

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Viviane do Carmo Gonçalves Souza

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE E DA EXPRESSÃO
DOS RECEPTORES P2X7, P2Y11 E A2A NA FORMA
INDETERMINADA DA DOENÇA DE CHAGAS**

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Viviane do Carmo Gonçalves Souza

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE E DA EXPRESSÃO DOS
RECEPTORES P2X7, P2Y11 E A2A NA FORMA INDETERMINADA
DA DOENÇA DE CHAGAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gonçalves Souza, Viviane do Carmo
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE E DA EXPRESSÃO
DOS RECEPTORES P2X7, P2Y11 E A2A NA FORMA INDETERMINADA
DA DOENÇA DE CHAGAS / Viviane do Carmo Gonçalves Souza.-
2016.

138 p.; 30 cm

Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coorientadora: Jeandre Augusto dos Santos Jaques
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2016

1. Pacientes com a forma indeterminada da doença de
Chagas 2. Receptor purinérgico 3. Linfócitos 4.
Citocinas I. Bitencourt Rosa Leal , Daniela II. dos
Santos Jaques, Jeandre Augusto III. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Viviane do Carmo Gonçalves Souza. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Tamanday número 383, Santa Maria, RS, 97060-540

Fone (0xx) 55 3220 9383; End. Eletr: vicgsouza@yahoo.com.br

Viviane do Carmo Gonçalves Souza

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE E DA EXPRESSÃO DOS
RECEPTORES P2X7, P2Y11 E A2A NA FORMA INDETERMINADA
DA DOENÇA DE CHAGAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

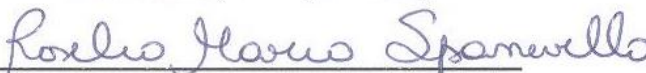
Aprovado em 26 de agosto de 2016:



Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



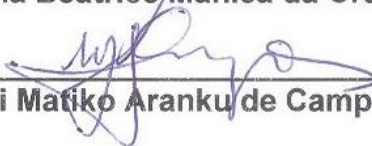
Tiana Tasca, Dra. (UFRGS)



Rosélia Maria Spanevello, Dra. (UFPEL)



Ivana Beatrice Manica da Cruz, Dra. (UFSM)



Marli Matiko Aranku de Campos, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família.
Simplesmente, por serem a base da minha vida,
e conseqüentemente das minhas conquistas.*

*Em especial, ofereço esta conquista
ao meu filhote Guinho,
por ter me ensinado o quanto é importante
sabermos nos doar e aproveitar o nosso tempo intensamente.*

*" Quem não te quer ouvir não te ouve, nem mesmo se gritares.
Quem te quer compreender te compreende.
Mesmo se não falas..."
(Autor desconhecido)*

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer a todos que colaboraram, seja de forma profissional como pessoal, nesta minha trajetória. Aqui deixo registrado alguns agradecimentos em especial.

Em primeiro lugar a Deus por me guiar, iluminar e proteger durante todos os dias desta caminhada.

Aos meus queridos pais Vanderlei e Vera, pela educação, apoio, amor e compreensão, enfim por sempre me concederem segurança e base em minhas escolhas e conquistas.

Ao meu esposo Luiz Felipe, que tanto me apoiou, incentivou e deu força para que mais esta realização fosse alcançada. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos meus filhotes Guinho e Duby por muitas vezes tornarem meus dias mais alegres, com o carinho e lealdade de vocês.

Ao meu irmão Vinícius, cunhada e sobrinhos por sempre torcerem por mim.

Aos meus sogros Felipe e Suzana, pelo apoio, carinho e amizade.

À minha orientadora Daniela Bitencourt Rosa Leal pela oportunidade, compreensão, amizade e por todo aprendizado.

Ao meu co-orientador e amigo Jeandre Augusto dos Santos Jaques, por sempre estar pronto a me ajudar, pela sua amizade e por todo conhecimento compartilhado nestes anos de caminhada.

Aos colegas Dani Passos, Fernanda, Karine, Lara e Jader por dividirem não apenas conhecimentos, mas preocupações e estarem sempre prontos para compartilhar sabedoria e amizade.

Aos meus colegas e amigos do laboratório 4229: João, Josiane, Kelly, Livia, Tati, Pedro, Renata, entre outros, pelo bom convívio e pela alegria de todos.

O meu reconhecimento aos colegas e amigos Carine e Guilherme, pelo companheirismo, amizade, compreensão e apoio principalmente nos últimos meses.

Aos colegas Isabel e Joabel, e à professora Soninha que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do HGuSM que muito torceram por mim, em especial Namir, Olga, Janice e Vaucher.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM pelo auxílio e apoio prestados.

A minha sincera gratidão aos pacientes por participarem deste estudo e por compartilharem suas histórias de vida.

“De todas as coisas que nos oferece a sabedoria, a maior é a aquisição da amizade”.
(Epicuro)

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE E DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES P2X7, P2Y11 E A2A NA FORMA INDETERMINADA DA DOENÇA DE CHAGAS

AUTORA: Viviane do Carmo Gonçalves Souza
ORIENTADORA: Daniela Bitencourt Rosa Leal
CO-ORIENTADOR: Jeandre Augusto dos Santos Jaques

A maioria dos indivíduos infectados com o protozoário *Trypanosoma cruzi* encontra-se na forma indeterminada da doença de Chagas (FIDC), que é caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório tecidual, composto por células mononucleares que proliferam e produzem citocinas pró e anti-inflamatórias, mesmo na ausência de morbidade aparente. A inflamação, resultante da ativação do sistema imune celular, é responsável pelo controle do parasitismo e pelo reparo tecidual. Citocinas anti-inflamatórias são importantes para a regulação da inflamação, impedindo que ocorram danos teciduais exacerbados mediados pela imunidade. A importância de limitar a inflamação na DC é atribuída, principalmente, à prevenção de eventos tromboembólicos desencadeados pela infecção, o que acarreta a progressão para a cardiomiopatia chagásica, uma das maiores causas de morte da DC. A sinalização purinérgica, mediada pelo ATP e pela adenosina, desempenha importante papel nas respostas imunes, inflamatórias e vasculares na DC. No primeiro momento da inflamação, o ATP extracelular funciona como um mediador endógeno pró-inflamatório e imuno-estimulatório no microambiente de células danificadas, através da ativação do receptor P2X7. Já os receptores P2Y11 e A2A induzem efeitos inibitórios mediados pelo ATP e adenosina extracelulares, respectivamente, nas diferentes células imunes. A partir de um estudo do tipo caso-controle, foi analisado o perfil de citocinas séricas referente às respostas Th1, Th2 e Th17 por citometria de fluxo a fim de determinar o microambiente gerado pela infecção durante a FIDC. Considerando a importância dos receptores purinérgicos para a propagação das sinalizações parácrinas e/ou autócrinas do ATP e da adenosina no sistema imune, foram avaliadas as expressões dos receptores P2X7, P2Y11 e A2A em linfócitos de pacientes com FIDC (n=12) e de indivíduos saudáveis (grupo controle, n=18) por PCR em tempo real, bem como a permeabilidade celular induzida pela ligação do ATP ao receptor P2X7. Os resultados demonstraram que não há alteração nos níveis séricos de IL-2, IFN- γ , IL-17 e IL-10 nos pacientes com a FIDC em relação ao grupo controle ($P>0,05$). No entanto, observou-se uma correlação positiva entre TNF- α e IL-10 bem como IFN- γ e IL-4 demonstrando que há uma regulação da resposta inflamatória durante a FIDC. Uma diminuição significativa na relação TNF- α /IL-10 nos pacientes FIDC ($P<0,05$) foi encontrada, demonstrando que há uma resposta favorável aos mecanismos de controle da inflamação. Este resultado foi baseado nas baixas concentrações séricas de TNF- α nos pacientes FIDC, como possível resultado da ação dos altos níveis de IL-6 que estaria contribuindo para a manutenção da resposta anti-inflamatória. O equilíbrio das respostas Th1/Th2 foi avaliado a partir da relação IFN- γ /IL-4 que mostrou estar significativamente diminuída ($P<0,05$) nos pacientes FIDC, sendo favorável à produção de IL-4, estabelecendo um predomínio de uma resposta Th2. Enquanto, a expressão gênica dos receptores P2X7 e P2Y11 bem como a permeabilidade celular do receptor P2X7 não apresentaram alterações significativas, uma redução na expressão gênica do receptor A2A em linfócitos dos pacientes FIDC foi observada estatisticamente ($P<0,05$). Em conjunto, os resultados sugerem que um microambiente anti-inflamatório modula negativamente a via de sinalização mediada pelo receptor A2A em linfócitos a fim de limitar a imunossupressão induzida por altos níveis de adenosina extracelular durante a FIDC. Portanto, a sinalização adenosinérgica parece desempenhar um papel importante na regulação das respostas imunes, inflamatórias e vasculares na FIDC, contribuindo para o equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito bem como para o controle da evolução clínica da DC.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Receptores purinérgicos. Linfócito. Sistema purinérgico. Citocinas.

ABSTRACT

EVALUATION OF IMMUNE RESPONSE PROFILE AND P2X7, P2Y11 AND A2A RECEPTORS EXPRESSION IN THE INDETERMINATE FORM OF CHAGAS DISEASE

AUTHOR: Viviane do Carmo Gonçalves Souza
ADVISOR: Daniela Bitencourt Rosa Leal
CO-ADVISOR: Jeandre Augusto dos Santos Jaques

Most infected individuals by protozoan *Trypanosoma cruzi* is in the indeterminate form of Chagas disease (IFCD), which is characterized by the presence of a tissue inflammatory infiltrate composed by mononuclear cells which proliferate and produce pro and anti-inflammatory cytokines, even in the absence apparent morbidity. Inflammation resulting from cellular immune activation is responsible for parasite control and tissue repair. Anti-inflammatory cytokines are important to the regulation of inflammation, preventing immunity-mediated excessive tissue damage. The importance of limiting inflammation in CD is attributed mainly to the prevention of thromboembolic events triggered by infection which leads to progression to chagasic cardiomyopathy, one of the most common causes of death by CD. Purinergic signaling, mediated by ATP and adenosine, plays an important role in immune, inflammatory as vascular responses in CD. At first the inflammation, extracellular ATP works as an endogenous pro-inflammatory and immunostimulatory mediator through the activation of P2X7 receptor in the damaged cells microenvironment. On the other hand, P2Y11 and A2A receptors induce inhibitory effects mediated by ATP and adenosine, respectively, in different immune cells. The profile of serum cytokines involved in Th1, Th2 and Th17 responses was analysed by flow cytometry in order to determine the microenvironment generated by the infection during IFCD, in a study of the case-control. Considering the importance of purinergic receptors to the propagation of ATP and adenosine paracrine and/or autocrine signaling in the immune system, the expression of P2X7, P2Y11 and A2A receptors were evaluated by Real time-PCR in lymphocytes from IFCD patients (n=12) and apparently healthy subjects (control group, n=18) as well as cellular permeability induced by ATP-mediated P2X7R activation. The results showed that the serum levels of IL-2, IFN- γ , IL-17 and IL-10 were not altered in patients with IFCD in relation to control group ($P>0.05$). However, a positive correlation was observed between TNF- α and IL-10 as well as between IFN- γ and IL-4 showing a regulation of the inflammatory response during IFCD. A significant decrease in the TNF- α /IL-10 ratio was found ($P<0.05$), demonstrating the presence of a favorable response to control mechanisms of inflammation in IFCD patients. This result is based on the low concentrations of TNF- α in the serum from IFCD patients possibly as a result of high levels of IL-6 which would contribute to the maintenance of an anti-inflammatory response. The balance between Th1/Th2 responses was evaluated through the IFN- γ /IL-4 ratio which was shown to be decreased in IFCD patients ($P<0.05$), favorable to IL-4 production, establishing a predominance of a Th2 response. While the gene expression of both P2X7R and P2Y11R and the cell permeability to P2X7R did not present significant changes, lower levels of A2AR gene expression in lymphocytes of IFCD patients were statistically observed ($P<0.05$). Together, these results suggest that an anti-inflammatory microenvironment negatively modulates the signaling pathway mediated by A2AR in lymphocytes so as to limit the immunosuppression induced by high levels of extracellular adenosine. Therefore, the adenosinergic signalling appears to play an important role in the regulation of immune, inflammatory and vascular responses in IFCD, contributing to the host-parasite balance and to control of clinical course of CD.

Keywords: Chagas disease. Purinergic receptors. Lymphocyte. Purinergic signaling. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1-	Representação esquemática da transmissão e infecção da doença de Chagas.....	27
Figura 2-	Resposta imune celular na infecção crônica da doença de Chagas.....	31
Figura 3-	Estrutura de um nucleotídeo de adenina.....	32
Figura 4-	Representação esquemática dos componentes do sistema purinérgico.....	34
Figura 5-	Representação da família de receptores purinérgicos.....	36
Figura 6-	Estrutura de um receptor P2X.....	37
Figura 7-	Ativação do receptor P2X7 pelo ATP.....	40
Figura 8-	Estrutura dos receptores P2Y e sua especificidade a agonistas.....	42
Figura 9-	Receptores P2Y11 e as vias de sinalização intracelular.....	44
Figura 10-	Estrutura do receptor P1.....	46
Figura 11-	Resumo esquemático da modulação da resposta imune e da participação da sinalização purinérgica em linfócitos de pacientes na forma indeterminada da doença de Chagas (FIDC)	108

MANUSCRITO I

Figure 1-	Expression level of P2X7 receptor in peripheral blood lymphocytes from IFCD patients. mRNA expression of the corresponding protein from patients with IFCD (n=12) and healthy subjects (n=18) was analyzed by qRT-PCR, as stated in Materials and Methods. Data were normalized to a calibrator sample and relative values calculated with correction for amplification efficiency [12]. The housekeeping gene GAPDH was used as an internal control of the samples. Data were expressed in mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). $P < 0.05$, Student's <i>t</i> test.....	71
Figure 2-	Immunoblot of P2X7 receptor expression on human peripheral lymphocytes. (A) Representative Western bolt assay. Samples were loaded on an SDS-gel, and after electrophoresis, the proteins were blotted onto a polyvinilidene difluoride membrane and incubated with a polyclonal antibody against protein P2X7. (B) Densitometric analysis of the Western blot results (arbitrary units, A.U.) of the protein P2X7. Data are represented as the mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). $P < 0.05$ (n= 5, Student's <i>t</i> test).....	72

Figure 3-	Functional analysis of P2X7 receptor in peripheral lymphocytes from IFCD patients. Assays used lymphocytes from control group ($n=10$; <i>white bars</i>) and IFCD group ($n= 10$; <i>black bars</i>) in the absence (0) and presence of 3mM ATP. Experiments used ethidium bromide ($2.0 \mu\text{M}$) as a tracer and were analysed by fluorimetry. Data are expressed as the mean and S.E.M. $P>0.05$, one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test.....	73
Figure 4-	IL-2 (4A), IL-6 (4B), IL-17 (4C), IL-10 (4D), TNF- α (4E), IL-4 (4F) and IFN- γ (4G) levels in sera from IFCD patients ($n=10$) and healthy individuals ($n=10$). Cytokines levels were determined on serum by flow cytometry and expressed in pg/mL. Data are represented as the mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). Statistical significance between groups is indicated by * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ (Student's t test).....	74
Figure 5-	Correlation analysis between pro (TNF- α and IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines from IFCD patients. Pearson's correlation test was used ($n=10$; $P<0.05$; r =correlation coefficient).....	75
Figure 6-	Inflammatory balance and cytokine pattern in IFCD patients by ratio between TNF- α and IL-10 levels (A) and IFN- γ and IL-4 levels (B). Data are represented as the mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). Statistical significance between groups is indicated by * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ ($n=10$; Student's t test).....	76

MANUSCRITO II

Figure 1-	P2Y11R (A) and A2AR (B) mRNA expression levels of in peripheral blood lymphocytes from IFCD patients. The quantification was performed by qRT-PCR method (IFCD group $n=12$ and control groups $n=18$). GAPDH was used as an internal control of the samples. Results were expressed as Arbitrary Units (P2Y11R or A2AR/GAPDH ratio). The P2Y11R mRNA levels were expressed as mean \pm SEM and calculated using unpaired Student's t test; while A2A mRNA levels were expressed as median with interquartile range by Mann-Whitney U test analysis. * $P<0.05$ was considered statistically significant..	93
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

Table 1-	Oligonucleotide primers and probes used by real-time quantitative polymerase chain reaction of P2X7 receptor.....	77
----------	---	----

MANUSCRITO II

Table 1-	General characteristics and hematological analysis of the studied population and comparison between IFCD and control group.....	94
Table 2-	Primer sequences for quantitative RT-PCR assay	95

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AP-1	proteína ativadora 1
APCs	células apresentadoras de antígenos
ATP	adenosina trifosfato
ATPe	ATP extracelular
DAMPs	padrões moleculares associados ao dano
DC	doença de Chagas
E-ADA	ecto-adenosina desaminase
E-NTPDase	ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
ERK	cinase regulada por sinal extracelular
EROS	espécies reativas de oxigênio
FIDC	forma indeterminada da doença de Chagas
INF-γ	Interferon-gamma
IP3	trifosfato inositol
IP3K	fosfatidilinositol-3-cinase
MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
NAD	nicotinamida adenina de dinucleotídeo
NFAT	fator nuclear de células T ativadas
NF-κB	fator nuclear kappa B
NK	Natural Killer
NLRP3	receptor do tipo Nod 3
NO	óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	padrões moleculares associados ao patógeno
PKA	proteína cinase A
PLC	fosfolipase C

PRRs	receptores de reconhecimento de padrões
TCR	receptores para células T
TGF-β	fator de transformação do crescimento beta
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
Th17	T helper 17
TMs	transmembranas
TNF-α	fator de necrose tumoral-alpha
UDP	uridina difosfato
UTP	uridina trifosfato

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	131
Apêndice B	Coleta de dados.....	133

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Autorização para uso de imagens.....	134
Anexo B	Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética	136
Anexo C	Carta de Submissão Manuscrito I	137
Anexo C	Carta de Submissão Manuscrito II	138

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.2.1	Doença de Chagas	23
1.2.1.1	Aspectos Gerais.....	23
1.2.1.2	Desenvolvimento da doença	25
1.2.1.3	Resposta Imune do hospedeiro.....	27
1.2.2	Sistema Purinérgico	31
1.2.2.1	<i>Sinalização Purinérgica</i>	31
1.2.2.2	<i>Receptores Purinérgicos</i>	34
1.2.2.2.1	Receptores Purinérgicos P2	36
1.2.2.2.1.1	Receptores P2X.....	37
1.2.2.2.1.1.1	Receptores P2X7.....	38
1.2.2.2.1.2	Receptores P2Y.....	41
1.2.2.2.1.2.1	Receptores P2Y11.....	43
1.2.2.2.2	Receptores Purinérgicos P1	45
1.2.2.2.2.1	Receptores A2A	47
1.2.3	<i>Trypanosoma cruzi</i> e o sistema purinérgico	48
1.3	Objetivos	51
1.3.1	Objetivo Geral	51
1.3.2	Objetivos específicos	51
2	MANUSCRITO I	53
3	MANUSCRITO II	79
4	DISCUSSÃO	96
5	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
	APÊNDICES	131
	ANEXOS	134

APRESENTAÇÃO

Esta tese está descrita na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução, a revisão bibliográfica e os objetivos.

A seguir, a metodologia e os resultados estão apresentados na forma de dois manuscritos.

Por fim, os itens discussão e conclusão, contêm interpretações e comentários gerais referentes aos dois manuscritos.

As referências bibliográficas apresentadas no final da tese referem-se às citações que aparecem nas seções introdução, revisão bibliográfica, discussão e conclusão.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana, foi descoberta em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, que identificou seu vetor, agente etiológico e descreveu suas características clínicas. É causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado, cuja principal forma de transmissão é a vetorial, que ocorre através das excretas de triatomíneos hematófagos, e em menor frequência pelas vias sanguínea (transfusão), vertical (placentária), oral e acidental. A DC está relacionada com a pobreza, uma vez que a presença de triatomíneos está associada às más condições de habitação que causam riscos para a saúde do ser humano. Mesmo há mais de 100 anos da sua descoberta, é considerada a doença parasitária com maior impacto socioeconômico na América Latina, sendo responsável por baixa produtividade e alto custo médico para o tratamento de indivíduos infectados crônicos sintomáticos (WHO, 2012).

Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas, principalmente em áreas endêmicas da América Latina, o que abrange 21 países (RASSI et al., 2010). Devido à intensa mobilidade populacional, a DC saiu de uma situação regional para risco de infecção mundial, tornando-a um importante problema de saúde pública. Nas últimas décadas aumentou a sua detecção em países considerados não-endêmicos, como Estados Unidos da América, Canadá, Europa e alguns países do Pacífico Ocidental (MUÑOZ et al., 2009; WHO, 2013).

Uma natureza multifatorial dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença tem sido apresentada e relacionada a fatores inerentes tanto ao parasito quanto ao hospedeiro (MACEDO et al., 2004). Dentre os fatores inerentes ao parasito destaca-se a presença de populações geneticamente distintas, relacionadas a um tropismo celular, além de características peculiares de resposta à quimioterapia (MACEDO et al., 2004). No âmbito do hospedeiro, o padrão de resposta imune tem sido apontado como fator determinante para as diferentes formas clínicas, bem como para a eficácia terapêutica (RIVERA et al., 2003).

A doença manifesta-se sob a forma aguda ou crônica, que pode ser indeterminada (assintomática) ou apresentar manifestações clínicas. A fase aguda frequentemente é oligossintomática, porém em 5-10% dos casos leva à morte, principalmente por encefalomielite ou miocardite aguda (PRATA, 2001; WHO, 2002).

Nesta fase há a indução no hospedeiro de uma resposta imune pró-inflamatória do tipo T helper 1 (Th1), com aumento dos níveis de IFN- γ e IL-2; que garante o controle do parasitismo, além de gerar um processo inflamatório reparador tecidual. No entanto, uma inflamação desregulada pode levar a uma reação exagerada, causando a doença inflamatória crônica propriamente dita. Para que se estabeleça um limite do processo inflamatório, mediadores anti-inflamatórios, como IL-4 e IL-10, são produzidos por células T helper 2 (Th2) (SAMUDIO et al., 1998). Quando um equilíbrio entre respostas Th1 e Th2 é alcançado no hospedeiro, tem-se a forma indeterminada da DC (FIDC), em que indivíduos infectados encontram-se sem morbidade aparente, correspondente a 60-70% dos casos. No entanto, 30-40% dos infectados evoluem para uma das formas clínicas da DC (cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva) (PRATA, 2001).

Por muito tempo, o equilíbrio das respostas imune e inflamatória foi explicado baseando-se apenas na produção de citocinas por células Th1 e Th2. No entanto, este balanço foi reconsiderado após a descoberta de uma nova linhagem de células T CD4⁺ efectoras, denominadas Th17, que produzem IL-17, IL-21, IL-22 e TNF- α (PARK et al., 2005). Particularmente, a IL-17, tem propriedades pró-inflamatórias, sendo capaz de induzir células a produzirem vários mediadores inflamatórios (por exemplo, IL-6, TNF- α , IL-1) levando ao recrutamento de neutrófilos e inflamação (KOLLS & LINDEN, 2004). Com isto, a resposta Th17 tem sido associada à patogênese de diversas doenças inflamatórias e autoimunes incluindo a esclerose múltipla, a psoríase e a artrite reumatoide (TESMER et al., 2008) bem como infecções parasitológicas como a esquistossomose (RUTITZKY & STADECKER, 2006). No entanto, estudos em humanos e em modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi* têm demonstrado que a IL-17 desempenha um papel protetor na DC cardíaca (DA MATTA GUEDES et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2013).

