a</sup>. 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 Luisa Morais Barreto, 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 hidrolisar 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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<sup>+</sup> no coração dos animais *CD39*<sup>-/-</sup> infectados, bem como de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, assim como de

monócitos inflamatórios Ly6C<sup>hi</sup>Ly6G<sup>-</sup> 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 exacerbação de 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 one of the causes of acute myocarditis 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*<sup>-/-</sup> 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* of *T. cruzi* satellite DNA 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*<sup>-/-</sup> animals. Furthermore, in the protein analysis, the heart of *T. cruzi*-infected *P2rx7*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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<sup>+</sup> cells was found in the heart of *CD39*<sup>-/-</sup> infected animals, as well as increases in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, and in Ly6C<sup>hi</sup>Ly6G<sup>-</sup> 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<br>DE CÉLULAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. ....   | 26 |
| FIGURA 4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P2X7 E DAS ECTONUCLEOTIDASES<br>CD39 E CD73 EM CARDIOMIÓCITOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6<br>ADULTOS.....  | 30 |
| FIGURA 5. CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO E EXPRESSÃO<br>DE P2X7, CD39 E CD73 NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6<br>INFECTADOS POR <i>T. CRUZI</i> . ....                            | 32 |
| FIGURA 6. AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E TRANSCRITOS<br>INFLAMATÓRIOS NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E <i>P2X7</i> <sup>-/-</sup><br>APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i> .....  | 34 |
| FIGURA 7. PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO CORAÇÃO DE ANIMAIS<br>INFECTADOS POR <i>T. CRUZI</i> . ....  | 36 |
| FIGURA 8. AVALIAÇÃO DE CÉLULAS IMUNES INFILTRANTES NO CORAÇÃO DE<br>ANIMAIS C57BL/6 E <i>P2X7</i> <sup>-/-</sup> APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i> .....                           | 38 |
| FIGURA 9. PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS NO CORAÇÃO DE ANIMAIS<br><i>P2RX7</i> <sup>-/-</sup> APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO COM <i>T. CRUZI</i> .....  | 40 |
| FIGURA 10. PERFIL DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS NO CORAÇÃO DE ANIMAIS<br><i>P2RX7</i> <sup>-/-</sup> APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO COM <i>T. CRUZI</i> .....   | 42 |
| FIGURA 11. AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E TRANSCRITOS<br>INFLAMATÓRIOS NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E <i>CD39</i> <sup>-/-</sup><br>APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i> ..... | 44 |
| FIGURA 12. AVALIAÇÃO DE CÉLULAS IMUNES INFILTRANTES NO CORAÇÃO DE<br>ANIMAIS C57BL/6 E <i>CD39</i> <sup>-/-</sup> APÓS 10 DIAS DE INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i> . ....                         | 46 |
| FIGURA 13. EXPRESSÃO DE P2X7 EM ANIMAIS MERCRE <sup>+</sup> P2RX7FL <sup>+/+</sup> . ....   | 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 ecotnucleotidasas, 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 <sup>+</sup> P2rx7fl <sup>+/+</sup> .....  | 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 .....  | 24 |
| 3.8. Análise por citometria de fluxo .....  | 25 |
| 3.9. Análise de bioplex .....   | 25 |
| 3.10. Estratégia de análise por citometria de fluxo .....   | 25 |
| 3.11. Análise estatística .....   | 26 |
| 4. RESULTADOS .....   | 28 |
| 4.1. Avaliação da expressão de P2X7 e ectonucleotidasas 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 <sup>-/-</sup> após 10 dias de infecção por <i>T. cruzi</i> .....        | 33 |
| 4.4. Produção de citocinas no coração de animais P2rx7 <sup>-/-</sup> após 10 dias de infecção com <i>T. cruzi</i> . <b>Erro! Indicador não definido.</b> |    |
| 4.5. Avaliação do infiltrado inflamatório no coração de animais P2rx7 <sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup></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<sup>-/-</sup></i> após 10 dias de infecção por <i>T. cruzi</i> ..... | 43 |
| 4.8. | Avaliação do infiltrado inflamatório no coração de animais <i>CD39<sup>-/-</sup></i> após 10 dias de infecção por <i>T. cruzi</i> .....            | 45 |
| 4.9. | Desenvolvimento de modelo animal <i>Mer<sup>+</sup>P2rx7fl<sup>+/+</sup></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).