Devido ao elevado número de casos de DC e à grande quantidade de infectados crônicos que estão em risco de desenvolver uma das formas clínicas da doença, a DC torna-se uma das principais causas de morbidade cardiovascular e morte prematura na América Latina (WHO, 2012). No entanto, os fatores que determinam a conversão de indivíduos infectados assintomáticos para uma das manifestações clínicas sintomáticas, ainda permanecem desconhecidos (DIAS, 2007).

Um importante sistema envolvido nas vias de biossinalização capaz de modular as respostas imunes e inflamatórias no hospedeiro e de especial interesse para este estudo é o sistema purinérgico. Este sistema exerce suas funções através de três componentes principais: nucleotídeos (ex.: ATP, ADP e AMP) e/ou nucleosídeos (ex.: adenosina); receptores purinérgicos (ex.: P1 e P1) e enzimas específicas (ex.: ecto-nucleotidasas). Os nucleotídeos e/ou nucleosídeos de adenina, quando no meio extracelular, servem como moléculas sinalizadoras para diversas funções na resposta imune, incluindo proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular através da ativação de receptores purinérgicos. A ativação destes receptores, por sua vez, é regulada por ecto-enzimas específicas do sistema purinérgico, que além de serem responsáveis por finalizar a ativação dos receptores, protegem-nos de uma dessensibilização (BURNSTOCK, 2006; DI VIRGILIO, 2007).

Uma vez liberado, o ATP extracelular (ATPe) é reconhecido como um sinal de dano ou padrão molecular associado ao dano (DAMP, do inglês *Damage-Associated Molecular Pattern*) (DI VIRGILIO, 2005), contribuindo para a instauração da inflamação juntamente com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) (MARIATHASAN & MONACK, 2007). Em particular, o receptor purinérgico P2X7 expresso na membrana plasmática de diferentes tipos celulares (NORTH, 2002; VITIELLO et al., 2012) é sensível às elevadas concentrações do ATPe e o aumento de sua expressão é regulado por citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α e INF- γ (ZHANG et al., 2005). A ativação do receptor P2X7 pelo ATPe altera o meio ambiente iônico das células, desencadeando a ativação de diversas vias metabólicas que estão associadas à morte de patógenos bem como morte celular, incluindo a do inflamassoma, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-18); da proteína cinase ativada pelo estresse, resultando na indução da apoptose; da proteína cinase ativada por mitógeno, levando à geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além da fosfolipase D, estimulando a fusão do lisossoma ao fagossoma (COUTINHO-SILVA et al., 1999; MILLER et al., 2011). Devido ao seu envolvimento nestas vias celulares, o receptor P2X7 é considerado um importante regulador da inflamação no hospedeiro.

Um papel mais complexo na regulação das respostas imunes tem sido atribuído ao ATPe (BOEYNAEMS & COMMUNI, 2006; DI VIRGILIO et al., 2009). O ATP, por sua vez, pode potencialmente inibir funções imunes de diferentes

leucócitos quando em baixas concentrações no meio extracelular, como ocorre em infecções crônicas (DI VIRGILIO et al., 2009). O receptor P2Y11 é o principal mediador dos efeitos imunossupressores do ATPe, por estar funcionalmente acoplado à proteína Gs, que induz a ativação da produção do AMP cíclico intracelular (ABBRACCHIO et al., 2006; VITIELLO et al., 2012). A ativação do receptor P2Y11 mediada ATPe, controla vários processos fisiológicos, incluindo o bloqueio de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-12, enquanto, a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e antagonista do receptor IL-1 não é afetada ou está aumentada (HORCKMANS et al., 2006; LA SALA et al., 2001).

Além das citocinas, outros mediadores anti-inflamatórios, como a adenosina, são produzidos ou liberados rapidamente no meio extracelular, a fim de limitar o processo inflamatório induzido pela ativação do sistema imune. A adenosina extracelular, por sua vez, pode ser proveniente do catabolismo do ATPe por ação de ecto-nucleotidases ou do meio intracelular através da ação de transportadores de nucleosídeos situados na superfície das células. A adenosina atua como um agente anti-inflamatório endógeno (CRONSTEIN, 1994) através da ativação de receptores A2A na superfície das células imunes. Os efeitos imunossupressores da adenosina são produzidos a partir da ativação da proteína G acoplada ao receptor A2A, que conseqüentemente, desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, resultando no aumento dos níveis de AMPc. O AMPc é um potente imunossupressor, por inibir a proliferação e a ativação de linfócitos T e B (JOHNSON, 1988; MOSENDEN & TASKEN, 2011), além de modular a diferenciação e a função das células mielóides (SEREZANI et al., 2008).

A modulação da expressão de receptores purinérgicos tem sido demonstrada em doenças inflamatórias crônicas, como um mecanismo de controle das respostas imunes e inflamatórias. Até o momento, foi demonstrado o envolvimento de ecto-enzimas do sistema purinérgico do *T. cruzi* na sua infectividade e virulência (FIETTO et al., 2004; SANTOS et al., 2009; SILVA-GOMES et al., 2014) bem como do hospedeiro na regulação das respostas imune, inflamatória e vascular na FIDC (SOUZA et al., 2012a; 2012b). Embora estudos prévios tenham apresentado efeitos na regulação das concentrações de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina através da modulação da atividade de ecto-enzimas do sistema purinérgico na FIDC, a participação dos receptores responsáveis por estes efeitos ainda é pouco explorada.

Portanto, com o intuito de dar continuidade ao estudo realizado em pacientes com FIDC, torna-se relevante avaliar a expressão de receptores purinérgicos, responsáveis por efeitos pró e anti-inflamatórios, mediados pelo ATP e adenosina, além do microambiente imune pelo qual eles estão atuando e contribuindo para a manutenção do equilíbrio entre a persistência do parasito e o controle da progressão da doença pelo hospedeiro. Por fim, o estudo dos mecanismos patofisiológicos da DC é de fundamental importância na busca de estratégias terapêuticas mais efetivas que beneficiem os pacientes com a forma crônica da doença.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Doença de Chagas

1.2.1.1 Aspectos gerais

A doença de Chagas (DC), também conhecida por Tripanossomíase Americana, foi descrita pela primeira vez em 1909, pelo médico brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas. Na história da ciência e da saúde brasileira, a descoberta da DC foi considerada um marco importante e único, onde um só cientista descobriu o vetor, o agente etiológico e ainda descreveu a sua patologia.

O seu agente etiológico é o protozoário flagelado e digenético, *Trypanosoma cruzi*. A principal via de transmissão é a vetorial, por insetos hematófagos da família Reduviidae e subfamília Triatominae, vulgarmente conhecidos por “barbeiro”, “chupão” ou “fincão”. Os insetos tornam-se vetores após picarem hospedeiros infectados com *T. cruzi* (animais ou humanos). Há mais de cem espécies de triatomíneos reconhecidos, porém somente cerca de dez são amplamente colonizadores de habitações humanas e altamente antropofílicos. O parasita também pode ser transmitido por outras vias: placentária, oral, acidentes em laboratórios, transfusão sanguínea e transplante de órgãos (WHO, 2012).

A DC constituiu uma endemia no início de sua descrição, predominantemente rural, de distribuição exclusiva do continente Americano, atingindo áreas desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina, intimamente associada ao subdesenvolvimento social e econômico (WHO, 2002). Porém, nas décadas de 70 e 80, com o êxodo rural houve uma mudança no padrão epidemiológico tradicional, que passou a ser também uma doença urbana, tendo como a segunda via mais comum de transmissão da infecção, a transfusão sanguínea. Nesta época no Brasil a endemia atingia 44,5% do território nacional, sendo a mais extensa das Américas e incluía 2450 municípios dos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo, Sergipe e Distrito Federal (ROCHA & SILVA et al., 1979).

A partir de 1990, programas de controle da DC reduziram significativamente o número de novas infecções na América Latina (MOTT, 1990), em particular, a

prevalência da DC no Brasil reduziu consideravelmente de 4,7% (década de 70) para índices inferiores a 0,2% (DIAS, 2007; SILVEIRA, 2000). A transmissão do *T. cruzi* através dos principais vetores domésticos foi certificado como interrompida no Uruguai em 1997, Chile em 1999, Brasil em 2006 e em muitos países da América Central (Guatemala, Honduras, El Salvador e Nicarágua) em 2009-2010. O número de infecções por transfusão sanguínea também diminuiu consideravelmente em todos os países da América Latina através da instauração compulsória de triagem sorológica para DC em bancos de sangue (SCHMUNIS, 1991). Apesar do sucesso das medidas de controle na redução da incidência da DC, são de pouco benefício para aqueles com infecção crônica ao longo da vida.

Hoje, mesmo há mais de 100 anos da sua descoberta, a DC é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das principais doenças tropicais negligenciadas. No mundo, estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas e que haja uma taxa de mortalidade de 12 mil pessoas por ano (WHO 2016). Nas últimas décadas, foram detectados casos em áreas não-endêmicas como: América do Norte (Canadá e Estados Unidos), Europa (em especial em Portugal e Espanha) e a região que compreende a Ásia e o Pacífico, principalmente como resultado da movimentação das populações (COURA & VIÑAS, 2010; GASCON et al., 2010; TARLETON et al., 2007).

A DC é um dos principais problemas de saúde pública na América Latina (MONCAYO & SILVEIRA, 2009), devido a deficiências no seu tratamento e à ausência de vacinas apropriadas (HORTEZ & FERRIS, 2006). Vários aspectos relacionados ao tratamento ainda são considerados complexos, devido à baixa eficácia, principalmente na fase crônica, e alta toxicidade dos agentes quimioterápicos indicados, além de vários efeitos adversos que requerem supervisão médica (RAETHER & HANEL, 2003). Até o momento, ainda não há uma quimioterapia segura e eficaz para a eliminação do *T. cruzi* nas diversas formas clínicas da doença. Existem apenas dois quimioterápicos, desenvolvidos no início da década de 1970, o Benznidazol (ROCHAGAN®/ROCHE) e o Nifurtimox (LAMPIT®/BAYER), sendo que este último, não é mais comercializado no Brasil (OLIVEIRA et al., 2008). Isto demonstra a importância da busca de novos caminhos disponíveis para o desenvolvimento de terapias mais efetivas, através de estudos que aprofundam os conhecimentos relacionando a patogênese da doença.

1.2.1.2 Desenvolvimento da doença

A DC é uma infecção de caráter inflamatório e de evolução crônica. As manifestações anatomoclínicas da doença resultam de múltiplos fatores e mecanismos que se associam no decorrer da infecção, onde se distinguem as fases aguda e crônica (LOPES et al., 1995). As características de cada fase e o curso da infecção dependem de fatores inerentes ao parasito (variabilidade genética, inóculo e virulência) e ao hospedeiro (via de transmissão, estado imunológico, idade, sexo e ambiente) (ANDRADE et al., 2002; BRENER, 1985).

A fase aguda pode ser assintomática ou oligossintomática, sendo reconhecida apenas em 1 a 2% dos casos (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998). Inicia-se após 7 a 10 dias de incubação do parasito, é de curta duração (2-4 meses), podendo ser caracterizada por febre, mal-estar, dor muscular, inchaço dos nódulos linfáticos, hepatoesplenomegalia, efusão pericárdica, e reação inflamatória no local da picada do vetor (conhecido como “chagoma de inoculação”). Na conjuntiva, pode resultar edema periorbital unilateral e inchaço de pálpebra (conhecido como “sinal de Romaña”). Durante esta fase, os parasitos circulantes são numerosos e capazes de infectar vários tecidos no hospedeiro, incluindo músculo esquelético, tecidos linfóides, tecidos nervosos, e glândulas (DEVERA et al., 2003). O diagnóstico é estabelecido em menos de 10% dos casos, possivelmente devido ao desenvolvimento de sintomas leves que desaparecem espontaneamente em mais de 95% dos pacientes (PUNUKOLLU et al., 2007). A fase aguda está nitidamente relacionada com a parasitemia e a evolução deve, muito provavelmente, estar relacionada à virulência da cepa e à efetividade protetora do sistema imunológico do indivíduo infectado (HIGUSCHI, 1995). Em humanos, a mortalidade ocorre em 5 a 10% dos casos não submetidos a tratamento específico e pode levar a complicações como miocardites ou meningoencefalites além de comprometimento neurológico (PRATA, 2001).

As manifestações clínicas da fase aguda regridem e inicia-se a fase crônica, num intervalo entre 4 e 10 semanas. A fase crônica é caracterizada por escassez de parasitos no sangue periférico e nos tecidos e pela presença de uma resposta imune *anti-T. cruzi*. Durante esta fase, cinco formas anatomoclínicas podem ser distinguidas: indeterminada, cardíaca, digestiva, mista (cardíaca e digestiva) e nervosa (PRATA, 2001).

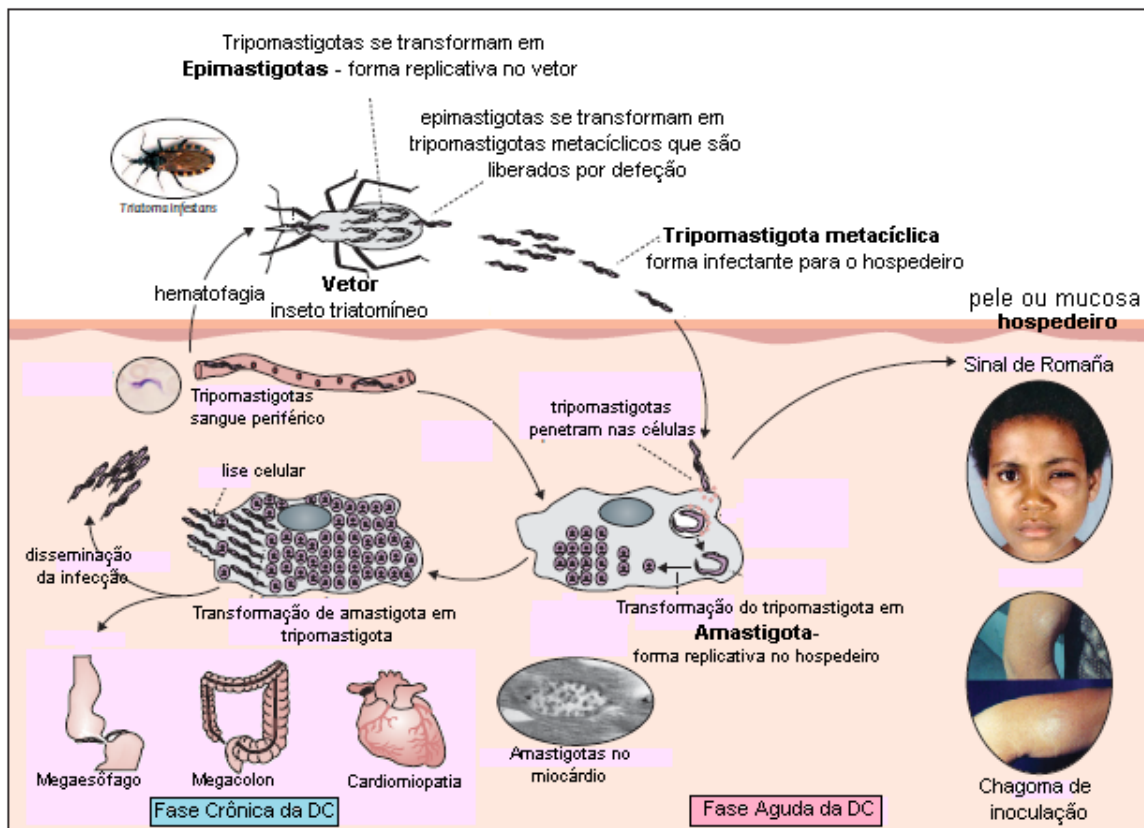
A maioria dos infectados sobrevive à fase aguda da infecção e permanece na chamada forma indeterminada (FIDC) ou assintomática da doença de Chagas, a qual se caracteriza por um longo período de latência clínica, permanecendo por muitos anos ou por toda a vida (PRATA, 2001). Os pacientes com a FIDC, além de sorologia anti-*T.cruzi* positiva, ausência de sinais e sintomas clínicos, não apresentam redução na resposta imune celular, possuindo também exames como eletrocardiograma e radiológicos do coração, esôfago e cólon normais. Uma pequena população destes pacientes apresenta anormalidades em algum teste cardíaco ou gastrointestinal, sendo estas frequentemente de baixa intensidade, as quais podem ocorrer ocasionalmente também em indivíduos saudáveis (PRATA, 2001). Admite-se que cerca de 60% dos infectados das áreas endêmicas da DC pertencem à FIDC (DIAS, 1989). Os pacientes durante este período apresentam baixa morbidade, sendo capazes de realizar qualquer tipo de atividade, e um excelente prognóstico, pelo menos a médio-prazo (5-10 anos). Em estudos de sobrevivência, indivíduos com a FIDC apresentaram uma sobrevivência similar a de uma população saudável (MAGUIRE, et al., 1987; IANNI et al., 2001).

Embora o prognóstico seja favorável durante a FIDC, cerca de um terço dos infectados apresentam manifestações relacionadas ao envolvimento de certos órgãos tais como coração, esôfago, cólon e sistema nervoso, caracterizando as formas crônicas clínicas da doença. Durante a fase crônica, aproximadamente 30% da população total chagásica em áreas endêmicas evoluem para uma grave descompensação cardíaca, sendo que a mais comum causa de morte é o infarto agudo do miocárdio fulminante (55 a 65% dos pacientes), seguida de insuficiência cardíaca congestiva (25 a 30% dos pacientes) e isquemia pulmonar ou cerebral (10 a 15% dos pacientes) (GUEDES et al., 2016; RASSI et al., 2001). Em torno de 15 a 20% dos pacientes chagásicos desenvolvem alterações de motilidade, secreção e absorção no trato digestivo, especialmente esôfago e cólon, desenvolvendo as síndromes dos megas gastrointestinais (megacólon e megaesôfago) (PRATA, 2001).

Uma disfunção endotelial bem como um processo inflamatório exacerbado tem sido relatada em diversos estudos com a DC, estando relacionada à morte súbita nos pacientes com FIDC ou à progressão para a forma cardíaca, a principal forma clínica da fase crônica (MARIN-NETO et al., 1992; ROSSI et al., 1985; TANOWITZ et al., 1990). Desde a descoberta de Carlos Chagas (CHAGAS, 1916), acredita-se que o parasito, apesar de dificilmente identificado nos cortes

histológicos, seria o responsável pela manutenção do processo inflamatório crônico cardíaco. Portanto, a presença do parasito, proliferando no miocárdio, ocorreria em episódios, muito provavelmente quando houvesse uma queda na vigilância imunológica (HIGUSCHI, 1995).

Figura 1 – Representação esquemática da transmissão e infecção da DC.



Fonte: Obtida e modificada a partir de Rassi et al., 2010.

1.2.1.3 Resposta Imune do hospedeiro

Os mecanismos de defesa do hospedeiro são constituídos pela imunidade inata, responsável pela proteção inicial, e pela imunidade adaptativa, que se desenvolve mais lentamente e é responsável pela defesa mais tardia e mais eficaz contra as infecções. As respostas imunes adaptativas, humoral e celular, geram mecanismos especializados para combater infecções por micro-organismos extracelulares e intracelulares, respectivamente. O reconhecimento dos patógenos invasores pelo sistema imune inato é essencial para a proteção do hospedeiro

contra parasitos e para a iniciação de uma resposta imune adaptativa efetiva (ABBAS & LICHTMAN, 2009).

Os componentes clássicos da imunidade inata, como células dendríticas, macrófagos e células Natural Killer (NK) parecem ter papel crucial na imunidade anti-*T. cruzi*. A ativação desta resposta imune é induzida pela detecção dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), como as diferentes moléculas de superfície do parasito, por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes na superfície das células de defesa (KUMAR et al., 2011). A sinalização gerada por esta interação, ativa vários fatores de transcrição como fator nuclear kappa B (NF- κ B) e as proteíno-cinases ativadas por mitógenos (MAP cinases) que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12), que controlam a replicação do parasito e de componentes microbicidas como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROS) (DOS-SANTOS et al., 2016; KUMAR et al., 2011).

Na imunidade inata destaca-se a participação dos macrófagos, por possuírem dois papéis distintos na infecção pelo *T. cruzi*: como célula hospedeira do parasito e como célula efetora na resistência à infecção. A atividade dos macrófagos na eliminação do *T. cruzi* é potencializada por algumas citocinas, tais como IFN- γ e TNF- α , que agem sinergicamente sobre estas células, estimulando os mecanismos citotóxicos, capazes de reduzir significativamente a replicação do parasito (BRENER & GAZZINELLI, 1997).

Outras células que possuem um papel fundamental no controle da infecção são as células NK, por serem fonte primária inicial de IFN- γ na fase aguda, antes mesmo do desenvolvimento de uma resposta imune celular (ANTUNEZ & CARDONI, 2000). O IFN- γ produzido é considerado a molécula chave no controle do *T. cruzi*, devido à indução de NO e outras moléculas efetoras dos macrófagos, aumento da expressão da molécula de MHC classe II, polarização das células Th1 CD4+ e produção de outras citocinas inflamatórias (MARINHO et al., 2007). Estudos demonstram que animais com baixa quantidade ou ausência de células NK, desenvolvem alta parasitemia e altas taxas de mortalidade (ROTTENBERG et al., 1988). Já as células dendríticas fazem a ligação da imunidade inata com a adaptativa pela apresentação de antígenos do parasito e pela produção de IL-12 que

induz a diferenciação das células T helper 1 (Th1) em efectoras e a ativação das células NK (JUNQUEIRA et al., 2010).

O controle exercido pela imunidade inata muitas vezes não é eficiente o suficiente para eliminar o patógeno, mas limita de forma efetiva a sua replicação *in vivo*. Portanto, a ativação e a regulação da resposta imune adaptativa são essenciais não somente para controlar a replicação do parasito, mas também para minimizar a patologia mediada pela imunidade. A ação da resposta imune adaptativa celular, através de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, assim como linfócitos B, contribui para a resistência contra o parasito através da secreção de citocinas de citotoxicidade celular ou da produção de anticorpos específicos (ANTONELLI et al., 2005; SOUZA et al., 2007).

Os primeiros estudos sobre imunidade celular de pacientes chagásicos mostraram que células mononucleares do sangue periférico, especialmente células T CD4⁺ e monócitos de paciente das formas indeterminada ou cardíaca, são capazes de proliferar quando expostas *in vitro* a antígenos do parasito e a componentes do hospedeiro (DUTRA et al., 2000; SOUZA et al., 2004). Estas células também podem produzir uma grande quantidade de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que orquestrarão respostas imunes relacionadas ao controle da diferenciação celular, da adesão e da expressão de moléculas co-estimulatórias, além de migração e recrutamento, influenciando na evolução clínica da doença (SOUZA et al., 2007).

Os linfócitos T CD4⁺ são necessários para a produção de anticorpos líticos e de citocinas que auxiliam na destruição de formas intracelulares do parasito (TARLETON, 1996). No entanto, Cuña & Cuña (1995) sugeriram a participação dos linfócitos T CD8⁺ nos mecanismos imunopatológicos, a partir da observação do predomínio destas células no sangue periférico de indivíduos portadores da DC com sintomas cardíacos ou gastrintestinais, diferentemente de indivíduos assintomáticos, nos quais os linfócitos T CD4⁺ são predominantes.

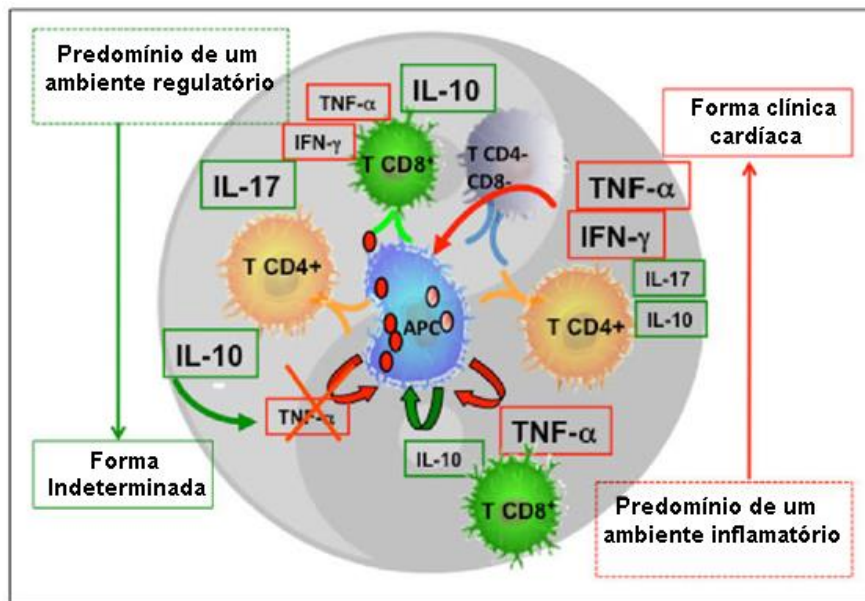
Uma nova contribuição dos linfócitos B na imunidade contra o *T. cruzi* foi discutida por Cardillo e colaboradores (2007), ao observarem que ao infectarem animais geneticamente deficientes de células B, houve uma diminuição na frequência de linfócitos T CD8⁺ no baço e no infiltrado inflamatório de tecido muscular esquelético desses animais. Além disso, estes animais apresentaram uma diminuição do infiltrado inflamatório e um aumento do número e tamanho dos ninhos

de parasitos, sugerindo que, na ausência dos linfócitos B, existiria uma pobre ativação dos linfócitos T CD8⁺ infiltrantes e, conseqüentemente, uma menor resistência à infecção.

A eficácia das respostas imunes mediadas por células contra o parasito é determinada pelo equilíbrio entre a ativação das células T helper tipo 1 (Th1) e T helper tipo 2 (Th2). As células Th1 estimulam a atividade microbicida dos fagócitos, a morte dos micro-organismos ingeridos e induzem a inflamação, através da produção de citocinas pró-inflamatória: IL-1, INF- γ e TNF- α , enquanto, as células Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 que inibem a ativação de macrófagos e suprimem a imunidade mediada pelas células Th1 (ABBAS & LICHTMAN, 2009). Portanto, as citocinas desempenham um papel importante em orquestrar a resposta imune inata e adaptativa na DC.

A Figura 2 descreve o envolvimento das citocinas produzidas por populações de células específicas no desenvolvimento da DC. Após a infecção, é importante produzir citocinas inflamatórias (INF- γ e TNF- α) que ativarão macrófagos a matar parasitos intracelulares (amastigotas). No entanto, estas citocinas favorecem um ambiente inflamatório, que caso não seja controlado, pode levar à destruição tecidual e, assim, ao estabelecimento da forma clínica cardíaca. Por outro lado, se o ambiente inflamatório for controlado pela expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10), isto pode levar a um equilíbrio de respostas, e à manutenção da FIDC. A expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias é encontrada tanto nos pacientes FIDC quanto nos crônicos cardíacos. Porém, há o predomínio de um ambiente inflamatório nos pacientes crônicos cardíacos, enquanto um ambiente anti-inflamatório é predominantemente observado nos pacientes FIDC (DUTRA et al., 2014).

Figura 2 - Resposta imune celular na infecção crônica da doença de Chagas.



Fonte: Obtida e modificada a partir de Dutra et al., 2014

1.2.2 Sistema Purinérgico

1.2.2.1 Sinalização celular

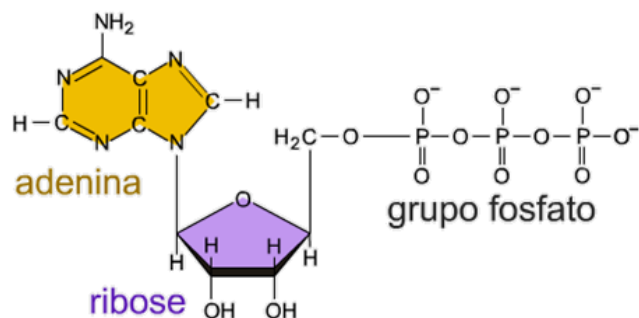
A teoria de que o sistema imune reage exclusivamente ou principalmente a moléculas não próprias, geralmente é aceita e amplamente validada por achados clínicos e experimentais (DI VIRGILIO, 2005). Com o passar do tempo, foi observado que o organismo humano não reage somente a moléculas estranhas ou não próprias, mas também a moléculas passíveis de causar danos aos tecidos, sendo estas moléculas denominadas sinalizadoras de perigo (MEDZHITOV, 2008). Assim, foi sugerido que o sistema imune responde a substâncias que causam dano, ao invés de reagir apenas àquelas que são estranhas (MATZINGER, 1994).

Os sinais de perigo consistem em moléculas ou estruturas moleculares, liberadas ou produzidas por células em condições de estresse ou processos de morte celular. Estes sinais são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos (APCs, *antigen-presenting cells*), que se tornam ativadas e geram sinais co-estimulatórios e, assim, iniciam as respostas imunes e inflamatórias (IYER et al., 2009).

O processo inflamatório ocorre em resposta à morte celular, dano ou mau funcionamento do tecido. Nestas condições, moléculas que em situações normais estariam no citosol das células são liberadas para o meio extracelular e servem como sinalizadores de perigo, denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) (CHEN & NUNEZ, 2010).

Os nucleotídeos, além de serem os constituintes dos ácidos nucléicos, representam a forma armazenada de energia da célula e estão envolvidos na sinalização intracelular bem como na comunicação intercelular. Resultam da fosforilação de nucleosídeos, que são moléculas formadas por uma base nitrogenada (púrica ou pirimídica) e uma pentose, por ação de cinases específicas. Entre os que exercem funções biológicas, estão os nucleotídeos de adenina: ATP, ADP e AMP (Figura 3) (ATKINSON et al., 2006).

Figura 3 - Estrutura de um nucleotídeo de adenina (ATP)



Fonte: Obtida e modificada de <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/bioquimica/bioquimica2.php>

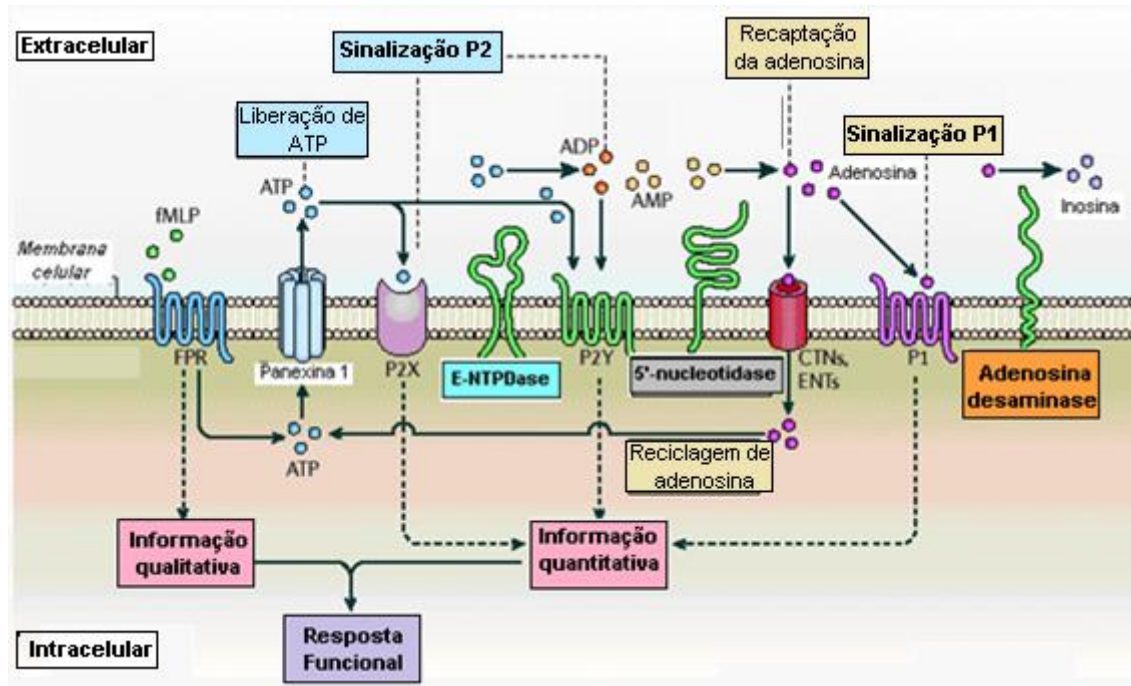
Entre os nucleotídeos de adenina destaca-se, o 5'-trifosfato de adenosina (ATP), que geralmente encontra-se na forma livre no citosol ou armazenado em vesículas, porém, em condições de estresse ou na presença de patógenos é liberado de uma grande variedade de células (GALLUCCI & MATZINGER, 2001). Diferentes mecanismos estão envolvidos na sua liberação para o meio extracelular, como: exocitose mediada por Ca^{2+} , transportadores de membrana ou difusão através de canais de alta permeabilidade. No meio extracelular, o ATP é reconhecido por uma família de receptores específicos denominados receptores purinérgicos, podendo atuar como um indutor da resposta inflamatória, servindo como um DAMP para as APCs (DI VIRGILIO, 2005; ELTZSCHIG et al., 2012).

Os nucleotídeos extracelulares interagem com os receptores purinérgicos da membrana plasmática, desencadeando a sinalização purinérgica. A duração e a magnitude da sinalização purinérgica são regidas por uma rede de ecto-enzimas, incluindo ecto-nucleotidases, que são responsáveis pela metabolização do ATP bem como de outros nucleosídeos tri e difosfatados (DI VIRGILIO et al., 2001). No entanto, esta degradação enzimática traz outro nível de complexidade para sinalização purinérgica, uma vez que os produtos de degradação do ATP também são transmissores químicos importantes, como a adenosina (BURNSTOCK E BOEYNAEMS, 2014).

O acúmulo de adenosina nos locais inflamatórios, além de modular a diferenciação das células dendríticas, também pode afetar as funções dos macrófagos e linfócitos, através da ativação de receptores purinérgicos específicos ou adenosinérgicos (ANTONIOLI et al., 2013). Portanto, devido essencialmente à sua atividade imunossupressora, a adenosina interfere significativamente em estágios mais tardios da inflamação, atuando como um imunoregulador (FREDHOLM et al., 2007; SITKOVSKY & OHTA, 2005). A sinalização da adenosina extracelular, por sua vez, pode ser finalizada através da sua reabsorção para os compartimentos intracelulares via transportadores de nucleosídeos na membrana celular ou da sua degradação à inosina pela ação da adenosina desaminase (ADA) (FREDHOLM et al., 2007; IDZIKO et al., 2014).

Como ilustrado na Figura 4, complexos personalizados de sinalização purinérgica são formados por distintos conjuntos de componentes expressos em diferentes tipos celulares, como plaquetas, linfócitos, células endoteliais entre outros (JUNGER, 2011). A sinalização purinérgica é considerada uma rota comum de comunicação célula-célula envolvida em eventos de curta e longa duração. Seus efeitos demonstram ser dependentes do tipo de célula; das concentrações dos nucleotídeos extracelulares, bem como sua degradação por ecto-enzimas; do tipo de receptor expresso nas células; além da formação de segundos mensageiros (ERLINGE & BURNSTOCK, 2008). Por fim, o sistema purinérgico é fundamental em ambos os contextos fisiológicos e patológicos, sendo seus componentes moleculares considerados como potenciais alvos para novas estratégias terapêuticas (BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014).

Figura 4 – Representação esquemática dos componentes do sistema purinérgico.



Fonte: Obtida e modificada a partir de Junger, 2011.

1.2.2.2 Receptores purinérgicos

Em 1978, dois tipos de receptores purinérgicos foram diferenciados e identificados como P1 e P2, que respondiam seletivamente à adenosina e ao ATP, respectivamente (BURNSTOCK, 1978). Nesta mesma época, dois subtipos de receptores P1 eram reconhecidos (VAN CALKER et al., 1979; LONDOS et al., 1980); e apenas em 1985, dois subtipos de receptores P2 foram distinguidos, baseados na sua farmacologia: P2X e P2Y (BURNSTOCK & KENNEDY, 1985). Porém, foi em 1994 que ocorreu a consolidação da classificação dos receptores P2 em duas grandes famílias, com base na sua estrutura molecular e nos seus mecanismos de ação: a família P2X (ionotrópicos), dos receptores ligados a canais iônicos e a família P2Y (metabotrópicos), dos receptores acoplados à proteína G (ABBRACCHIO & BURNSTOCK, 1994).

Após um crescente desenvolvimento de pesquisas na área de sinalização purinérgica, um total de 19 subtipos diferentes de receptores purinérgicos foram clonados e caracterizados, incluindo sete subtipos de receptores P2X (P2X1-7), oito

subtipos de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) e quatro subtipos de receptores P1 (A1, A2a, A2b e A3) (ABBRACCHIO et al., 2006; BURNSTOCK, 2007; NORTH, 2002; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

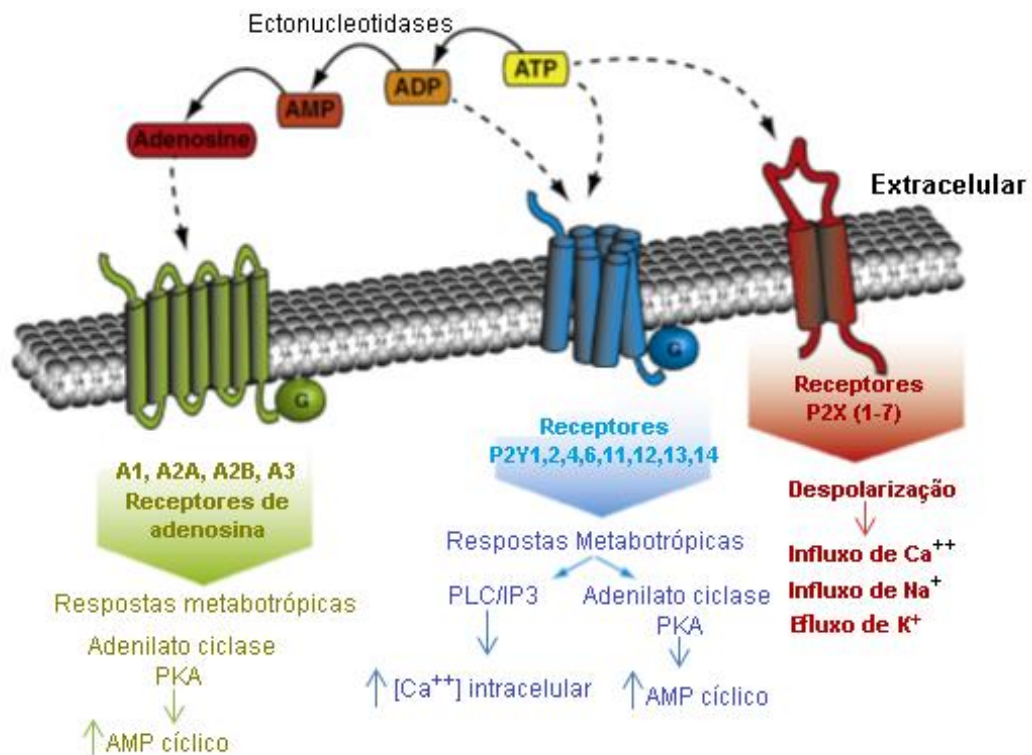
O ATP e seus metabólitos, dependendo de suas concentrações no meio extracelular, são reconhecidos por subtipos específicos dos receptores purinérgicos ancorados à membrana celular. A Figura 5 apresenta a interação entre substrato e receptor, que desencadeia uma série de reações, capazes de gerar uma extensiva rede de cascatas de sinalização intracelular (por exemplo, despolarização celular e produção de segundos mensageiros- AMP cíclico) envolvida em diversos eventos biológicos, incluindo respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (AGTERESCH et al., 1999; BURNSTOCK & KNIGHT, 2004; HOEBERTZ et al., 2003).

A ativação dos receptores P2 é controlada pela ação das ecto-nucleotidases que hidrolisam e regulam a degradação dos nucleotídeos (ex.: ATP) em nucleosídeo (ex.: adenosina), que é responsável pela ativação dos receptores P1 (FREDHOLM et al., 2001; VERZIJL & IJZERMAN, 2011). Fisiologicamente, o balanço entre as concentrações de nucleotídeos extracelulares e a expressão de receptores P2 bem como entre as ecto-nucleotidases e a expressão dos receptores P1 na superfície celular, são responsáveis em determinar a extensão em que a sinalização purinérgica contribuirá para a resposta imune e a resistência do hospedeiro à infecção (COUTINHO-SILVA & OJCIUS, 2012; JUNGER, 2011).

Os receptores P1 e P2 frequentemente demonstram efeitos opostos nos sistemas biológicos. Portanto, quando as sinalizações pró-inflamatórias desencadeadas por receptores P2 são equilibradas por uma sinalização mediada pela adenosina através de receptores P1, pode-se dizer que há um esforço compensatório do organismo a fim de atenuar a inflamação patológica e promover a cura (ELTZSCHIG et al., 2012).

Atualmente, poucas drogas purinérgicas estão no uso clínico ou sendo testadas em ensaios clínicos, devido à limitada disponibilidade de agonistas e antagonistas de subtipos específicos de receptores P1 e P2 (JUNGER, 2011). O crescimento do conhecimento, sobre os eventos de sinalização purinérgica que regulam a resposta imune, fornece incentivo e ideias para o desenvolvimento de novas drogas e terapias para tratamento de doenças inflamatórias e desordens imunes importantes.

Figura 5 – Representação da família de receptores purinérgicos.



Fonte: Obtida e modificada a partir de Baroja-Mazo et al., 2013.

1.2.2.2.1 Receptores purinérgicos P2

Os receptores purinérgicos P2X e os P2Y são sensíveis tanto a purinas quanto a pirimidinas, e exercem diversas ações em monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos e granulócitos (ABBRACCHIO et al., 2006; DI VIRGILIO et al., 2001; NORTH, 2002; RALEVIC & BURSTOCK, 1998).

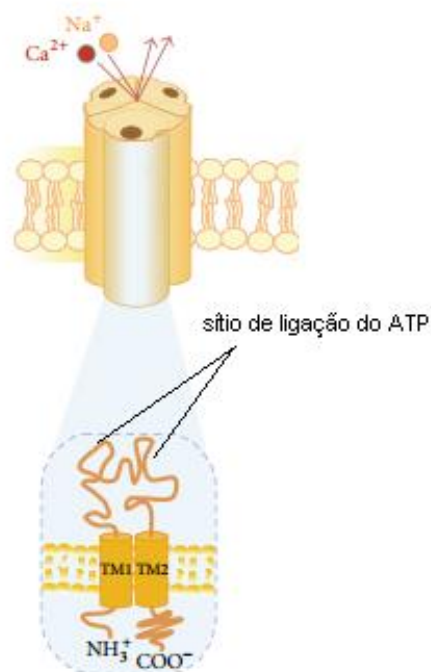
Através da ativação dos diferentes subtipos desses receptores tem-se o início de diversas vias de sinalização que levam à regulação da ativação de fatores de transcrição tais como: fator nuclear κ B (NF- κ B), proteína ativadora 1 (AP-1), fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (ARMSTRONG et al., 2007). Portanto, os receptores P2 têm sido associados à modulação da imunidade por controlar a migração celular (KRONLAGE et al., 2010), a liberação de citocinas (FERRARI et al., 2006), a maturação de células dendríticas (LA SALA et al., 2001), e a resposta imune durante as infecções com patógenos intracelulares (COUTINHO-SILVA et al., 2009; COUTINHO-SILVA & OJCIUS, 2012).

Estudos têm demonstrado que de acordo com as concentrações extracelulares e do subtipo de receptor P2 expresso pelas células imunes, o ATP pode atuar como um agente imunossupressor ou imunoestimulante (DI VIRGILIO et al., 2009).

1.2.2.2.1.1 Receptores P2X

Os receptores P2X são constituídos por 379 a 595 aminoácidos e estão ligados a canais catiônicos (ionotrópicos), que respondem a uma rápida e uma seletiva permeabilidade a cátions mono e divalentes (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) (NORTH, 2002). São oligômeros formados por 3 subunidades, a qual cada uma é formada por uma grande alça extracelular, 2 domínios transmembranas (TMs) e 2 domínios citoplasmáticos (amino e carboxi-terminal). Na sua conformação ativa, as 3 subunidades peptídicas são montadas para formar um canal permeável a cátions, como representado na Figura 6.

Figura 6– Estrutura de um receptor P2X.



Fonte: Obtida e modificada a partir de Skaper et al., 2009.

A forma trimérica do receptor P2X é composta por diferentes subunidades,

que codificadas por genes distintos, são classificadas em P2X1 até P2X7 de acordo com a ordem cronológica de clonagem, sendo que cada subunidade tem propriedades farmacológicas e/ou fisiológicas distintas (KIM et al. 2001). Seis subunidades homoméricas (P2X1-5 e P2X7) e seis subunidades heteroméricas (P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/6 e P2X4/6) foram descritas (STAGG & SMYTH 2010).

Os subtipos de receptores P2X são expressos em diversas células imunes incluindo linfócitos, células NK, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (NORTH, 2002). Todos os subtipos funcionais apresentam uma elevada seletividade pelo ATP em relação aos outros nucleotídeos fisiológicos. A ligação do ATP extracelular é importante para a oligomerização da subunidade, que leva a abertura do poro e o influxo/efluxo de cátions. Cada subunidade é capaz de se ligar a uma molécula de ATP, embora a sensibilidade possa variar dentro da família P2X, como por exemplo, o receptor P2X1 requer níveis nanomolares para sua ativação, enquanto o P2X7 requer milimolares concentrações (NORTH & SURPRENANT, 2000).

O ATP liberado para o meio extracelular pode servir como um sinal fisiológico para comunicação intercelular bem como um sinal nocivo, promovendo a morte celular. Dentre os diferentes efeitos desencadeados pela estimulação de receptores P2X pode-se citar: quimiotaxia, endocitose, proliferação, liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, morte de patógenos intracelulares ou citotoxicidade (BOURS et al., 2006; KHAKH & NORTH, 2006; TRAUTMANN, 2009).

A sinalização purinérgica serve como um mecanismo de amplificação de sinal necessário para o antígeno ser reconhecido pelas células T (JUNGER, 2011). Este processo envolve a formação de uma sinapse imune entre uma célula T e uma APC, composta por uma grande quantidade de moléculas sinalizadoras que são requeridas para a ativação das células T, incluindo moléculas MHC, receptores co-estimulatórios e receptores para células T (TCR), além dos receptores purinérgicos P2X1, P2X4 e P2X7 (BAROJA-MAZO et al., 2013).