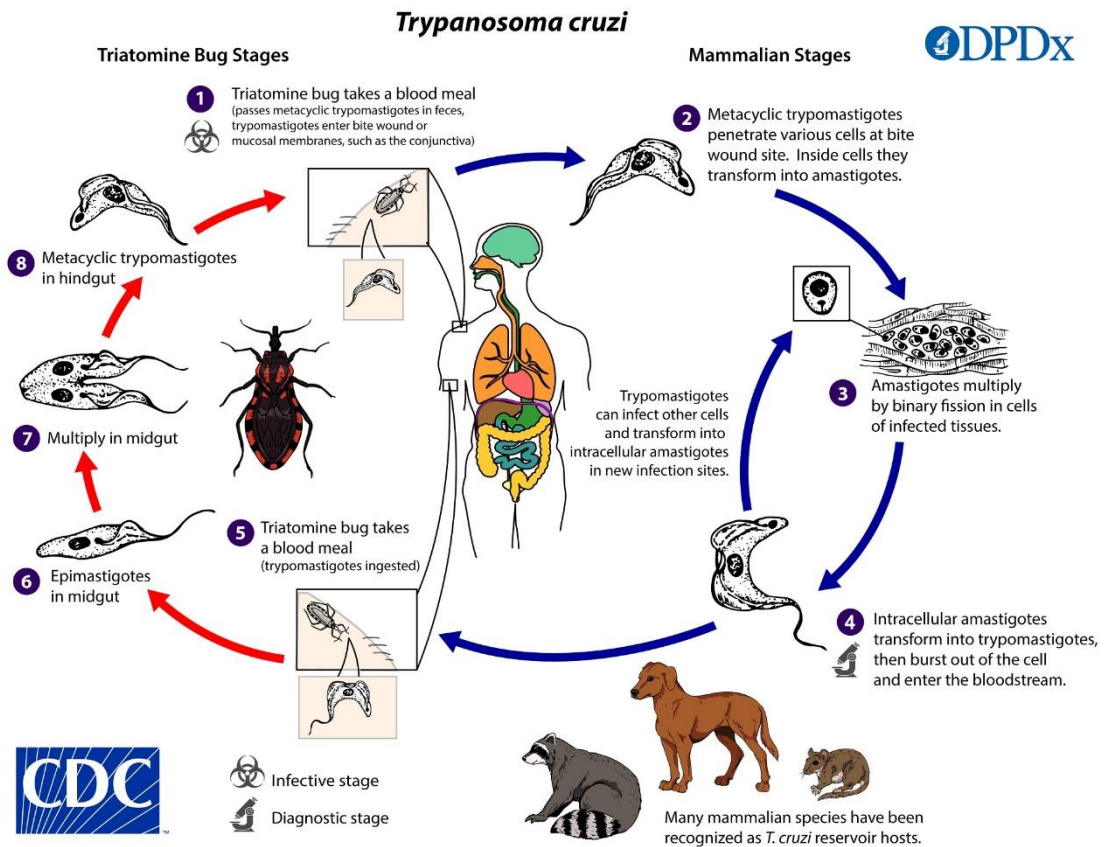
A transmissão do agente é mediada principalmente por insetos da subfamília Triatominae (Reduviidae), os quais são os vetores do parasito. O parasito, que se encontra e replica no intestino do inseto, pode infectar um mamífero após a picada do inseto hematófago. Isto porque o inseto libera o parasito 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. *T. cruzi* apresenta, basicamente, quatro estágios de vida, sendo: epimastigota, trypomastigota metacíclico, amastigota e trypomastigota. A fase epimastigota é uma fase de replicação no intestino do inseto vetor, isto é, antes da infecção. Ainda no intestino do inseto vetor, *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, 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 e rompem a célula infectada, podendo infectar novas células e eventualmente voltarem ao intestino do inseto vetor, após a sucção sanguínea do hospedeiro (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- $\alpha$ . A IL-12 induz polarização de Linfócitos CD4<sup>+</sup> Th<sub>0</sub> para Th<sub>1</sub> e ativam células *natural killer* (NK), sendo duas das principais células produtoras de IFN- $\gamma$  (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- $\gamma$  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<sup>+</sup> *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<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> otimizam a atividade tripanocida dos macrófagos através da produção de IFN- $\gamma$  (Marinho et al., 2009).