1.2.2.2.1.1.1 Receptores P2X7

As observações relacionadas às propriedades bioquímicas e fisiológicas do receptor P2X7 iniciaram a partir da década de 70. Nesta época foi demonstrado que

o ATP extracelular causava degranulação e mudanças morfológicas em mastócitos de rato (CROCKCROFT & GOMPERS, 1979), além de sugerir que a formação de histamina bem como de fosfatidil inositol estava associada à ativação de um receptor, ou melhor, de um receptor para ATP (CROCKCROFT & GOMPERS, 1980). A partir da sua intrigante habilidade de causar permeabilidade reversível na membrana plasmática, foi nomeado de receptor ATP permeabilizante e mais tarde de P2Z (GORDON, 1986).

Posteriormente, foram observadas propriedades bioquímicas e farmacológicas, semelhantes às do P2Z, em diversas células relacionadas ao sistema imune. Em 1996, o receptor de ATP permeabilizante foi clonado de cérebro de rato e nomeado de receptor P2X7 (SURPRENANT, 1996). Apesar de sua homologia com outros receptores P2X, o receptor P2X7 possui características peculiares que o distinguem dos outros membros da família (KIM et al. 2001; STAGG & SMYTH 2010):

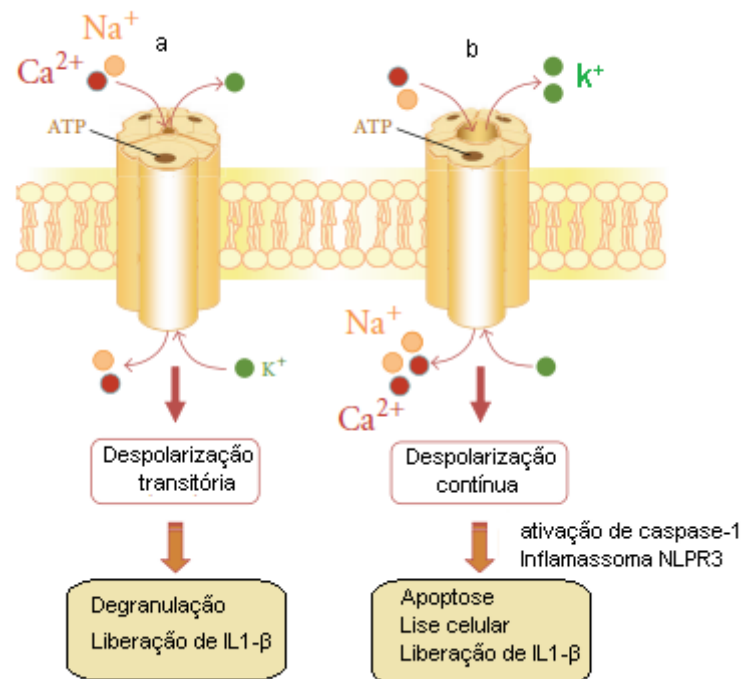
- a) possui uma única subunidade que não heteropolimeriza com outras subunidades P2X;
- b) a ativação do receptor homomérico requer concentrações de ATP que são $\pm 10-100$ vezes maiores do que as necessárias para ativar os outros receptores P2X, sendo que sua ativação plena é atingida em concentrações milimolares de ATP;
- c) possui uma cauda carboxi-terminal maior do que os outros P2XR, além de uma série de polimorfismos.

O P2X7 é expresso principalmente nas células derivadas da medula óssea, incluindo monócitos, macrófagos e linfócitos e pode desencadear a morte de células e de patógenos, além da regulação da resposta inflamatória (MILLER et al., 2011). Em condições fisiológicas, a concentração de cátions divalentes extracelulares como Ca^{2+} e Mg^{2+} , parece alterar a afinidade do ATP ao receptor P2X7, mantendo a sua atividade baixa, prevenindo assim, uma desnecessária permeabilidade celular e formação de poro (JIANG, 2009). A estimulação transitória (< 10 segundos) do receptor P2X7 através da ligação do ATP resulta numa rápida e reversível abertura de um pequeno canal para cátions mono e divalentes (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) (NORTH, 2002), desencadeando efeitos como despolarização celular, degranulação e formação de vesículas na membrana, além da ativação de sinalizações intracelulares que irão contribuir para o processo inflamatório como fosfolipase A2,

fosfolipase D, proteína cinase mitógeno ativada (MAPK) e fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Figura 7a) (SKAPER et al., 2009).

No entanto, em condições patofisiológicas, como inflamação ou infecção, citocinas pró-inflamatórias podem aumentar a sua expressão bem como sua sensibilidade ao ATP (HUMPHREYS & DUBYAK, 1998). Nestas condições, uma diminuição dos níveis de Ca^{2+} e Mg^{2+} e um aumento das concentrações de ATP no meio extracelular levam à ativação do receptor P2X7, que durante um longo período, pode ter seu canal iônico convertido em um grande poro não seletivo na membrana (SMART et al., 2002), sendo permeável a solutos hidrofílicos entre 314 a 900 Da (como brometo de etídio ou YO-PRO-1), e conseqüentemente levar à morte celular (Figura 7b) (WHITE & BURNSTOCK 2006; STAGG & SMYTH, 2010).

Figura 7 – Ativação do receptor P2X7 pelo ATP.



Fonte: Obtida e modificada a partir de Skaper et al., 2009.

O aumento da concentração de cálcio citoplasmático nas células suscetíveis, a partir da ativação do receptor P2X7 serve como um sinal precoce do início da apoptose (ORRENIUS et al., 1989). Assim, o ATP liberado durante as fases iniciais da apoptose, atrai monócitos e macrófagos para garantir uma eficiente eliminação

das células apoptóticas. Portanto, através do efluxo de K^+ e uma subsequente diminuição da concentração de K^+ intracelular, tem-se a ativação da NLRP3 e conseqüentemente a formação do inflamassoma-NLRP3. O inflamassoma-NLRP3, por sua vez, desencadeará a ativação da caspase-1 e o conseqüente processo de liberação de citocinas pró-inflamatórias IL1- β e IL-18, que é a função mais bem caracterizada do P2X7 (DI VIRGILIO, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado que o receptor P2X7 desempenha importante papel na imunoregulação bem como na patogênese de condições inflamatórias, como artrite reumatoide, doença de Alzheimer, doenças neuropsiquiátricas e cardiovasculares (BASSO et al., 2009; ESLICK et al., 2009; LABASI et al., 2002; PARVATHENANI et al., 2003; SOLLE et al., 2001). Portanto, o desenvolvimento de antagonistas seletivos para o receptor P2X7 são promissoras moléculas com potencial anti-inflamatório (PELEGRIN et al., 2008). Além disto, o receptor P2X7 apresenta diversos polimorfismos relacionados a alteração de sua função (CASELEY et al., 2014). Estudos de associação genética têm revelado ligação entre alguns destes polimorfismos e resistência ou susceptibilidade a distúrbios do humor, doenças ósseas e doenças infecciosas (FULLER et al., 2009)

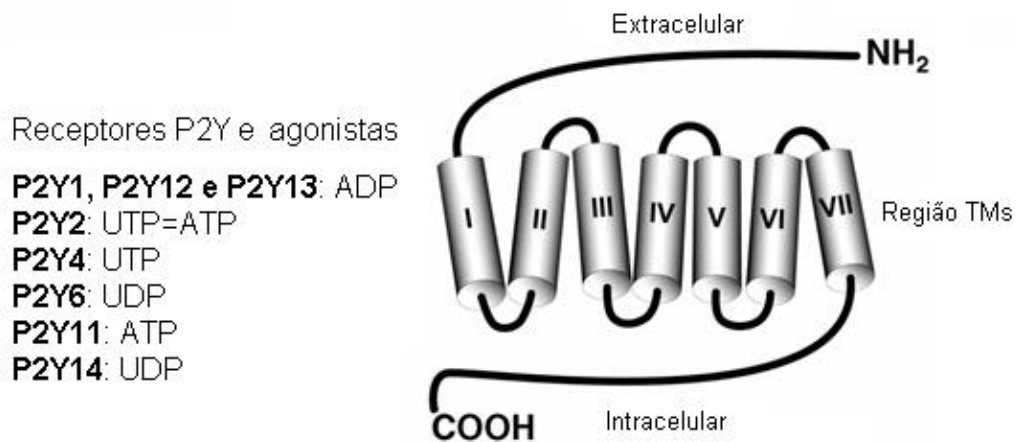
1.2.2.2.1.2 Receptores P2Y

Os receptores P2Y são considerados receptores metabotrópicos, por estarem acoplados à proteína G. Pertencem a uma superfamília de receptores compostos por: sete regiões TMs, uma região amino terminal extracelular e uma região carboxi terminal intracelular, como mostra a Figura 8. São constituídos por 328 a 379 aminoácidos, com uma massa molecular de 41 a 53 Kd após a sua glicosilação (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Nas regiões TMs 3, 6 e 7 estão os resíduos de aminoácidos com carga positiva, que formam o sítio de ligação dos nucleotídeos (ABBRACCHIO et al., 2006).

Estão funcionalmente acoplados a distintas proteínas G, portanto, dependendo do tipo específico de proteína G ligado ao receptor, há a indução de diferentes eventos de sinalização intracelular como: ativação da fosfolipase C (PLC), do sistema trifosfato inositol (IP3), aumento do cálcio intracelular e ativação da produção do AMP cíclico intracelular (ABBRACCHIO et al., 2006). Os receptores P2Y podem se subdividir em grupos, dependendo de sua especificidade (Figura 8):

P2Y1 e P2Y11 são específicos para purinas, P2Y4 e P2Y6 são específicos para pirimidinas, P2Y2 apresenta seletividade mista, P2Y12 e P2Y13 respondem apenas à ADP e P2Y14 à UDP (BOURS et al., 2006). As suas características de ligação, exemplificam a complexidade da sinalização mediada por receptores P2Y, em que o ATP é o ligante endógeno mais abundante e melhor caracterizado para a maioria desses subtipos de receptores P2 (JACOBSON et al., 2012). No entanto, a baixas concentrações extracelulares, o ATP é o único agonista para o P2Y11, e a altas concentrações ele pode funcionar como um agonista parcial para P2Y1 e P2Y13, ou como um antagonista para P2Y4 e P2Y12 em humanos (ABBRACCHIO et al., 2006; JACOBSON et al., 2012). Diversas células imunes expressam os receptores P2Y, incluindo os linfócitos que expressam RNA mensageiro para todos os subtipos de receptores P2Y conforme Wang e colaboradores (2004).

Figura 8 – Estrutura dos receptores P2Y e seus agonistas específicos.



Fonte: Obtida e modificada a partir de Lazarowski & Boucher, 2001.

Além disto, os receptores P2Y podem ser divididos em dois subgrupos funcionais: o primeiro grupo, que inclui P2Y1, 2, 4, 6 e 11 é acoplado a proteínas G_q/G₁₁ que leva à ativação das vias de PLC/IP3 bem como a mobilização do cálcio intracelular; e o segundo grupo, inclui P2Y12, 13 e 14 é acoplado às proteínas G_{i/o}, que inibe a adenilato ciclase (YANG & LIANG, 2012). Atualmente, diversos antagonistas seletivos dos receptores P2Y1, P2Y12 e P2Y13 têm sido

desenvolvidos pela indústria farmacêutica (ABBRACHIO et al., 2006) e aplicados na terapêutica clínica. Apesar de poucos desenvolvimentos terapêuticos em relação aos receptores P2, a sua importância e aplicabilidade na clínica pode ser exemplificada pelo Clopidogrel (Plavix; Bristol-Myers Squibb/Sanofi-Aventis). Considerada uma droga purinérgica muito bem aceita pela classe médica na terapia de pacientes com aterosclerose e síndrome coronariana aguda, por atuar como um antagonista do receptor P2Y₁₂ em plaquetas, prevenindo os eventos isquêmicos vasculares (PRICE, 2009).

1.2.2.2.1.2.1 Receptores P2Y₁₁

Entre os receptores P2, o subtipo P2Y₁₁ tem características peculiares:

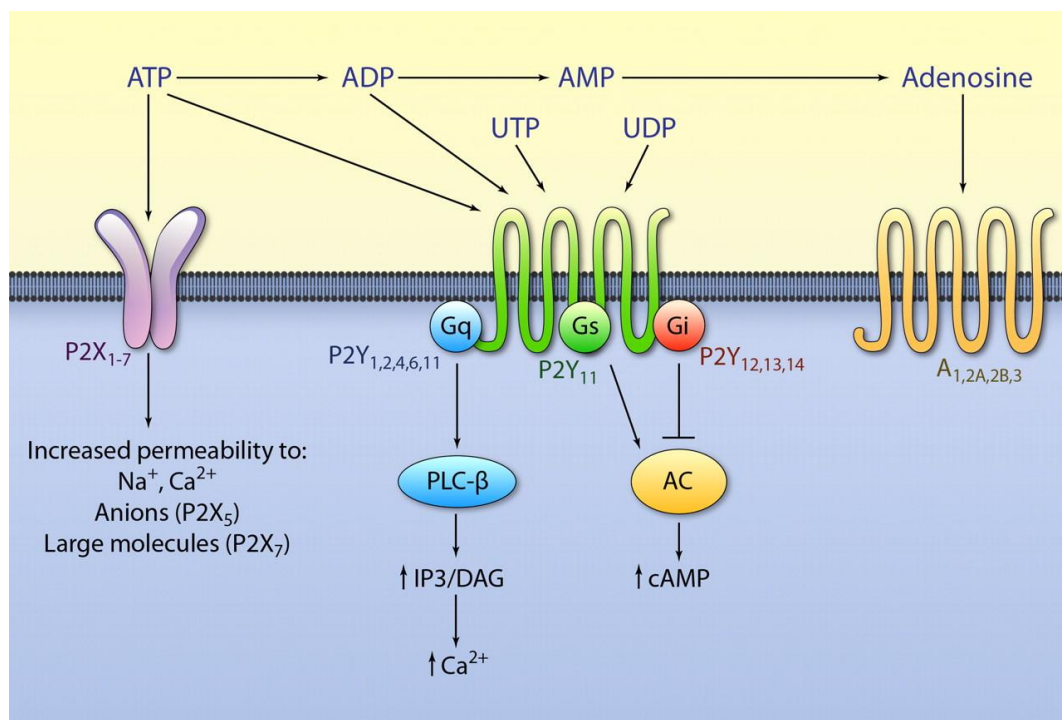
- a) sua ativação está associada a um aumento nas concentrações de AMPc intracelular (SCHNURR et al., 2003; WILKIN et al., 2001);
- b) não há um gene ortólogo do P2Y₁₁ em roedores;
- c) se liga tanto à proteína G_q quanto à G_s, e conseqüentemente, ativa as duas vias intracelulares, PLC e adenilato ciclase, respectivamente, conforme a Figura 9 (YANG & LIANG, 2012).

O ATP extracelular é o principal agonista fisiológico do receptor P2Y₁₁ (CONIGRAVE et al., 2001; DI VIRGILIO et al., 2001), porém, a ativação também pode ocorrer com NAD⁺ extracelular. Na presença de um dano tecidual, o ATP extracelular será um sinalizador de perigo e desencadeará respostas imunes e inflamação. No entanto, tem sido sugerido um papel mais complexo ao ATP na regulação dessas respostas (BOEYNAEMS & COMMUNI, 2006; DI VIRGILIO et al., 2009), por também possuir a capacidade de inibir diversas funções imunes de diferentes subtipos de leucócitos, como células dendríticas, células NK e linfócitos T.

Crescentes evidências têm demonstrado que o receptor P2Y₁₁ é o principal mediador desses efeitos imunossupressores do ATP extracelular, através do aumento das concentrações de AMPc intracelular (VITIELLO et al., 2012). Portanto, o receptor P2Y₁₁ acoplado à proteína G_s ao ser estimulado por baixas concentrações de ATP, ativa a adenilato ciclase que induz a produção de AMPc a partir do ATP intracelular (Figura 9). Na seqüência, o AMPc pode seguir dois caminhos: ser hidrolisado à AMP por fosfodiesterases (PDE) ou estimular a proteína cinase A (PKA). A ativação da PKA pode afetar uma ampla variedade de eventos

celulares por fosforilação de proteínas citoplasmáticas e nucleares (KOPPERUD et al., 2003), incluindo a fosforilação da proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB) (TAN et al., 2007). O CREB é um fator de transcrição que regula diversas respostas celulares, incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação. O CREB é induzido por uma variedade de fatores de crescimento e sinais inflamatórios e medeia a transcrição de genes que contêm o elemento responsivo ao AMPc (CRE), incluindo IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- α . Em adição, tem sido proposto que o CREB fosforilado diretamente inibe a ativação do NF- κ B por bloquear a ligação do CREB ao complexo NF- κ B, portanto limitando as respostas pró-inflamatórias (WEN et al., 2010).

Figura 9 – Receptor P2Y11 e as vias de sinalização intracelular.



Fonte: Obtida e modificada a partir de Yang & Liang, 2012.

Os efeitos imunossupressores do ATP extracelular, desencadeados a partir do aumento da produção de AMPc intracelular via P2Y11, foram evidenciados em diversos estudos, como por exemplo, na regulação da resposta imune por células dendríticas. A ativação do receptor P2Y11 em células dendríticas, mediada pelo ATP extracelular, foi capaz de bloquear a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 e IL-12, enquanto a produção de citocinas anti-inflamatórias

como IL-10 e do antagonista do receptor para IL-1 não foram afetadas ou estavam aumentadas (HORCKMANS et al., 2006; LA SALA et al., 2001). Além disto, a ativação deste receptor mostrou envolvimento na inibição da proliferação de linfócitos T, a partir da indução da produção de elevadas quantidades de trombospondina-1 que em sinergia com IFN- γ aumenta a produção de indoleamina 2,3-deoxigenase (MARTEAU et al., 2005). Foi reportado também, que a ativação do receptor P2Y11 nas células dendríticas é capaz de inibir a produção da IL-27 (SCHNURR et al., 2005), que tem a capacidade de atenuar a ativação de células T, sugerindo um envolvimento na limitação da hiperatividade imune mediada por células T (DUHANT et al., 2002).

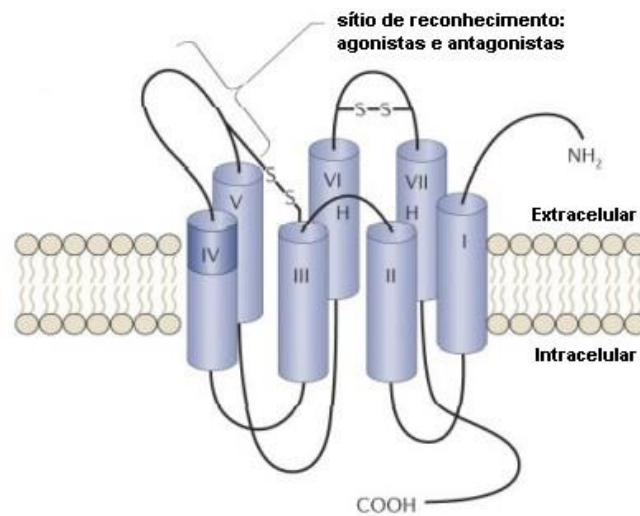
No entanto, diversas respostas regulatórias, atribuídas ao aumento do AMPc intracelular, foram demonstradas pela ativação do receptor P2Y11 em outras células imunes, como as células NK e os linfócitos T. Em concentrações micromolares, o ATP extracelular foi capaz de inibir a proliferação e a quimiotaxia bem como a citotoxicidade das células NK (GORINI et al., 2010; MILLER et al., 1999). Além disto, inibiu a expressão das citocinas, IFN- γ e IL-2, e a proliferação dos linfócitos T humanos pelo mesmo mecanismo (DUHANT et al., 2002).

1.2.2.2 Receptores P1 ou adenosinérgicos

A família P1 dos receptores purinérgicos foi descrita pela primeira vez em 1989 e compreende quatro subtipos: A1, A2A, A2B e A3 (LIBERT et al., 1989; FREDHOLM et al., 2001; COBB & CLANCY, 2003). Estes receptores assim como os receptores P2Y, são metabotrópicos e apresentam uma topologia típica desta superfamília: sendo compostos por sete regiões TMs (com aproximadamente 21 a 28 aminoácidos hidrofóbicos), uma região amino terminal extracelular e uma região carboxi terminal intracelular conforme a Figura 10 (BURNSTOCK, 2007).

São caracterizados por apresentar distribuição tecidual e perfis farmacológicos peculiares, sendo capazes de participar das respostas imunes e inflamatórias em tecidos danificados, desempenhando um papel crucial nos efeitos benéficos induzidos pela adenosina, principalmente em casos de exacerbação dessas respostas (JACOBSON & GAO, 2006).

Figura 10 – Estrutura do receptor P1.



Fonte: Obtida e modificada a partir de Burnstock, 2007.

Os receptores adenosinérgicos estão acoplados à via de sinalização da adenilato ciclase e à modulação das concentrações intracelulares de AMPc. Os receptores A1 e A3 estão acoplados à proteína $G_{i/o}$ ou $G_{q/11}$, desencadeando efeitos inibitórios na adenilato ciclase, e conseqüentemente promovendo a ativação celular. Em contrapartida, os receptores A2A e A2B estimulam a produção do AMP cíclico, e são capazes de suprimir as respostas celulares através da proteína G_s (RESHKIN et al. 2000; FREDHOLM et al., 2001; BURNSTOCK, 2007). O segundo mensageiro AMPc interage com diferentes moléculas efetoras, como a proteína cinase A (PKA), a proteína de troca diretamente ativada por AMPc (Epac) e a fosfatidilinositol-3-cinase (IP3K). Essas proteínas fosforilam diferentes fatores de transcrição e outras cinases, como a cinase regulada por sinal extracelular (ERK) levando, entre inúmeros efeitos, à inibição da geração de mediadores inflamatórios, da expressão de CD40 e da fagocitose (SCHULTE & FREDHOLM, 2003; SEREZANI et al., 2008).

O receptor A2A tem maior afinidade pela adenosina, seguido pelos receptores A2B, A1 e A3, nessa ordem. Como os receptores A1 e A3, possuem menor afinidade, serão ativos somente na presença de altas concentrações de adenosina extracelular, com o objetivo de regular a sua ação. Portanto, pode-se dizer que a sinalização da adenosina, através da ativação dos receptores A2A e A2B com a proteína G_s , é contra balanceada pela sinalização resultante do acoplamento dos receptores A1 e A3 com a proteína G_i , garantindo outro nível de controle no sistema

imune, por prevenir a inibição prematura das células do sistema imune pelos receptores A2 (STIKOVSKY e OHTA, 2005). Em geral, na presença de dano tecidual, e conseqüentemente de altas concentrações de adenosina, os seus efeitos anti-inflamatórios, via receptores A2A, dominam os efeitos imunoestimulatórios dos receptores A1 (CRONSTEIN, 1994; HASKÓ & CROSTEIN, 2004).

Diferentemente dos receptores P2, uma maior variedade de drogas específicas está disponível para a modulação dos receptores P1 ou adenosinérgicos. (JACOBSON & GAO, 2006, BARALDI et al., 2008; HASKÓ et al., 2008). Neste caso, muitas dessas drogas são derivadas da cafeína e tem sido extensamente testadas por serem efetivas no tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas em ensaios pré-clínicos. Com isto, várias outras drogas estão sendo testadas em relação a sua eficácia em doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias (HASKÓ et al., 2008).

1.2.2.2.1 Receptores A2A

Vários estudos sugerem que receptores A2 funcionam como se fossem sensores de atividade pró-inflamatória e agem como bloqueadores do excesso de resposta imune e inflamação (ELTZSCHIG et al., 2013; FLOGEL et al., 2012; OHTA & SITKOVSKY, 2001; SCHINGNITZ et al., 2010). A ativação dos receptores A2A e A2B (acoplados a proteína G- família Gs) pela adenosina leva ao aumento dos níveis de AMP cíclico (AMPC) intracelulares pela ativação da enzima adenilato ciclase, inibindo a atividade imune da célula (RASKOVALOVA et al., 2005). O receptor A2A possui alta afinidade pela adenosina, ao contrário do receptor de baixa afinidade A2B, sugerindo que eles podem ser ativados sequencialmente, dependendo do acúmulo de adenosina no meio extracelular. Isso pode permitir um incremento gradual do sinal inibitório, gerando uma inibição parcial da resposta imune sem interromper totalmente, por exemplo, o processo de destruição de um patógeno (SITKOVSKY e OHTA, 2005). Esse efeito regulador se dá principalmente pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-12 e TNF- α (HASKO et al., 2000; LAPPAS et al., 2005) e aumento da produção de IL-10, com caráter anti-inflamatório (PANTHER e cols., 2003), por células envolvidas na resposta imune.

A ativação de receptores A2A limita a lesão tecidual inflamatória ou isquêmica

por inibir os processos inflamatórios em neutrófilos, plaquetas, macrófagos e células T. Os receptores A2A estão presentes em uma ampla variedade de tecidos, incluindo o tecido nervoso e o sistema imune periférico, e em diferentes níveis de expressão: significantes níveis em neurônios e células periféricas como linfócitos e neutrófilos, e baixos níveis em células gliais (FREDHOLM et al., 2007).

Em particular, a estimulação dos receptores A2A tem apresentado efeito diferencial na liberação de citocinas pró-inflamatórias (BARALDI et al., 2008; CAPPECHI et al., 2005). Pacientes com artrite reumatoide demonstraram que a sua resposta inflamatória e clínica são reguladas através da ativação dos receptores A2A e A3 pela adenosina, por inibir o fator de transcrição NF- κ B, e consequentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6, (FORREST et al., 2005; VARANI et al., 2011). Além disto, prévios estudos têm demonstrado que os efeitos anti-inflamatórios exercidos pelo fármaco Metotrexato, muito utilizado na terapêutica de doenças inflamatórias crônicas, ocorrem pelo aumento dos níveis de adenosina extracelular através da estimulação de receptores A2A e A3 (MONTESINOS et al., 2003).

1.2.3 *Trypanosoma cruzi* e o sistema purinérgico

Como descrito anteriormente, os nucleotídeos extracelulares atuam como moléculas sinalizadoras na resposta imune dos hospedeiros, porém podem ser hidrolisados por ecto-nucleotidases do hospedeiro e de parasitos. A ação de enzimas do parasito, por sua vez, pode interferir em vários eventos biológicos importantes do hospedeiro, tais como agregação plaquetária dependente de ADP e resposta inflamatória dependente de ATP (BOURS et al., 2006; DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; DE SOUZA et al., 2010; MAIOLI et al., 2004; SANSOM et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que genes da enzima NTPDase são expressos não somente em vertebrados, mas também em invertebrados, plantas, fungos e importantes patógenos humanos, como *Herpetomonas muscarum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis*, *Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*. E uma correlação entre a capacidade de hidrólise de nucleotídeos extracelulares por parasitos e mecanismos de virulência, sobrevivência e adesão celular tem sido apresentada por diversos estudos (ALVES-FERREIRA et

al., 2003; BERMUDEZ et al., 1994; BERREDO-PINHO et al., 2001; DE JESUS et al., 2002; FIETTO et al., 2004; PENIDO et al., 2007).

Informações relacionadas ao conhecimento bioquímico, genético e da biologia celular/molecular do *T. cruzi*, incluindo o sequenciamento do seu genoma, tem contribuído para a identificação de um amplo número de alvos biológicos promissores para a ação de drogas com potencial terapêutico. Entre eles pode-se destacar o metabolismo de purinas e a síntese de nucleotídeos, uma vez que os tripanossomatídeos são parasitos auxotróficos para purinas e deficientes na via de recuperação desta base. Diversas proteínas envolvidas nessa via metabólica são alvos para drogas, como: hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) (NAKAJIMA-SHIMADA et al., 1996), dihidrofolato redutase (KHABNADIDE et al. 2005), pteridina redutase e dihidroorotato desidrogenase (NARA et al., 2005). No mercado, o Alopurinol, uma droga utilizada no tratamento da gota em humanos, demonstrou ser ativo em diferentes modelos animais para a fase aguda da doença de Chaga, agindo como um análogo de purina, no entanto, tem sido descritas diferenças de susceptibilidade à droga entre as diversas cepas de *T. cruzi* (AVILA et al., 1984), além de relatos conflitantes quanto à sua eficácia terapêutica em humanos (APT et al., 2005).

Ainda há poucas informações de como o ATP extracelular ou os receptores purinérgicos contribuem para a resposta imune contra a infecção com o *T. cruzi*. Um dos estudos *in vitro*, durante a fase aguda da DC, demonstrou o envolvimento do ATP extracelular na atrofia do timo induzida pela infecção com o *T. cruzi*. O ATP extracelular, por sua vez, foi capaz de aumentar a permeabilização da membrana plasmática, levando à morte dos timócitos duplamente positivos CD4⁺/CD8⁺ (MANTUANO-BARRADAS et al., 2003). Posteriormente, ensaios *in vivo* de atrofia do timo na DC sugeriram que o receptor P2X7 não teria um papel central neste processo, mas sim uma interação entre receptores P2X e P2Y (CASCABULHO et al., 2008). Recentemente, Meuser-Batista e colaboradores (2011) descreveram um efeito do receptor P2X7 na migração de mastócitos em direção ao processo inflamatório no tecido cardíaco, sugerindo relação com a redução na resposta imune inata, através de estudos experimentais com animais infectados com *T. cruzi* e deficientes do receptor P2X7.

No entanto, há evidências sobre a associação entre a modulação da sinalização purinérgica do hospedeiro e a infecção por outros parasitos

intracelulares, como *Leishmania amazonensis* e *Toxoplasma gondii* que podem contribuir para o entendimento na infecção pelo *T. cruzi*. Estudos têm demonstrado que a infecção de macrófagos com *L. amazonensis* modula a expressão de receptores P2X e P2Y, a fim de controlar a infecção. Enquanto o ATP extracelular pode mediar às respostas imunes do hospedeiro através da ativação do inflamassoma via receptor P2X7; os nucleotídeos pirimidínicos (UTP) podem contribuir na defesa do hospedeiro através da sua ligação a receptores P2Y, induzindo a produção de mediadores da inflamação, como EROs e NO (CHAVES et al., 2009; MARQUES-DA-SILVA et al., 2011). Ao contrário dos receptores P2, foi observado que na leishmaniose a ativação do receptor A2B em células dendríticas, pode contribuir para o estabelecimento da infecção, como um mecanismo de escape do parasito das respostas imunes do hospedeiro (FIGUEIREDO et al., 2012). Na toxoplasmose, a ativação do receptor P2X7 em macrófagos pelo ATP demonstrou estar envolvida na eliminação do *T. gondii*, através da produção de EROs e apoptose das células infectadas (CORREA et al., 2010; LEES et al., 2010). No entanto, é sugerido que há correlação entre a produção de EROs induzida pelo ATP e a ativação da caspase-1 mediada pelo inflamassoma-NLPR3 e secreção de IL-1 β , como ocorre em outras infecções por parasitos intracelulares (SPOONER & YILMAZ, 2011).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de resposta imune bem como a expressão dos receptores purinérgicos P2X7, P2Y11 e A2A em linfócitos de pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas.

1.3.2 Objetivos Específicos

A partir de um estudo de caso-controle, analisar em pacientes na FIDC e comparar com indivíduos saudáveis, os parâmetros abaixo:

- A contagem total e diferencial de leucócitos periféricos;
- A determinação sérica da proteína C reativa;
- O perfil da resposta imune através dos níveis séricos de citocinas referentes às respostas Th1, Th2 e Th17: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) e IL-17;
- A expressão gênica e proteica do receptor purinérgico pró-inflamatório P2X7 em linfócitos periféricos;
- A atividade citotóxica do receptor purinérgico P2X7 em linfócitos periféricos;
- A expressão gênica dos receptores purinérgicos P2Y11 em linfócitos periféricos;
- A expressão gênica dos receptores purinérgicos A2A em linfócitos periféricos.

MANUSCRITOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois manuscritos. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se compondo os próprios manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos: *Microbial Pathogenesis* (Manuscrito I) e *Human Immunology* (Manuscrito II).

Manuscrito I: Evaluation of P2x7 receptor' expression in peripheral lymphocytes and immune profile from patients with indeterminate form of Chagas disease.

Manuscrito II: P2Y11 and A2A mRNA expression profile in peripheral lymphocytes from patients with indeterminate form of Chagas disease.

2 MANUSCRITO I

EVALUATION OF P2X7 RECEPTOR EXPRESSION IN PERIPHERAL LYMPHOCYTES AND IMMUNE PROFILE FROM PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF CHAGAS DISEASE

Viviane do Carmo Gonçalves Souza^a, Joabel Tonello dos Santos^b, Fernanda Licker Cabral^a, Fernanda Barbisan^c, Maria Isabel Azevedo^a, Luiz Felipe Dias Carli^a, Sonia de Ávila Botton^d, Jeandre Augusto dos Santos Jaques^e, Daniela Bitencourt Rosa Leal^a

¹ Department of Microbiology and Parasitology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

² Department of Large Animal Clinic de Clínica, Rural Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

³ Department of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

⁴ Department of Preventive Veterinary Medicine, Rural Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

⁵ Center of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79.070-900, Brazil

Corresponding author:

Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal (dbitencourtrosaleal@gmail.com)

Laboratory of Experimental and Applied Immunobiology

Department of Microbiology and Parasitology

Health Sciences Center

Federal University of Santa Maria (UFSM), Box 20 – Room 4102, Brazil.

Phone: + 55 55 3220 9581- 3220 9383

EVALUATION OF P2X7 RECEPTOR EXPRESSION IN PERIPHERAL LYMPHOCYTES AND IMMUNE PROFILE FROM PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF CHAGAS DISEASE

Abstract

Chagas disease (CD) is caused by *Trypanosoma cruzi*, an intracellular protozoan which is a potent stimulator of cell-mediated immunity. In the indeterminate form of CD (IFCD) a modulation between pro- and anti-inflammatory responses establishes a host-parasite adaptation. It was previously demonstrated that purinergic ecto-enzymes regulates extracellular ATP and adenosine levels, influencing in immune and inflammatory processes during IFCD. In inflammatory sites ATP, as well as its degradation product, adenosine, function as signaling molecules and immunoregulators through the activation of purinergic receptors. In this work, it was analyzed the gene and protein expression of P2X7 purinergic receptors in peripheral lymphocytes and serum immunoregulatory cytokines from IFCD patients. No significant differences between groups were observed neither in gene expression of P2X7 receptor nor in serum cytokines levels IL-2, IL-10, IL-17 and IFN- γ . IFCD group showed significantly higher IL-4 and IL-6 levels than control group while TNF- α level was significantly lower in IFCD patients. These results suggest that immune profile from IFCD patients displays anti-inflammatory characteristics, consistent with the establishment of an immunomodulatory response. In addition, it was observed that a modulation ATP-mediated P2X7R signaling pathway does not occur in the presence of IFCD-induced Th2-cytokines profile. However, it is speculated that others purinergic receptors may be involved in the regulatory mechanisms of IFCD patients. Further study on biochemical and molecular of purinergic signaling pathways in IFCD may be useful to understand the mechanisms responsible for the control of CD clinical manifestations.

Keywords: Chagas disease, lymphocytes, P2X7, cytokines.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi, an intracellular protozoan, is the causative agent of Chagas disease (CD) and a potent stimulator of host cell-mediated immunity. In humans, immune responses are mounted to control infectious agents, soon after their infection. Thus, well-balanced, adaptive immune response plays a critical role in maintaining control of parasite replication besides minimizing immune-mediated pathology, contributing to the development of indeterminate form of Chagas disease (IFCD) [1]. Studies which elucidate mechanisms involved in the control and/or exacerbation of cellular responses to infection by *T. cruzi*, provide important information toward possible therapeutic strategies in order to prevent clinical manifestations of CD.

The purinergic signaling network is involved in regulation of inflammatory and immune responses through its core constituents, adenosine 5'-triphosphate (ATP) and its metabolites [2]. At sites of inflammation, these biomolecules, are released by activated or dying cells and may play an agonistic effect through P2 receptors (P2Rs). ATP released to the extracellular environment can serve as a physiological signal for intercellular communication as well as a noxious signal that promotes cell death. It acts modulating a variety of cellular functions by activating ionotropic P2X or metabotropic P2Y receptors according to its extracellular concentrations [3,4]. P2X7R is a member of the P2X (1-7) family of purinergic receptors, and when activated affects multiple types of membrane transport processes in leukocytes and epithelial cells. It promotes the influx of calcium ions and efflux of potassium ions, regulating the activation of T lymphocytes and consequently the modulation of pro-inflammatory cytokines production [5]. Its expression is regulated by IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α and INF- γ , among other factors [6].

A recent work of our group has suggested that alterations in the purinergic system ecto-enzymes activities (E-NTPDase and E-ADA) on lymphocytes participate in the maintenance of balance between parasitism and tissue integrity in IFCD patients by mechanisms involved in the ATP metabolism which generates an anti-inflammatory environment, controlling pro- and anti-inflammatory events [7]. Changes in the expression of purinergic receptors together with alteration in the release of pro and anti-inflammatory mediators could be implicated in the adaptation of host to parasite, thus preventing clinical progress of disease. Therefore, in this investigation,

it was assessed the expression and function of P2X7R in lymphocytes of IFCD patients to analyze its possible association to the profile of cytokines measured in these patients.

2. Material and methods

2.1 Study population

The population consisted of 30 participants carefully selected from Federal University of Santa Maria Hospital, divided in two groups: control group, composed by 5-18 healthy subjects (50.44 ± 2.12 years old; $n=18$); and IFCD group, with 5-12 IFCD patients (53.43 ± 2.90 years old; $n=12$), depending on the assay performed. The IFCD group consisted of patients with antibodies to *T. cruzi* as detected by previous serology performed. The clinical and physical examination revealed that all IFCD patients were asymptomatic, with normal conventional electrocardiograms and unaltered radiological heart, esophagus and colon images according to criteria defined in the Meeting of applied research in CD held in Minas Gerais, Brazil [8]. The non-infected control group consisted of individuals with negative serology for *T. cruzi*. The distribution of gender was similar between the two groups (IFCD: 5 men and 7 women; control: 7 men and 11 women) and all participants showed a hemogram compatible with their age and gender (data not shown). Any pharmacological treatment during the last 30 days before the beginning of the experiment and subjects with altered blood pressure, diabetes mellitus, alcoholism, cigarette smoking, autoimmune disease and immunodeficiency were considered exclusion criteria. Informed written consent was obtained from all participants. This work was approved by *Human Research Ethics Committee* from Federal University of Santa Maria, Brazil, under number 23081.008343/2009-10.

2.2 Isolation of lymphocytes from human blood and protein determination

Lymphocytes-rich mononuclear cells were isolated from peripheral human blood by centrifugation on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum [9]. The percentage of lymphocytes was superior to 96% as previously outlined [10]. It was used serum albumin as standard to measurement of proteins by the Coomassie Blue method, as described by Bradford [11].

2.3 Isolation of total RNA

Total cytoplasmic ribonucleic acid (RNA) from peripheral lymphocytes was extracted using QIAshredder and RNeasy kit (Qiagen, Crawley, UK). RNA concentration and purity were measured on Nano-Drop ND 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) by absorbance at 260 nm. Total RNA was stored at -80°C prior to cDNA synthesis.

2.4 Reverse transcription of total RNA to cDNA

Total purified RNA was first treated with desoxyribonuclease (Invitrogen™) at 37°C for 5 minutes, followed by heating to 65°C for 10 minutes. One µg of RNA template was used per each RNA-to-cDNA reaction. The subsequent cDNA synthesis was carried at 37°C for 60 minutes. The reaction was terminated by incubation at 93°C for 5 minutes, using the PTC 100™ thermocycler.

2.5 P2X7R quantification by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

The detection and quantification of DNA sequences for P2X7 purinergic receptor was performed using *Platinum® SYBR® Green* qPCR SuperMix (Invitrogen™) by StepOnePlus™ (Applied Biosystems, USA). The sequences of primers were obtained of literature [12] and then they were synthesized by Invitrogen™ (Table 1). Common thermal cycling parameters (3 min at 95°C, 40 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 53°C, and 30 sec at 72°C) were used to amplify each transcript. Samples were run in duplicate and expressed in relation to GAPDH (internal control of integrity of the samples). The melting-curve analyses were performed to verify product identity. Data were normalized to a calibrator sample and relative values calculated with a modified delta-delta cycle threshold method that incorporates correction for amplification efficiency [13].

2.6 P2X7 analysis by western blot assay

For Western blotting assays, the protein was determined by colorimetric assay [11], was diluted (1:1, v:v) in the Bio-Rad Laemmli sample buffer and then loaded (7 ug) and size-separated in 12% sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 100V) by Bio-Rad Mini-Protean III apparatus. The proteins were blotted onto a PVDF membrane for 2h (Bio-Rad). Subsequently, the membrane was incubated with anti-human P2X7 polyclonal antibody (H-265; primary

antibody used at a dilution of 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) at room temperature for 6 h. The sensitivity and specificity of this antibody for human antigen has been previously validated. After the washes of membrane, it was incubated with an alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (1:2000; anti-IgG rabbit, Sigma) for 1 h. Membranes were developed using the substrate of alkaline phosphatase, nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP). The protein blot images were scanned by DS-5000 densitometer (Loccus Biotechnology). Protein analysis was measured using the Scion Image software and relative expression was represented as arbitrary units (A.U.). It was used Precision Plus Protein [™], as molecular standard (catalog #161-0374; Bio-Rad).

2.7 ATP-induced permeabilization of peripheral lymphocytes

To assess the functional activity of the P2X7R, lymphocytes-rich mononuclear cells were isolated and suspended (1.0×10^6 cells / ml) in RPMI-1640 culture medium (Himedia) supplemented with 10% fetal calf serum (GIBCO BRL, Rockville, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma). After incubation at 37 °C and 5% CO₂ for 24 hours the monocytes cells were eliminated and it was only obtained the lymphocytes in the supernatant. These cells were incubated with and without 3.0 mM ATP (Sigma) for 10 minutes at 37 °C and then with 2.0 μM ethidium bromide for 5 minutes at 37 °C as described by Oliveira *et al.* [14] with some modifications. After incubation, the fluorescence intensity due to uptake of ethidium bromide in the absence or presence of agonist was analyzed using the Molecular Devices fluorometer by 360 nm for excitation and 590 nm for emission.

2.8 Pro and anti- inflammatory cytokines quantification

In order to determine if the differentiation of T lymphocytes is being polarized into a T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2) or a T helper 17 (Th17) response, the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines were determined in the serum of participants by the BD CBA Kit Human Th1/Th2/Th17. This kit provided the simultaneous quantification of the following cytokines: interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor (TNF), interferon-γ (IFN-γ), and interleukin-17A (IL-17A). The concentration of the cytokines was expressed in pg/ml and determined by flow cytometry (BD [™] Accuri C6).

2.9 Statistical analysis

Normality of data and homogeneity of the variances were performed using Komolgorov-Smirnov and Bartlett's tests, respectively. Parametric analysis was performed using unpaired Student's t test to comparison between two groups or one-way ANOVA in the case of multiple comparisons followed by the Newman-Keuls, and the results were expressed as mean and S.E.M. Pearson's correlation test was used to determine linear correlation. A *P* value <0.05 was considered statistically significant using GraphPad Prism 5 Software.

3. Results

3.1 Expression of P2X7R in IFCD patients

Fig. 1 reports the P2X7R mRNA expression levels determined by qRT-PCR in peripheral lymphocytes from both control and IFCD group. Statistically significant differences in the P2X7 mRNA expression levels were not found in IFCD patients when compared to control group ($P>0.05$).

3.2 Western blot for P2X7

Fig. 2 demonstrates the western blot assay of P2X7R protein expression in peripheral lymphocytes from IFCD patients. Representative Western blotting analysis is showed in Fig. 2A by immunoblot signal of P2X7R in human peripheral lymphocytes from both groups. The Western blot analysis revealed the expression of the predicted P2X7R as a single band with an apparent molecular mass of 75 kDa in peripheral lymphocytes from IFCD and control groups. As showed in Fig. 2B, the densitometric analysis in peripheral lymphocytes indicates that no significant difference was found in P2X7R protein expression in IFCD patients compared to control group ($P>0.05$).

3.3 Functional assays of P2X7 receptor in IFCD patients

Since high ATP concentrations open a large pore in cell plasma membrane by P2X7 receptor activation, it was evaluated if 3.0 mM ATP would be able allow to access of the ethidium bromide into peripheral lymphocytes from IFCD patients. The basal ethidium bromide uptake was similar in both groups. Agonist action of ATP (3.0mM) elicited permeabilization in peripheral lymphocytes from IFCD patients (Fig. 3),

however no significant differences were observed in relation to control group ($P>0.05$).

3.4 Immunoregulatory profile in IFCD patients

The cytokines levels involved in the regulation of the immune response and inflammation was analyzed in the serum from IFCD patients. The results, illustrated in Fig. 4B and 4F demonstrate that IFCD group presented IL-6 levels (6.364 ± 0.7380 , $n=10$) 1.68-fold higher than control group (3.78 ± 0.44 , $n=10$) and IL-4 levels (5.62 ± 0.84 , $n=10$) 1.80-fold higher than control group (3.12 ± 0.62 , $n=10$) ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively). However, the TNF- α levels were significantly lower in the IFCD patients (1.53 ± 0.37 ; $n=10$) when compared to control group (3.28 ± 0.51 ; $n=10$; $P<0.05$; 4E). The concentration of other cytokines IL-2, IL-17, IL-10 and IFN- γ showed no significant difference in the serum of IFCD patients in relation to control group ($P>0.05$). In an attempt to clarify the immunoregulatory profile involved in the IFCD patients, it was investigated whether a correlation exists between regulatory (IL-4 and IL-10) and inflammatory (TNF- α and IFN- γ) cytokine levels in IFCD patients. A positive correlation ($r = 0.84$, $P= 0.0021$) was observed between TNF- α and IL-10 levels in serum from IFCD patients (Fig. 5A). It was similarly observed a positive correlation ($r = 0.86$, $P=0.0014$) between IFN- γ and IL-4 levels in serum from IFCD patients (Fig. 5B), indicating a controlled inflammatory response. In addition, it was determined the inflammatory balance and cytokine pattern that drives the Th1/Th2 response as demonstrated in Fig. 6. Data show significantly lower TNF- α /IL-10 ratio ($P=0.0077$; $n=10$) and IFN- γ /IL-4 ratio ($P=0.0422$; $n=10$) in IFCD patients, demonstrating that a favorable response to the control mechanisms of inflammation occurs in the IFCD and that the Th1/Th2 like cytokine balance was favorable toward Th2 anti-inflammatory response.