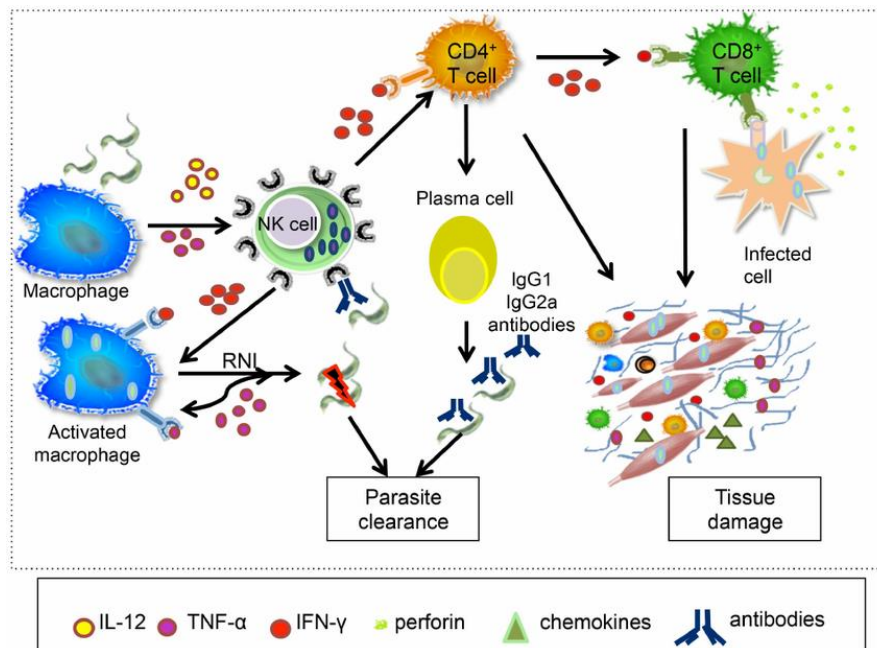


Figura 2. **Resposta imune ao *T. cruzi*.** A resposta imune contra o parasito se dá inicialmente pela imunidade inata, com ativação de macrófagos e células NK que são capazes de reconhecer padrões de patógenos (PAMPs) do parasito e responder ao mesmo com produção de citocinas como IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , bem como moléculas efetoras como espécies reativas de nitrogênio (RNI), que auxiliam no controle 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<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, assim como linfócitos B que diferenciam em células plasmáticas. A ativação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> auxiliam na polarização de macrófagos mais microbicidas, capazes de controlar o crescimento parasitário. Junto a isto, células T CD8<sup>+</sup> 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 nucléicos (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 ectonucleotidases 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 $\beta$ , IL-18 e outras citocinas via ativação do fator de transcrição *NFkB*, 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 tem 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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 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<sup>-/-</sup>* 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, 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<sub>A</sub>, A2<sub>B</sub> 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<sup>+</sup>, bem como produção de IFN- $\gamma$  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 promovem 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<sup>-/-</sup>*;
- Avaliar a ativação de células imunes no coração de animais *P2rx7<sup>-/-</sup>* 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<sup>-/-</sup>*.

### **3. METODOLOGIA**



## **4. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos sugerem que ainda que há um aumento significativo de leucócitos infiltrando o tecido cardíaco de animais C57BL/6 após 10 dias de infecção por *T. cruzi* cepa Y.

Animais *P2rx7<sup>-/-</sup>* não apresentaram grandes diferenças na parasitemia, mas apresentaram aumento de transcritos de *T. cruzi* no tecido cardíaco quando comparados com animais C57BL/6. Com isso, pelo fato de camundongos deficientes para P2X7 apresentarem problemas mitocondriais e de contração nas células do tecido cardíaco, a infecção por *T. cruzi* pode estar agravando ainda mais este problema. Ainda, monócitos e macrófagos de animais *P2rx7<sup>-/-</sup>* podem estar em sua maioria em perfil M2 ou anti-inflamatório, uma vez que os transcritos para *Arg1* e *IL-10* se encontram aumentados no coração destes animais quando comparados com animais C57BL/6. Isto prejudicaria a eliminação do parasito por macrófagos no tecido cardíaco.

Animais *CD39<sup>-/-</sup>* apresentaram um fenótipo diferente do observado em animais C57BL/6. O aumento de leucócitos CD45<sup>+</sup> bem como aumento de transcritos inflamatórios no tecido cardíaco indicam que pode estar ocorrendo um processo de inflamação exacerbada no coração. Entretanto, isto não impacta na diminuição dos transcritos para *T. cruzi* no coração dos animais *CD39<sup>-/-</sup>* quando comparados aos animais C57BL/6. Isto pode estar ocorrendo de certa forma pelo tropismo por macrófagos que cepa de *T. cruzi* apresenta. Desta forma, o aumento destas células no coração seria benéfico para o crescimento do parasito.

Ademais, acreditamos que P2X7 e CD39 exerçam papel importante na progressão da doença. Com isso podendo impactar na fase crônica, fase mais grave da doença.

## **5. 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](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- $\gamma$ , 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., Pfeleger, 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 Ca<sup>2+</sup>-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.
  - Pfeleger, 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 Ca<sup>2+</sup> 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 $\beta$ : 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 $\beta$  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- $\alpha$  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.