4. Discussion

In most cases (60%) CD is asymptomatic and benign [15]. In the indeterminate form of CD (IFCD) a modulation between pro- and anti-inflammatory responses establishes a host-parasite adaptation [1]. Several signaling pathways are involved in host defense, including the biological actions triggered by extracellular ATP via activation of purinergic receptors. It has been proposed that purinergic signaling plays an important role in the dynamics of CD by maintaining low

concentrations of extracellular ATP and preserving high levels of extracellular adenosine [7]. Nonetheless, few studies have been developed to determine if the modulation in the expression of purinergic receptors might be involved in the mechanism by which these signaling molecules regulate pro- and anti-inflammatory events during CD [16-18].

Previous studies have attempted to establish a correlation between the concentration of circulating cytokines and the clinical forms of CD [1,19-22]. In the *T. cruzi* infection, during the chronic asymptomatic phase of disease, it is observed a blend of Th1 and Th2 responses with low production of pro-inflammatory cytokines (Th1 response-mediated), and induction of Th2 response with increased production of anti-inflammatory cytokines in order to protect the host against severe tissue damage [23]. In addition of Th1 and Th2 responses, a Th17 differentiation has been related to a cardiac protection in the DC [24].

Firstly, in this study, cytokine levels were quantitatively determined and the response pattern in IFCD patients was analyzed. The IFCD group showed significantly higher IL-6 levels than control group. As demonstrated in the literature, IL-6 is considered a pro-inflammatory cytokine but may displays anti-inflammatory property by stimulating the release anti-inflammatory cytokines in the circulation, such as IL-1ra and IL-10 [25]. In addition, IL-6 is able to inhibit the production of the pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , which could explain the lower TNF- α concentration in serum of IFCD patients, differently than what was found by Ferreira *et al.* [19]. IL-6 has demonstrated to stimulate lipolysis and fat oxidation, acting as potent modulator of lipid metabolism, besides it has been associated to low-grade systemic inflammation such as diabetes, cardiovascular diseases [25-27]. Then, further research is necessary to determine the mechanisms that IL-6 may be involved in the regulation of immune responses in the IFCD.

The main pathological finding associated to CD is the chronic myocarditis which is related to morbidity. It suggests that inflammatory cytokines and chemokines play a role in the generation of the inflammatory infiltrate which plays a major role in myocardial damage. Several studies have clearly demonstrated that patients with severe CD had elevated plasma concentrations of TNF- α and CCL2, and a remarkable correlation between the concentration of TNF- α in plasma and the degree of heart dysfunction, indicating that TNF- α level may be an excellent predictor of heart failure [19,28] and useful to identify the CD patients who need further

investigation and treatment. A likely explanation for the discrepancy in the circulating TNF- α levels during IFCD by other authors, could be attributed to factors related to the classification criteria of the patients or the particularity of *T. cruzi* strain involved in the infection of different populations.

The presence of high IL-4 levels in IFCD patients could lead to control of cytotoxic mechanisms and exacerbation of host immune response, which would culminate in tissue damage and, consequently, in disease progression. It is known that anti-inflammatory cytokines, such as IL-4 and IL-10, promote Th2 differentiation and limit Th1 response [21]. IFCD patients displayed a positive correlation between IL-4 and IFN- γ levels as well as IL-10 and TNF- α in serum, indicating a controlled inflammatory response in these patients. These findings corroborate with data showed by DÁvila *et al.* [20], supporting the hypothesis that a lack of efficient regulation between pro and anti-inflammatory cytokines in CD may lead to cardiac immunopathology. Although studies have also shown that no difference in IL-10 and IFN- γ levels occurs in IFCD patients in relation to control group [20,22], the analysis of both TNF- α /IL-10 and IFN- γ /IL-4 ratio demonstrate that CD4⁺ T cells were able to promote a Th2-polarized response during the IFCD. It occurred due to a low concentration of TNF- α and concurrently an increased IL-4 levels. Moreover, to improve the current understanding of immunoregulation involved in the development of IFCD, it was performed a correlation analysis between circulating regulatory and inflammatory cytokines since cytokine profile has been demonstrated as fundamental to define the immunopathological mechanisms involved in the control of immune and inflammatory response during *T. cruzi* infection [29]. A positive correlation, in turn, it was able to demonstrate that there is a control of the inflammatory response in the IFCD, preventing the development of signs and symptoms of different chronic forms of CD.

After evaluating the profile of immune response in the IFCD patients, it can be observed that the biochemical alterations found in the purinergic signaling in a previous study of our group [7], possibly are related to immunological microenvironment established in these patients. Additionally, Coutinho *et al.* [30] showed an increase of P2X7 receptor-associated cell permeabilization during the acute phase of CD. Despite these findings, the influence of purinergic receptors has not yet been explored in the IFCD.

The importance of ATP signaling via purinergic receptors in the pathogenesis of diverse infections as well as autoimmune inflammatory diseases has been described in many studies [14,31-35]. The P2X7R comprises an important part of the host arsenal to eliminate microorganisms such as bacteria (*Mycobacterium tuberculosis* and *Chlamydia sp.*) and protozoa (*Toxoplasma gondii* and *Leishmania amazonensis*), by producing of free oxygen radicals, nitric oxide or host cell apoptosis [31-34]. However, different pathogens have evolved the ability to interfere with this important signaling pathway in order to favor infection [36].

Studies have shown that anti- and pro- inflammatory cytokines are able to alter P2X7R expression in human mononuclear cells during inflammation [6,37]. In addition, a recent study involving chronic parasitic infection by the parasite *Schistosoma mansoni* demonstrated a predominance of a Th2 response and a reduction in the expression and function of P2X7R in mesenteric endothelial cells, possibly limiting the infection-related endothelial damage [14]. Taking this into consideration, it was proposed the presence of a possible modulation in the P2X7R expression in lymphocytes from IFCD patients as a regulatory mechanism involved in the pro-inflammatory cytokine production as well as in presence of an anti-inflammatory microenvironment. However, the results of this study demonstrate that the lymphocytes of IFCD patients express the P2X7R on their cell surface, but the levels of gene and protein expression were not altered in relation to control group.

Although basal levels of P2X7R expression were observed in these patients, the presence of others biochemical and molecular alterations should be considered. Change-of-function polymorphisms, most of which render the receptor inactive or with reduced function, have also been noted in the human population [38] and genetic association studies have uncovered links between some of these polymorphisms and resistance as well as susceptibility to several pathological conditions, particularly, infectious diseases [39]. Moreover, the presence of a mutation in N-glycosylation sites of the P2X7 protein [40] should be speculated, since the glycosylation of proteins linked to the plasma membrane is often crucial in many processes such as protein folding, cell adhesion and recognition of pathogens in host cells [41,42]. The cellular permeability of P2X7R induced by ATP using ethidium bromide uptake it was evaluated in IFCD patients. It was present in peripheral lymphocytes similarly to control group, suggesting that P2X7R has preserved cytotoxic capacity in IFCD patients. Therefore, it is important to deepen the

investigations in relation to possible genetic changes in chronic chagasic patients in order to elicit the involvement of this receptor in the progression of CD.

It has been suggested that ATP could play an immunoregulatory role by inhibiting the release of TNF- α and stimulate the release of IL-10, possibly preventing excessive inflammation in immune-mediated diseases and cancer [43]. A negative immunomodulation occurs at much lower ATP concentrations than those needed to activate P2X7R and is fully independent of this receptor, with the induction of a semi-maturation state characterized by inhibition of IL-2, IL-12, IL-1 β and TNF- α production [44,45].

5. Conclusion

From the findings of the present investigation it was demonstrated that the Th2-polarized response in IFCD patients by increase of IL-4 and decrease of TNF- α levels did not alter P2X7R expression in lymphocytes from these patients or its cytotoxic activity. However, considering that *T. cruzi* contains an ATPase, which is able to interact in host immune responses [46,47], it is suggested that other purinergic receptor subtypes may be involved in the immunoregulatory mechanisms in the IFCD. In conclusion, the biochemical and molecular knowledge of P2X7R in IFCD is useful to shed further light about the participation of the purinergic system in the pathogenesis of CD, and consequently, may help to avoid the progression of disease.

Disclosure of interests

The authors declare no competing interests relating to the content of this manuscript.

Funding

This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

Acknowledgments

The authors would like to thank the participation of HUSM patients, as well as the volunteers of the control group. We also thank both Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves (Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction) and Dr. Ivana Beatrice

Mãnica Da Cruz (Biogenomic Laboratory) for allowing us to develop part of analysis in their laboratories of Federal University of Santa Maria.

References

- [1] Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces Differential Modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chaga's disease. *Infect Immun* 2007; 75(4):1886-1894.
- [2] Bours MJ, Swennen EL, Di Virgillio F, et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 112:358-404.
- [3] Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50(3):413 – 492.
- [4] Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58(3): 281–341.
- [5] Abbracchio MP, Burnstock G, Gabel CA. P2 purinergic receptor modulation of cytokine production. *Purinergic Signal* 2007; 3(1-2): 27-38.
- [6] Zhang XJ, Zheng GG, Ma XT, et al. Effects of various inducers on the expression of P2X7 receptor in human peripheral blood mononuclear cells. *Sheng Li Xue Bao* 2005; 57(2):193-198.
- [7] Souza VCG, Schlemmer KB, Noal CB, et al. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. *Parasitol Int* 2012; 61(4):690-696.
- [8] Anonymous. Meeting of applied research in Chagas disease. Validity of the concept of indeterminate form. *Rev Soc Bras Med Trop* 1985; 18:46.
- [9] Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97:77-89.
- [10] Jaques JAS, Rezer JFP, Ruchel JB, et al. A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity. *Anal Biochem* 2011; 420:34-39.

- [11] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- [12] Wang L, Karlsson L, Moses S, et al. P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40(6):841-853.
- [13] Pfaffl MW. A new mathematical model form relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9):e45.
- [14] Oliveira SD, Coutinho-silva R, Silva CL. Endothelial P2X7 receptors' expression is reduced by schistosomiasis. *Purinergic Signal* 2013; 9(1):81-89.
- [15] Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras de Med Trop* 1989; 22(3):147-156.
- [16] Mantuano-barradas M, Henriques-Pons A, Araújo-jorge TC, et al. Extracellular ATP induces cell death in CD4+/CD8 double-positive thymocytes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 2003; 5(25):1363-1371.
- [17] Cascabulho CM, Menna-Barreto RF, Coutinho-Silva R, et al. P2X7 modulatory web in *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 2008; 103(4):829-838.
- [18] Meuser-batista M, Corrêa JR, Carvalho VF, et al. Mast cell function and death in *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2011; 179(4):1894-1904.
- [19] Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, et al. Increased Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor- α in Asymptomatic/"Indeterminate" and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(3):407-411.
- [20] D'Avila DA, Guedes PM, Castro AM, et al. Immunological imbalance between IFN- γ and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(1): 100-105.
- [21] Florez O, Mart N, Gonzalez CI. Interleukin 4, interleukin 4 receptor- α and interleukin 10 gene polymorfisms in Chagas disease. *Parasite Immunol* 2011; 33:506-511.
- [22] de Melo AS, de Lorena VM, de Moura Braz SC, et al. IL-10 and IFN- γ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine* 2012; 58(2):207–212.
- [23] Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, et al. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on

innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes Infect* 2008; 10(2):103-113.

[24] Magalhaes IM, Villani FN, Do Nunes MC et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis* 2013, 207(4):661–665.

[25] Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005; 98(4):1154–1162.

[26] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105(9): 1135–1143.

[27] Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004; 25(1):4–7.

[28] Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, et al. Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor- α in Chagasic Cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 2004; 38(7):943–950.

[29] Zhang L, Tarleton RL. Persistent Production of Inflammatory and Anti-inflammatory Cytokines and Associated MHC and Adhesion Molecule Expression at the Site of Infection and Disease in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infections. *Exp Parasitol* 1996; 84(2):203-213.

[30] Coutinho CMLM, Pons AH, Araujo-Jorge TC, et al. Enhancement of P2Z-associated cell permeabilization during acute phase of Chagas' disease. *Drug Dev Res* 1998; 43:38.

[31] Kusner DJ, Adams J. ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D. *J Immunol* 2000; 164(1):379-388.

[32] Coutinho-Silva R., Stahl L., Raymond M.N, et al. Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* 2003; 19(3):403-412.

[33] Chaves SP, Torres-Santos EC, Marques C, et al. Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonenses* and its role in parasite elimination. *Microbes Infect* 2009; 11:842-849.

[34] Corrêa G, Marques da Silva C, De Abreu Moreira-Souza AC, et al. Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbes Infect* 2010; 12(6):497-504.

- [35] Portales-Cervantes L, Niño-Moreno P, Doníz-Padilla L, et al. Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lúpus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Human Immunol* 2010; 71(8):818-825.
- [36] Coutinho-Silva R, Ojcius Dm. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. *Microbes and Infect*, 2012; 14(14):1271-1277.
- [37] Gadeock S, Tran JN, Georgiou JG et al (2010) TGF - β 1 prevents up-regulation of the P2X7 receptor by IFN- γ and LPS in leukemic THP-1 monocytes. *Biochim Biophys Acta* 1798(11):2058–2066.
- [38] Fuller SJ, Stokes L, Skarratt KK, et al. Genetic of the P2X7 receptor and human disease. *Purinergic Signal* 2009; 5(2):257-262.
- [39] Caseley EA, Muench SP, Roger S, et al. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers. *Int J Mol Sci* 2014; 15(8):13344-13371.
- [40] Lenertz LY, Wang Z, Guadarrama A, et al. Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X7 reveals a key residue importante for receptor function. *Biochem* 2010; 49(22):4611-4619.
- [41] Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(12): 2277-2293.
- [42] Zhao YY, Takahashi M, Gu JG, et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in câncer. *Cancer Science* 2008; 99(7):1304-1310.
- [43] Swennen EL, Bast A, Dagnelie PC. Immunoregulatory effects of adenosine 5'-triphosphate on cytokine release from stimulated whole blood. *Eur J Immunol* 2005; 35(3):852-858.
- [44] Wilkin F, Stordeur P, Goldman M, et al. Extracellular adenine nucleotides modulate cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells: dual effect of IL-12 and stimulation of IL-10. *Eur J Immunol* 2002; 32(9):2409-2417.
- [45] Di Virgillio F, Boeynaems JM, Robson SC. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9(4):507-513.
- [46] Fietto JLR, Demarco R, Nascimento IP, et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316(2):454-460.

[47] Santos, R. F.; Pôssa, M. A.; Bastos, M. S. et al. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3(3):p.e387.

Figure Legends

Fig. 1. Expression level of P2X7 receptor in peripheral blood lymphocytes from IFCD patients. mRNA expression of the corresponding protein from patients with IFCD ($n=12$) and healthy subjects ($n=18$) was analyzed by qRT-PCR, as stated in Materials and Methods. Data were normalized to a calibrator sample and relative values calculated with correction for amplification efficiency [12]. The housekeeping gene GAPDH was used as an internal control of the samples. Data were expressed in mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). $P<0.05$, Student's t test.

Fig. 2. Immunoblot of P2X7 receptor expression on human peripheral lymphocytes. (A) Representative Western blot assay. Samples were loaded on an SDS-gel, and after electrophoresis, the proteins were blotted onto a polyvinylidene difluoride membrane and incubated with a polyclonal antibody against protein P2X7. (B) Densitometric analysis of the Western blot results (arbitrary units, A.U.) of the protein P2X7. Data are represented as the mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). $P<0.05$ ($n=5$, Student's t test).

Fig. 3 Functional analysis of P2X7 receptor in peripheral lymphocytes from IFCD patients. Assays used lymphocytes from control group ($n=10$; *white bars*) and IFCD group ($n=10$; *black bars*) in the absence (0) and presence of 3mM ATP. Experiments used ethidium bromide ($2.0 \mu\text{M}$) as a tracer and were analysed by fluorimetry. Data are expressed as the mean and S.E.M. *a* and *b* differ from each other ($P<0.05$, one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

Fig. 4 IL-2 (4A), IL-6 (4B), IL-17 (4C), IL-10 (4D), TNF- α (4E), IL-4 (4F) and IFN- γ (4G) levels in sera from IFCD patients ($n=10$) and healthy individuals ($n=10$). Cytokines levels were determined on serum by flow cytometry and expressed in pg/mL. Data are represented as the mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). Statistical significance between groups is indicated by * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ (Student's t test).

Fig. 5 Correlation analysis between pro (TNF- α and IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines from IFCD patients. Pearson's correlation test was used ($n=10$; $P<0.05$; r =correlation coefficient).

Fig. 6 Inflammatory balance and cytokine pattern in IFCD patients by ratio between TNF- α and IL-10 levels (A) and IFN- γ and IL-4 levels (B). Data are represented as the mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). Statistical significance between groups is indicated by * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ ($n=10$; Student's t test).

Figure 1

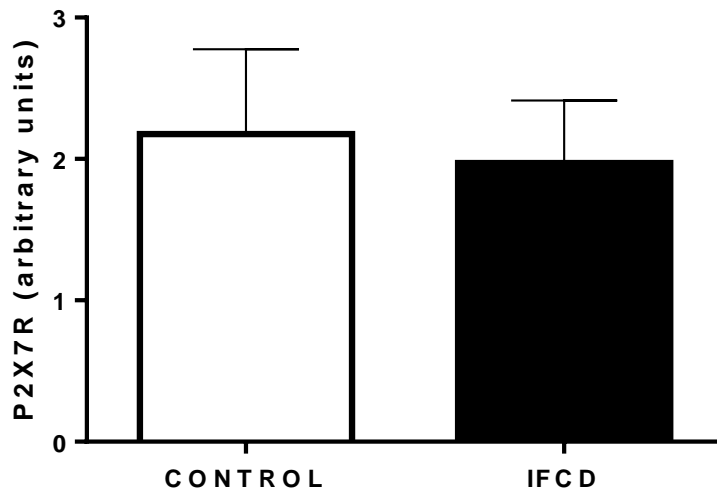


Figure 2

A

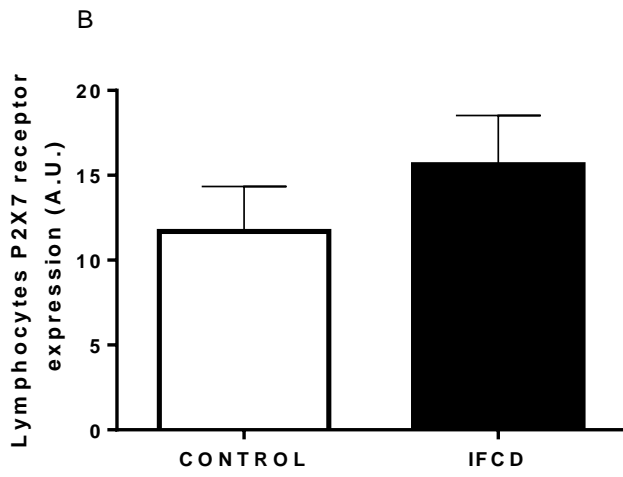
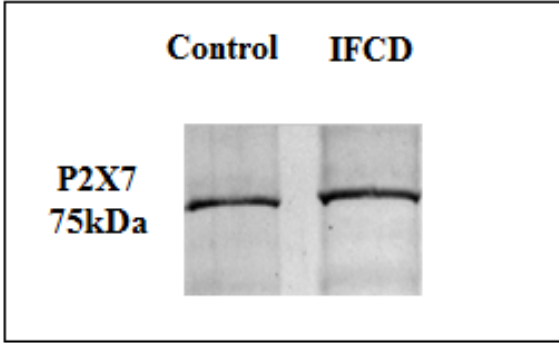


Figure 3

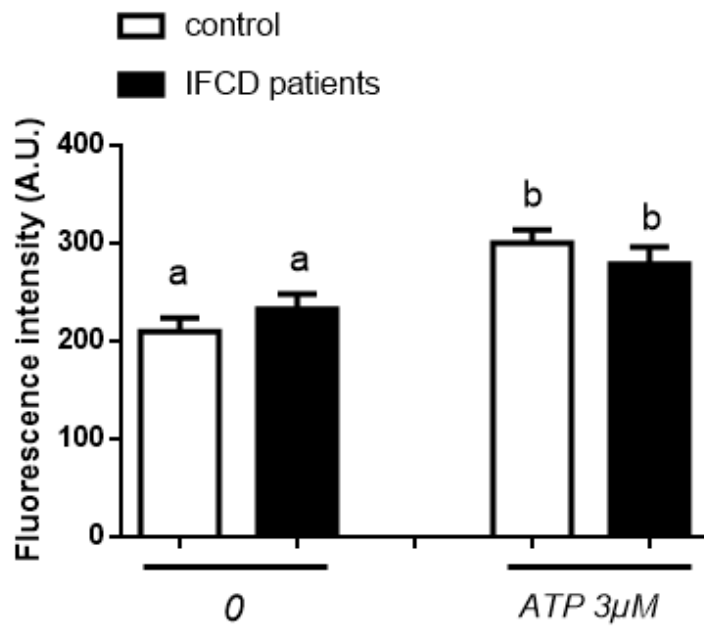


Figure 4

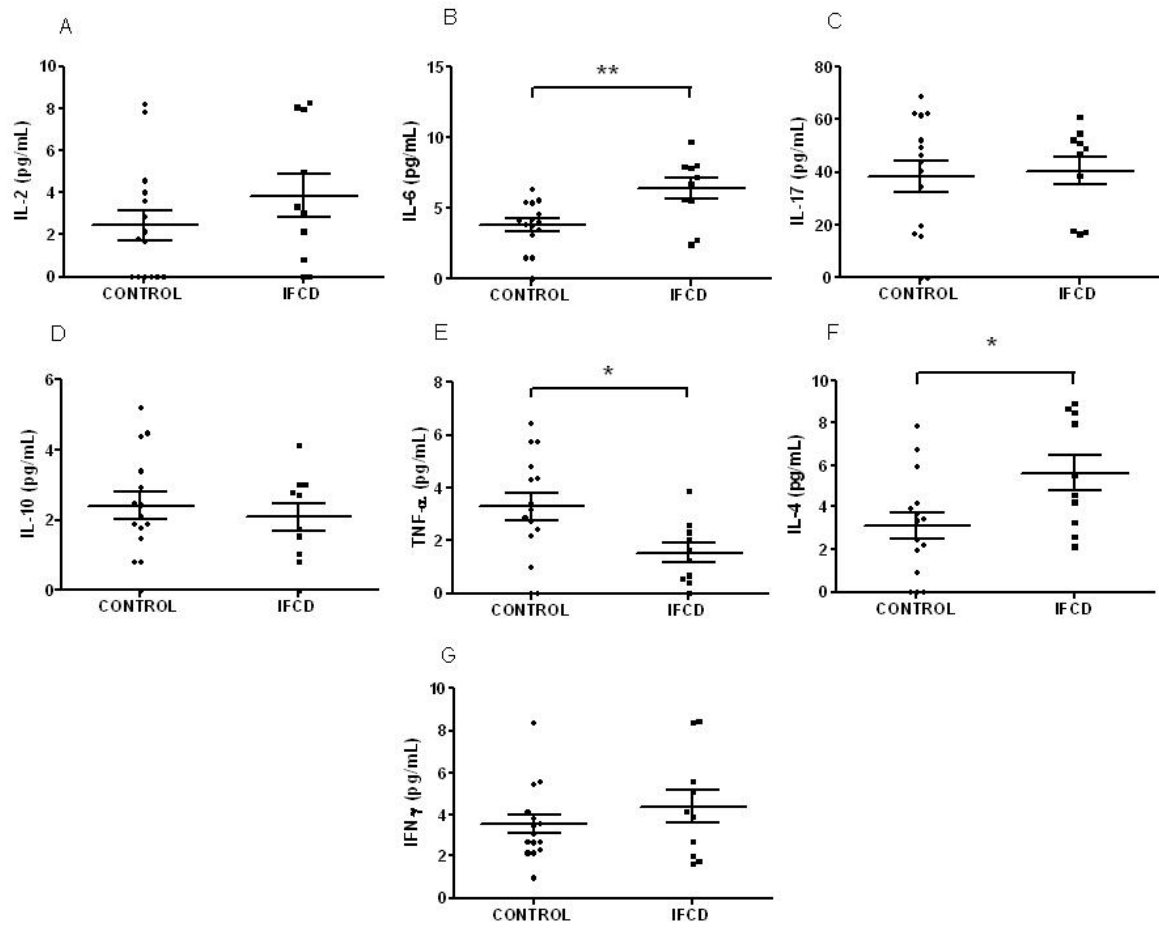


Figure 5

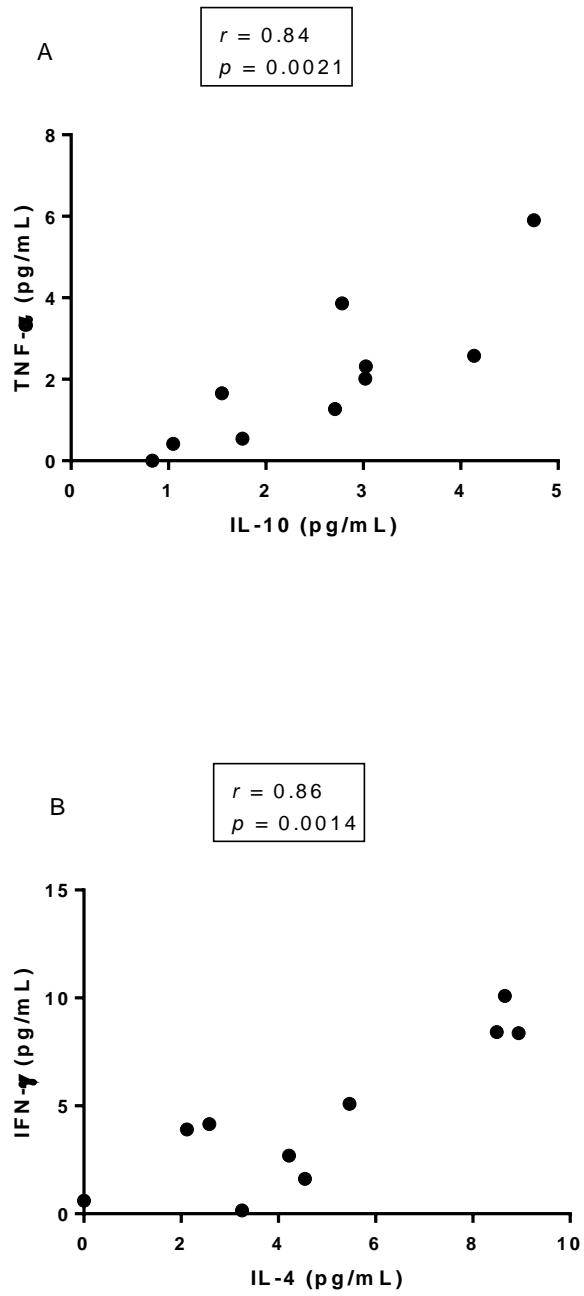


Figure 6

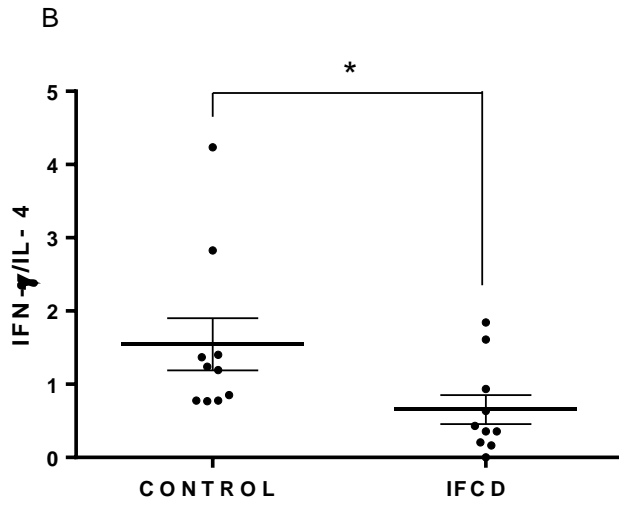
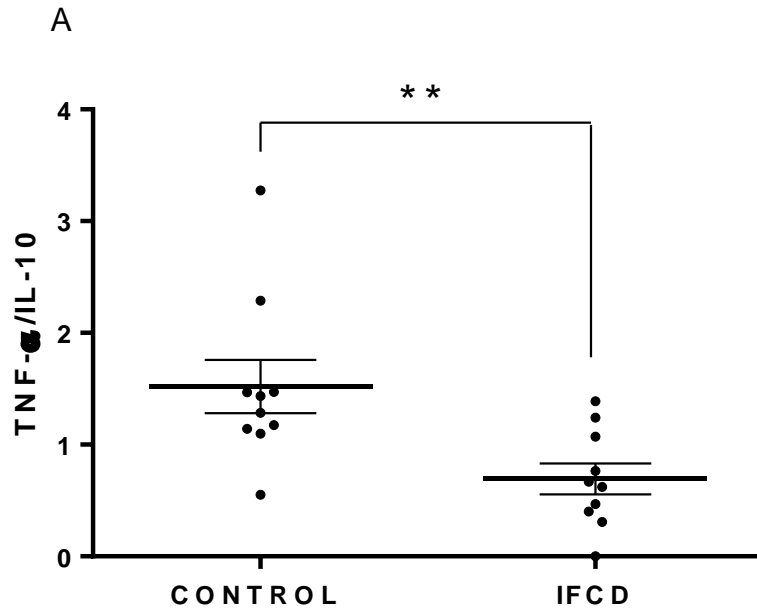
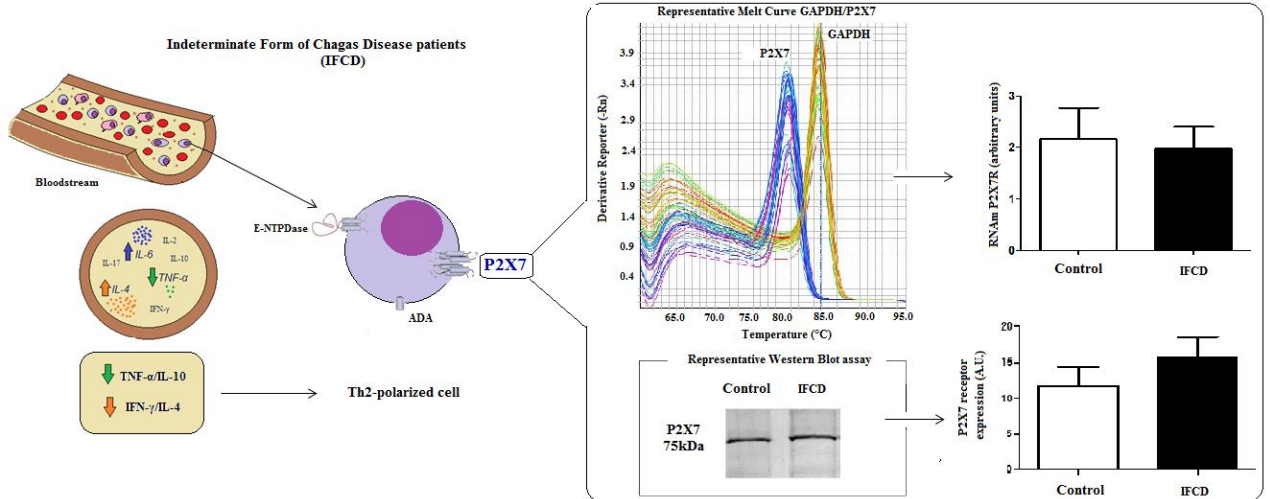


Table 1 – Oligonucleotide primers and probes used by real-time quantitative polymerase chain reaction of P2X7 receptor

Gene	Oligonucleotide	Sequence	Referece
GAPDH*	Sense primer	AAT CCC ATC ACC ATC TTC CA	(Wang et al., 2002)
	Antisense primer	AAA TGA GCC CCA GCC TTC	
P2X7	Sense primer	ATCGGCTCAACCCTCTCCTAC	(Wang et al., 2002)
	Antisense primer	CTGGAGTAAGTGTCGATGAGGAAG	

*GAPDH expression was stable across cell types in vivo and was selected as the housekeeping gene.

Graphical Abstract



3 MANUSCRITO II

P2Y11R AND A2AR mRNA EXPRESSION PROFILE IN LYMPHOCYTES FROM INDETERMINATE FORM OF CHAGAS DISEASE PATIENTS

Viviane do Carmo Gonçalves Souza^a, Joabel Tonello dos Santos^b, Luiz Felipe Dias Carli^a, Daniela Ferreira Passos^a, Jeandre Augusto dos Santos Jaques^c, Daniela Bitencourt Rosa Leal^a

^a Department of Microbiology and Parasitology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^b Department of Large Animal Clinic, Rural Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^c Center of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79.070-900, Brazil

Corresponding author:

Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal (dbitencourtrosaleal@gmail.com)

Laboratory of Experimental and Applied Immunobiology

Department of Microbiology and Parasitology

Health Sciences Center

Federal University of Santa Maria (UFSM), Box 20 – Room 4223, Brazil.

Phone: + 55 55 3220 9581- 3220 9383

Abbreviations

IFCD: indeterminate form of Chagas disease; DC: Chagas disease; cAMP: cyclic AMP; E-NTPDase: ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; E-ADA: ecto-adenosine deaminase; ATP: adenine triphosphate; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

P2Y11R AND A2AR mRNA EXPRESSION PROFILE IN LYMPHOCYTES FROM INDETERMINATE FORM OF CHAGAS DISEASE PATIENTS

Viviane do Carmo Gonçalves Souza^a, Joabel Tonello dos Santos^b, Luiz Felipe Dias Carli^a, Daniela Ferreira Passos^a, Jeandre Augusto dos Santos Jaques^c, Daniela Bitencourt Rosa Leal^a

Abstract

The indeterminate form of Chagas disease (IFCD) is characterized by presence of a chronic inflammatory process without apparent signs and symptoms of disease which occurs in the majority of individuals infected by *Trypanosoma cruzi*. The control of the immunity-mediated inflammatory response represents one of the most important targets in IFCD. A central role of P2Y11 and A2A receptors in mechanisms of inflammation has been reported in different pathologies. The aim of this study was to evaluate P2Y11R and A2AR mRNA expression in lymphocytes from IFCD by qRT-PCR method. No change was observed in the levels of P2Y11R mRNA expression in lymphocytes from IFCD patients; however, decreased levels of A2AR mRNA expression were detected in relation to control group. Therefore, the modulation in the A2AR mRNA expression in peripheral lymphocytes suggests the involvement of the adenosine system in IFCD, as a regulatory mechanism in the maintenance of an anti-inflammatory environment to avoid the development of clinical manifestations.

Keywords: P2Y11, A2A, Chagas disease, lymphocytes, purinergic receptors.

1 Introduction

Chagas disease (CD) caused by *Trypanosoma cruzi* represents a serious health problem due to its difficult diagnosis and treatment when it comes to the chronic form of the disease. The majority of the infected patients develop a chronic inflammatory process, without apparent morbidity, named indeterminate form of Chagas disease (IFCD). However, up to 30% of infected patients will present organ damage, mainly affecting the heart muscle, leading to Chagas cardiomyopathy [1], mostly due to a parasite-triggered immune-mediated inflammation [2].

Sensors, such as receptors on cell surface, maintain homeostasis by rapidly sensing signs of distress or damage. These sensors monitor the presence of biomolecules in the extracellular environment which are released in response to a threat of exogenous or endogenous origin [3]. ATP is an important extracellular mediator by signaling detected and transduced by P2 purinergic receptors. In the presence of low extracellular ATP levels, it may act as a negative immunomodulator, mainly by P2Y receptor subtypes or as immunostimulant by P2X receptor in the presence of high concentrations [4].

Virtually all eukaryotic cells express P2 receptors which can be rapidly up- or down-regulated [5]. Seven P2X (1-7) receptors subtypes and eight P2Y (1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) receptor subtypes have so far been identified [6]. P2YRs subtypes are differentially expressed on several cell types, including immune cells, such as T and B lymphocytes. They are G protein-coupled receptors and activate the cyclic AMP (cAMP) or inositol trisphosphate (IP3) second messenger systems [7]. Various pharmacological effects have been attributed to the P2Y₁₁ receptor since its cloning and characterization [8], such as smooth muscle relaxation [9] and immunosuppressive effect by inhibiting T-helper 1 cytokines and promoting T-helper 2 cytokines [10] when stimulated by ATP [11].

Adenosine, the most important ATP degradation product, is also recognized as key mediator of immune and inflammatory responses [12]. This molecule plays an important role as an endogenous anti-inflammatory agent; known to inhibit the release of cytokines, adhesion of immune cells, and function of cytotoxic T lymphocytes [13]. Its effects are triggered by the activation of specific G protein-coupled receptors, classified as P1 receptors and subdivided in A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ [14]. A₁ and A_{2A} receptors exhibit high affinity for adenosine, while the A_{2B} and

A3 receptors show low affinity [15]. There is sound evidence for a crucial role of A2A and A2B receptors in the control of inflammation. By activating the adenylate cyclase pathway through A2A receptors, adenosine causes an increase in intracellular cyclic AMP production and protein kinase A (PKA) activation, which in turn, has an inhibitory effect on the proliferation and activation of T and B lymphocytes [16] and on differentiation and function of myeloid cells [17].

Recently, the participation of purinergic signaling in IFCD patients by regulation of ecto-enzymes activities (E-ADA and E-NTPDase) from peripheral lymphocytes was reported. It suggests a possible involvement of this signaling pathway in the control of immune and inflammatory responses during IFCD [18] yet the expression of purinergic receptors has not been investigated. Immunoregulation in the IFCD is crucial in order to prevent functional and structural microvascular abnormalities, which occur in Chagas cardiomyopathy, possibly as a consequence of the underlying inflammatory process [19]. Taking this into consideration, this study was designed to evaluate the gene expression of P2Y11 and A2A receptors in lymphocytes from IFCD patients in order to support and complement the knowledge on the participation of purinergic signaling in protecting patients IFCD from developing severe tissues damage

2. Subjects and methods

2.1 Patients and healthy control

All patients enrolled in this study were carefully selected from the Federal University of Santa Maria Hospital, Brazil. A total of 30 participants were included and divided into two groups: control group, composed of healthy subjects (n= 18) and IFCD group (n= 12). IFCD patients were selected according to the following criteria: absence of signal and symptoms of CD, two positive serologic reactions for Chagas disease, normal conventional electrocardiograms and unaltered radiological heart, esophagus and colon images. The distribution of gender and age was similar between the two groups (Table 1). The exclusion criteria were as follows: any pharmacological treatment during the last 30 days before the beginning of the experiment and subjects with altered blood pressure, diabetes mellitus, alcoholism, cigarette smoking, autoimmune disease and immunodeficiency. The Human Research Ethics Committee from Federal University of Santa Maria, Brazil, approved

the study under number 23081.008343/2009-10, and written informed consent was obtained from each participant. Samples of peripheral blood were obtained by venous puncture from participants.

2.2 *Isolation of peripheral lymphocytes*

A leukogram was performed in each subject (SYSMEX XT-1800i, Roche Diagnostic, USA) soon after the peripheral lymphocytes-rich mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient as described by Böyum [20]. After isolation, the protein content was measured by the Coomassie Blue method, as described by Bradford [21]. The percentage of lymphocytes was greater than 96% as previously outlined [22]. The general characteristics and blood leukocyte profile of both groups are shown in Table 1.

2.3 *Separation of blood serum*

After clot formation, serum was obtained by centrifugation at 1400 g for 15 min at room temperature. Then, C-reactive protein (CRP) levels were determined in serum by agglutination latex kit (MBiolog Diagnosticos, Brazil). Serum levels greater than 6 mg/L were considered elevated according to recommendations of the test kit.

2.4 *Reverse transcription of total RNA to cDNA*

Total cytoplasmic ribonucleic acid (RNA) from peripheral lymphocytes was extracted using QIAshredder and RNeasy kit (Qiagen, Crawley, UK). RNA concentration and purity were measured by 260 nm on Nano-Drop ND 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) and total RNA was stored at -80°C prior to cDNA synthesis. The subsequent cDNA synthesis was carried out in the presence of Omniscript® Reverse Transcription Kit (Qiagen®). One µg of RNA template was used per each RNA-to-cDNA reaction. The samples were placed in PTC 100™ thermal cycler (BioRad, USA) and treated with desoxyribonuclease (Invitrogen™) at 37°C for 5 minutes, followed by heating to 65°C for 10 minutes and at the end heated to 93°C for 5 minutes. Synthesized cDNA was stored at -20°C.

2.5 P2Y11R and A2AR quantification by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

The detection and quantification of both P2Y11R and A2AR mRNA were performed using *Platinum® SYBR® Green* qPCR SuperMix (Invitrogen™) by StepOnePlus™ (Applied Biosystems, USA). The sequences of primers were obtained from the literature [23,24] and then synthesized by Invitrogen™ (Table 2). All of the reactions were performed in duplicate, with thermal cycling conditions of 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 sec at 95°C, 40 sec at 56°C, and 30 sec at 72°C) were used to amplify each transcript. Samples were expressed in relation to GAPDH (internal control of integrity of the samples). The melting-curve analyses were performed to verify product identity. The quantification of mRNA was carried out by using the comparative cycle threshold (Ct) method and the formula: normalization ratio (NR)= $2^{-\Delta\Delta C_t}$. According to this formula, the normalization ratio of the calibrator in each run is 1 and the relative values were calculated undergo correction for amplification efficiency [25]. The results were expressed as Arbitrary Units (P2Y11R or A2AR/GAPDH ratio).

2.6 Statistical analysis

Statistical analyses for normality of data and homogeneity of the variances were performed using D'Agostino & Person omnibus and Bartlett's tests, respectively. Parametric analysis was performed using unpaired Student's t test to comparison between two groups or one-way ANOVA in the case of multiple comparisons, and the results were expressed as mean and S.E.M. The Mann-Whitney U test analysis was used when data were not normally distributed and in this case, the data were expressed as median and interquartile range. A probability value of $P < 0.05$ was considered statistically significant using GraphPad Prism 5 Software.

3. Results

3.1 Hematological analysis

All participants showed a normal total white blood count (WBC) and differential leukocyte count, compatible with their age and gender in accordance with reference values [26].

3.2 Serum C-reactive protein measurement

At the moment of collection, the participants from both IFCD and control groups had serum CRP levels lower than 6 mg/L.

3.3 Expression of purinergic receptors (P2Y11 and A2A) in IFCD patients

To the best of our knowledge, this was the first study to evaluate the gene expression levels of P2Y11 and A2A receptors in lymphocytes of IFCD patients by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). As shown in Figure 1, the results of this study demonstrate that peripheral lymphocytes from IFCD group express both P2Y11R (Fig. 1A) and A2AR (Fig.1B) mRNA. There was no statistically significant difference in the P2Y11R mRNA levels in lymphocytes from IFCD group (0.88 ± 0.20) in relation to control group (1.23 ± 0.15) ($P > 0.05$). However, a significant decrease of 68.39% in the A2AR mRNA levels was observed in IFCD group when compared with control group ($P < 0.05$).

1. Discussion

In a previous study carried out in our laboratory, it was demonstrated that IFCD patients showed decreased extracellular levels of ATP and increased levels of adenosine [18]. Extracellular ATP, at low concentrations, possesses affinity for P2Y receptors subtype on the surface of lymphocytes developing a down-modulation of pro-inflammatory cytokines and stimulating a Th2 immune response [27]. Adenosine, the main metabolite of ATP, is able to suppress cell responses up-regulating intracellular cyclic AMP levels by stimulating A2 receptors coupled to stimulatory G proteins (Gs). Therefore, the A2A receptor subtype acts as a sensor of pro-inflammatory events and a blocker of excessive immune response. It was proposed by Souza et al. [18] that a Th2 response induction may be involved in the maintenance of a balance between parasitism and host tissue integrity by participating in the modulation of purinergic system ecto-enzymes activities (E-NTPDase and E-ADA), during IFCD. The authors suggested that the activation of suppressive purinergic receptors, such as A2 and P2Y, may control pro and anti-inflammatory events in the IFCD.

The regulation of P2Y11R expression in different immune cell types plays an important role in cellular responses such as vasodilation and blood pressure control

besides to demonstrate a fibrinolytic role [28]. In the present study, the peripheral lymphocytes from IFCD patients expressed P2Y₁₁R mRNA, but its expression levels were not altered when compared with control group. It suggests that the *T. cruzi* infection is not able to promote a down or up-regulation in P2Y₁₁R mRNA expression, at least in the IFCD. Although there is no modulation in the expression of this receptor, other biochemical and molecular parameters can not be discarded, such as the presence of P2Y₁₁R genetic polymorphisms, which may be alter its function and, consequently, its immunoregulatory effects, during IFCD. In cardiovascular diseases, an inflammatory mechanism has been associated to a specific P2Y₁₁R genetic polymorphism, due to the presence of elevated C-reactive protein levels [29]. In this study, IFCD patients did not show increased serum C-reactive protein levels or a modulation in the P2Y₁₁R expression. However, a more in-depth investigation is required in relation to the functional activity of P2Y₁₁ receptor, since it has been shown to be a promising new drug target for prevention of cardiovascular disturbance and thereby of progression to the cardiac chronic phase of CD.

ATP in the extracellular medium can also act as a negative modulator of inflammation by other mechanisms, among them indirectly by adenosine production [30]. In the first moment, it was demonstrated that in the hypoxic and ischemic heart, adenosine had a protective function against the consequences of metabolically detrimental situations, both by decreasing the metabolic demands of the myocardium and by increasing coronary blood flow. Later, it was assigned to adenosine an important role in the maintenance of tissue integrity by modulation of immune system function [31].

Changes in A_{2A} receptor expression in peripheral blood mononuclear cells have been demonstrated in several chronic diseases, such as amnesic mild cognitive impairment [24], congestive heart failure [32] and essential hypertension [33]. In lymphocytes obtained from rheumatoid arthritis patients, A_{2A}R and A₃R were up-regulated when compared to healthy subjects, suggesting a direct role of the activation of these receptors by extracellular adenosine in the control of rheumatoid arthritis joint inflammation. It demonstrates that A_{2A}R and A₃R regulate the inflammatory and clinical responses in rheumatoid arthritis by inhibition of the NF- κ B pathway and decreased inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β and IL-6 [34].

Asakura et al. [35] demonstrated that reduced gene expression of adenosine receptors (A2A, A2B and A3) in the myocardium of patients with chronic heart failure can impair signal transduction related to adenosine, contributing to the pathophysiology of chronic heart failure. However, in order to compensate for this loss, high myocardial adenosine levels are preserved through down-regulation of adenosine deaminase, which was found to improve cardiac function in these patients. Adenosine is known to be cardioprotective, so a down-regulation of adenosine receptors as is presented in this previous study is speculated to be a cause of chronic heart failure.

In this study, it was demonstrated that there is a significant reduction in the A2AR mRNA expression levels in peripheral lymphocytes from IFCD patients. It suggests that a negative modulation in the A2AR expression occurs as a regulatory mechanism in order to limit the extracellular adenosine-mediated immunosuppression during IFCD. However, this does not impair the immunomodulatory signaling induced by extracellular adenosine in the IFCD, since a decrease in the E-ADA activity can be contributing with the preservation of extracellular adenosine as demonstrated by Souza et al [18]. This demonstrates that there is a balance among the purinergic signaling components to maintain an adaptation between host and parasite and consequently avoid the progression of disease by modulation of adenosine receptor signaling.

The clinical status of IFCD patients demonstrates that there are efficient immunoregulatory mechanisms, since their conventional electrocardiograms and thorax X-rays (heart, esophagus and colon images) were normal, in addition to the absence of signs and symptoms of CD. It was also observed that these patients did not show alterations in the leukocytes and lymphocytes peripheral counts as well as serum CRP measurements, demonstrating that there is no immune response deficiency, current acute infection or possible cardiac dysfunction caused by *T. cruzi* or other etiology.

2. Conclusion

Although the immune response to tissue injury has an essential role in preserving tissue homeostasis, an uncontrolled inflammation or immune activation can provide further damage on the affected tissues and trigger a clinical form of CD. Between the

analyzed regulatory purinergic receptors, the results of this study allow us to suggest a relationship between peripheral A2AR expression modulation and adenosine metabolism in IFCD, essentially due to immunosuppressive activity of adenosine, which significantly interferes in later stages of inflammation. It must be emphasized that alterations in the A2AR expression are not peculiar to IFCD but this finding supports an involvement of the adenosine system in IFCD, as a regulatory mechanism in the maintenance of an anti-inflammatory environment to avoid the development of chronic CD without a fall of immunological vigilance. Ultimately, these data suggest that modulation of A2AR activities could indicate a strategy therapeutic for the control of CD development. However, further investigations are necessary to clarify on the functionality as well as the presence of genetic polymorphism of both P2Y11 and A2A receptors related to CD.

Acknowledgments

This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. The authors would like to thank the participation of HUSM patients as well as the volunteers of control group. In addition, they also thank Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves (Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction) for allowing us to develop part of analysis in his laboratory of Federal University of Santa Maria.

References

- [1] A. Jr. Rassi, A. Rassi, J.A. Marin-Neto. Chagas disease, *Lancet*. 375 (2010) 1388–1402.
- [2] J.A. Marin-Neto, E. Cunha-Neto, B.C. Maciel, M.V. Simoes. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease, *Circulation*. (2007); 115:1109–1123.
- [3] F. Di Virgilio, M. Vuerich, Purinergic signaling in the immune system, *Auton. Neurosci.* 191 (2015) 117–123.
- [4] R.A. North, E.A. Barnanrd. Nucleotide receptors, *Curr. Opin. Neurobiol.* 7 (1997) 346-357.
- [5] D. Erlinge, G. Burnstock, P2 receptors in cardiovascular regulation and disease, *Purinergic. Signal.* 4 (2008) 1–20.
- [6] G. Burnstock. Purine and Pyrimidine receptors, *Cell. Mol. Life.* 64 (2007) 1471-83.

- [7] M.P. Abbracchio, G. Burnstock, J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, G.E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K.A. Jacobson, G.A. Weisman, International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 281–341.
- [8] D. Communi, B. Robaye, J.M. Boeynaems, Pharmacological characterization of the human P2Y₁₁ receptor, *Br. J. Pharmacol.* 128 (1999) 1199–1206.
- [9] B.F. King, A. Townsend-Nicholson, Involvement of P2Y₁ and P2Y₁₁ purinoceptors in parasympathetic inhibition of colonic smooth muscle, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324 (2008) 1055-1063.
- [10] A. Kaufmann, B. Musset, S.H. Limberg, V. Renigunta, R. Sus, A.H. Dalpke, K.M. Heeg, B. Robaye, P.J. Hanley, 'Host tissue damage' signal ATP promotes nondirectional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 32459–32467.
- [11] E.L. Swennen, E.J. Coolen, I.C. Arts, A. Bast, P.C. Dagnelie, Time-dependent effects of ATP and its degradation products on inflammatory markers in human blood ex vivo, *Immunobiology.* 213 (2008) 389–397.
- [12] B.B. Fredholm, Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair, *Cell. Death. Differ.* 14 (2007) 1315–1323.
- [13] B.N. Cronstein, Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent, *J. Appl. Physiol.* 76 (1994) 5-13.
- [14] B.B. Fredholm, A.P. Ijzerman, K.A. Jacobson, K.N. Klotz, J. Linden, International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol. Rev.* 53 (2001) 527-552.
- [15] J.A. Ribeiro, A.M. Sebastiao, A. Mendonca, Participation of adenosine receptors in neuroprotection, *Drug. News. Perspect.* 16 (2003) 80-86.
- [16] R. Mosenden, K. Taskén, Cyclic AMP-mediated immune regulation—overview of mechanisms of action in T cells, *Cell. Signal.* 23 (2011) 1009–1016.
- [17] C.H. Serezani, M.N. Ballinger, D.M. Aronoff, M. Peters-Golden, Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 39 (2008) 127–132.
- [18] V.C.G. Souza, K.B. Schlemmer, C.B. Noal, J.A.S Jaques, C.E.P. Zimmermann, C.A.M. Leal, J. Fleck, E.A. Casali, V.M. Morsh, M.R.C. Schetinger, D.B.R. Leal, E-

NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease, *Parasitol. Int.* 61 (2012) 690-696.

[19] J.A. Marin-Neto, E. Cunha-Neto, B.C. Maciel, M.V. Simões. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease, *Circulation.* 115 (2007) 1109-1123.

[20] A. Böyum, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97 (1968) 77-89.

[21] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.

[22] J.A.S. Jaques, J.F.P. Rezer, J.B. Ruchel, J. Gutierrez, A.V. Bairros, I.L.G. Farias, S.C.A. da Luz, C.D.M. Bertoncheli, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, D.B.R. Leal, A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity, *Anal. Biochem.* 420 (2011) 34-39.

[23] L. Wang, L. Karlsson, S. Moses, A. Hultgårdh-Nilsson, M. Andersson, C. Borna, T. Gudbjartsson, S. Jern, D. Erlinge, P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 40 (2002) 841-853.

[24] B. Arosio, C. Viazzoli, L. Mastronardi, C. Bilotta, C. Vergani, L. Bergamaschini, Adenosine A2A receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with mild cognitive impairment, *J. Alzheimers. Dis.* 20 (2010) 991-996.

[25] M.W. Pfaffl, A new mathematical model form relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic. Acids. Res.* 29 (2001) e45.

[26] R. Failace, Hemograma: manual de Interpretação, fourth ed., Artmed, Brazil, 2003.

[27] F. Di Virgilio, J.M. Boeynaems, S.C. Robson, Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity, *Curr. Opin. Pharmacol.* 9 (2009) 507-513.

[28] L. Wang , L. Karlsson , S. Moses , A. Hultgårdh-Nilsson , M. Andersson , C. Borna , T. Gudbjartsson , S. Jern , D. Erlinge. P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 40 (2002) 841-53.

- [29] S. Amisten, O. Melander, A.-K. Wihlborg, G. Berglund, D. Erlinge, Increased risk of acute myocardial infarction and elevated levels of C-reactive protein in carriers of the Thr-87 variant of the ATP receptor P2Y₁₁, *Eur. Heart. J.* 28 (2007) 13–18.
- [30] G. Haskó, D.G. Kuhel, J.F. Chen, M.A. Schwarzschild, E.A. Deitch, J.G. Mabley, A. Marton, C. Szabó, Adenosine inhibits IL-2 and TNF-[alpha] production via adenosine A_{2A} receptor-dependent and independent mechanisms, *FASEB. J.* 14 (2000) 2065-2074.
- [31] Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* (1998) 413-492.
- [32] P.L. Capecchi, A. Camurri, G. Pompella, A. Mazzola, M. Maccherini, F. Diciolla, P.E. Lazzerini, M.P. Abbracchio, F. Laghi-Pasini, Upregulation of A_{2A} adenosine receptor expression by TNF-alpha in PBMC of patients with CHF: a regulatory mechanism of inflammation, *J. Card. Fail.* 11 (2005) 67-73.
- [33] K. Varani, R. Manfredini, V. Iannotta, C. Pancaldi, E. Cattabriga, C. Uluoglu, P.A. Borea, F. Portaluppi, Effects of doxazosin and propranolol on A_{2A} adenosine receptors in essential hypertension, *Hypertension* 40 (2002) 909-1013.
- [34] K. Varani, M. Padovan, F. Vincenzi, M. Targa, F. Trotta, M. Govoni, P.A. Borea. A_{2A} and A₃ adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release, *Arthritis. Res. Ther.* 13 (2011) R197.
- [35] M. Asakura, H. Asanuma, J. Kim, Y. Liao, K. Nakamaru, M. Fujita, K. Komamura, T. Isomura, H. Furukawa, H. Tomoike, M. Kitakaze, Impact of adenosine receptor signaling and metabolism on pathophysiology in patients with chronic heart failure, *Hyperten. Res.* 30 (2007) 781-787.

Figure Legend

Fig. 1 P2Y11R (A) and A2AR (B) mRNA expression levels of in peripheral blood lymphocytes from IFCD patients. The quantification was performed by qRT-PCR method (IFCD group n=12 and control groups n=18). GAPDH was used as an internal control of the samples. Results were expressed as Arbitrary Units (P2Y11R or A2AR/GAPDH ratio). The P2Y11R mRNA levels were expressed as mean \pm SEM and calculated using unpaired Student's t test; while A2A mRNA levels were expressed as median with interquartile range by Mann-Whitney U test analysis. * $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 1

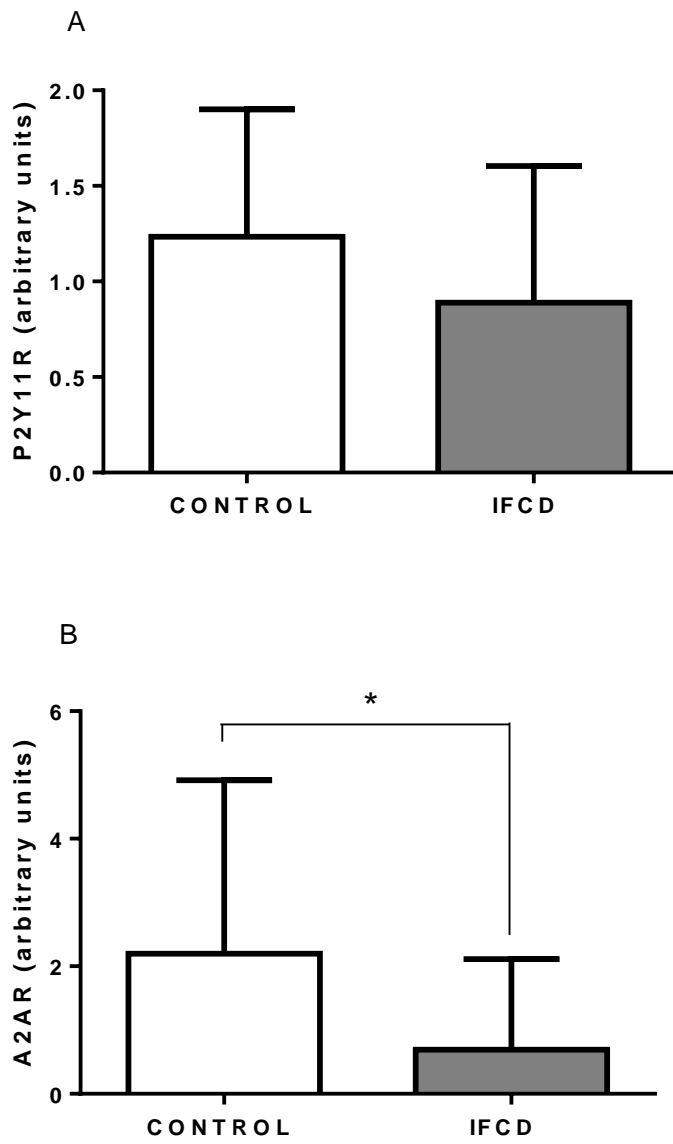


Table 1- General characteristics and hematological analysis of the studied population and comparison between IFCD and control group.

Item ^b	IFCD Patients ^d men	IFCD Patients ^d women	Controls ^e men	Controls ^e women	Reference range ^c men	Reference range ^c women
Age (years)	55.50 ± 2.50	52.60 ± 4.05	48.67 ± 1.85	51.33 ± 3.10	-	-
Gender (%)	58	42	39	61	-	-
WBC (x 10 ³ /μL)	6.18 ± 0.54	6.88 ± 0.46	6.12 ± 0.31	5.68 ± 0.20	3.60 - 11.00	3.60 - 11.00
Lymphocytes (x 10 ³ /μL)	2.01 ± 0.30	2.25 ± 0.21	1.95 ± 0.27	2.00 ± 0.15	1.00 - 4.50	1.00 - 4.50
Neutrophils (x 10 ³ /μL)	3.68 ± 0.33	3.84 ± 0.33	3.69 ± 0.17	3.18 ± 0.16	1.50 - 7.00	1.50 - 7.00
Monocytes (x 10 ³ /μL)	0.30 ± 0.04	0.42 ± 0.05	0.29 ± 0.07	0.33 ± 0.02	0.10 - 1.00	0.10 - 1.00
Eosinophils (x 10 ³ /μL)	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0 - 0.50	0 - 0.50
Basophils (x 10 ³ /μL)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0 - 0.20	0 - 0.20

^a Continuous variables are presents as means ± SEM and the other variables are shown as percentage of individuals, one-way ANOVA.

^b WBC, white blood cells.

^c Take from Failace (2003) to according with age and sex.

^d Age of IFCD patients 53.43 ± 2.90 years old (n=12).

^e Age of controls 50.44 ± 2.12 years old (n=18).

Table 2 – Primer sequences for quantitative RT-PCR assay.

Gene	Forward	Reverse
GAPDH*	AAT CCC ATC ACC ATC TTC CA	AAA TGA GCC CCA GCC TTC
P2Y11	GTT GGT GGC CAG TGG TGT G	TTG AGC ACC CGC ATG ATG T
A2A	GGCTGCCCTACACATCATC	GCCAGGTACATGAGCCAGAGA

* The housekeeping gene GAPDH was selected and its expression was stable across cell types in vivo.

4 DISCUSSÃO

A FIDC representa o estado de equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito, em que o indivíduo encontra-se assintomático. Quando há a perda deste equilíbrio ocorre o estabelecimento de uma das formas clínicas da doença. No entanto, está bem estabelecido, que a resposta imune do hospedeiro desempenha um importante papel durante a infecção pelo *T. cruzi*, levando ao controle do parasito durante a fase aguda bem como participando no desenvolvimento da doença durante a fase crônica (DUTRA & GOLLOB, 2008). A importância da resposta Th1 é demonstrada em diversas infecções por patógenos intracelulares, incluindo o *Trypanosoma cruzi* (GAZZINELLI et al., 1996; GOMES et al., 2003; MULLER et al., 1993; SHER et al., 1998). Porém, os mecanismos pelos quais o sistema imune se utiliza para a resistência à infecção pelo *T. cruzi* bem como para limitar uma resposta imune excessiva, ainda não estão completamente definidos.

A resposta imunológica do hospedeiro na infecção pelo *T. cruzi* é bastante complexa, envolvendo o reconhecimento de diversos antígenos do parasito por uma série de receptores na membrana das células, além da ativação de diferentes tipos celulares (TARLETON, 2007). Neste contexto, as citocinas desempenham um papel fundamental na regulação da função das células imunes, direcionando a resposta imune do hospedeiro e assim, influenciando no desenvolvimento ou no controle da doença.

Considerando que o tipo de resposta imune induzida parece ser crítico para a manutenção de um balanço ideal entre parasito e hospedeiro (DUTRA et al., 2014), num primeiro momento deste estudo foram determinados os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL10) no soro de pacientes na FIDC. A partir de análises quantitativas foi observado que alterações simultâneas ocorrem na secreção dessas citocinas, como discutido no decorrer desta seção.

A IL-2 é uma proteína produzida principalmente por células T CD4⁺ e em menor quantidade por células T CD8⁺. É o principal responsável por estimular o crescimento e a proliferação de linfócitos T e B, além de induzir a produção de outras citocinas, como TNF- α e IFN- γ , que resultam na ativação de monócitos, neutrófilos e células NK (DE OLIVEIRA et al., 2011). Souza e colaboradores (2004) observaram que os pacientes na FIDC apresentam uma baixa habilidade de

estimular as células T CD4⁺, demonstrando um importante mecanismo no controle da reação inflamatória, e conseqüentemente em causar menor dano tecidual. Além disto, os mesmos autores observaram que durante esta fase da doença há uma baixa resposta proliferativa das células T CD4⁺ quando comparada à fase crônica cardíaca, frente a um estímulo antigênico. Neste estudo, os pacientes na FIDC não apresentaram alteração na contagem de leucócitos totais, de linfócitos periféricos bem como dos níveis séricos de IL-2 ao grupo controle, demonstrando ausência de uma resposta linfocitária proliferativa.

Outra citocina que desempenha importante papel nos mecanismos de defesa do hospedeiro é a IL-6. Ela é produzida no início da inflamação (logo após a IL-1 e TNF- α) durante estímulos nocivos como trauma, infecção e queimadura. Seus efeitos são mediados por um complexo mecanismo (NISHIMOTO & KISHIMOTO, 2006), exibindo várias propriedades pró-inflamatórias, incluindo a promoção da proliferação de células T bem como a diferenciação de células B (YOSHIZAKI et al., 1982), megacariócitos, macrófagos e células T citotóxicas (AKIRA et al., 1993). A produção anormal de IL-6 pode afetar a resposta imune e conseqüentemente induzir doenças inflamatórias mediadas pela imunidade, tais como doença de Castleman, doença de Crohn, artrite reumatoide e artrite idiopática juvenil sistêmica (TAFUTO et al., 1994). Tem sido sugerido que a IL-6 possa atuar como um potente modulador do metabolismo de lipídios, devido a sua capacidade de estimular a lipólise bem como a oxidação lipídica, além de estar associada a uma inflamação crônica sistêmica de baixo grau como diabetes e doenças cardiovasculares (DANDONA et al., 2004; PETERSEN & PEDERSEN, 2005). Contudo, ela possui algumas propriedades anti-inflamatórias incluindo a inibição da síntese de IL-1 e TNF- α , indução de inibidores de metaloproteinases de matriz e supressão da produção de macrófagos induzidos pelo fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) bem como estimulação da secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-1R e IL-10 (CURFS et al. 1997).

Nos pacientes na FIDC foi observado maiores níveis séricos de IL-6 que o grupo controle. Embora a IL-6 possa estar envolvida na transição para a fase crônica da DC, por estimular o acúmulo de células mononucleares no sítio inflamatório, propriedades anti-inflamatórias da IL-6 parecem contribuir na manutenção das respostas imunes durante a FIDC, como a inibição da síntese de TNF- α . O controle da produção de TNF- α é crucial na FIDC, uma vez que elevados níveis têm sido

correlacionados com o grau de disfunção cardíaca em pacientes chagásicos crônicos (FERREIRA et al., 2003; LORENA et al., 2010; TALVANI et al., 2004). Ponce e colaboradores (2012) observaram um efeito citoprotetor da IL-6 liberada de células cardíacas em resposta ao *T. cruzi* por bloquear a apoptose dos cardiomiócitos durante o processo inflamatório, mantendo-os vivos em um ambiente desfavorável. Portanto, na FIDC pode-se sugerir que os níveis aumentados de IL-6 estejam relacionados a mecanismos de reparação e/ou remodelação de tecidos, controlando a progressão da DC para a fase crônica cardíaca.

A IL-17, particularmente, tem propriedades pró-inflamatórias, sendo capaz de induzir células como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e células epiteliais a produzirem vários mediadores inflamatórios (por exemplo, IL-6, TNF- α , IL-1) levando ao recrutamento de neutrófilos e inflamação (KOLLS & LINDEN, 2004). Estudos em humanos e em modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi* têm demonstrado que a IL-17 desempenha um papel protetor na DC cardíaco (DA MATTA GUEDES et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2013). Na fase aguda da DC, a infecção com *T. cruzi* leva a produção de IL-17 por células T CD4⁺ e CD8⁺, demonstrando ser necessária para a proteção do hospedeiro (MIYAZAKI et al., 2010). Na fase crônica cardíaca, propõe-se que há uma menor intensidade da expressão de IL-17 por linfócitos e menor frequência de células Th17. Desta forma, a produção de IL-17 demonstra estar associada ao controle da miocardite por modular as respostas Th1, através da regulação da diferenciação das células Th1, da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e quimiocinas, além do influxo de células inflamatórias para o tecido cardíaco (DA MATTA GUEDES et al., 2010; GUEDES et al., 2012). Na FIDC, pode-se observar que não há alteração significativa nos níveis séricos de IL-17 em relação ao grupo controle. No entanto, Magalhães e colaboradores (2013) observaram uma maior frequência de células T produtoras de IL-17 nos pacientes na FIDC em relação ao pacientes crônicos cardíacos.

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, o INF- γ desempenha um papel relevante, estando associado tanto ao controle do parasito quanto aos mecanismos que desencadeiam os fenômenos imunopatológicos da DC. A produção exacerbada desta citocina poderá desencadear uma inflamação excessiva resultando em danos teciduais para o hospedeiro, através da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) (BRENER & GAZINELLI, 1997; DUTRA et

al., 2005). Já o TNF- α é um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória. Apesar de uma meia-vida curta, é suficiente para provocar mudanças metabólicas e hemodinâmicas importantes, além de ativar outras citocinas. As ações do TNF- α consistem em: ativar a coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, do fator ativador de plaquetas, e de influenciar a apoptose celular (CURFS et al., 1997). Tem sido proposto que, além do IFN- γ (GOMES et al., 2003), a produção crônica de TNF- α também pode desempenhar um papel importante na progressão da cardiomiopatia crônica da DC (FERREIRA et al., 2003).

Enquanto, neste estudo, os níveis séricos de IFN- γ nos pacientes FIDC foram semelhantes aos do grupo controle, corroborando com os achados de outros autores (DÁVILA et al., 2009; FIUZA et al., 2009), os níveis de TNF- α apresentaram-se mais baixos. Acredita-se que esta modulação nos níveis de TNF- α durante a FIDC possivelmente esteja associado a um mecanismo regulatório induzido por elevados níveis de IL-6, com intuito de prevenir o excesso de dano tecidual, e conseqüentemente, a progressão da DC. Portanto, ao considerar que a produção de citocinas pró-inflamatória como TNF- α , IL-6 e IFN- γ modulam a expressão de moléculas de adesão que participam nos processos inflamatórios e contribuem para o desenvolvimento de uma cardiomiopatia severa, fica pressuposto que os pacientes FIDC deste estudo, não seriam potenciais candidatos ao desenvolvimento da forma cardíaca crônica devido à baixa produção de TNF- α , segundo a hipótese de Gomes e colaboradores (2003).

Diante do papel duplo das citocinas pró-inflamatórias (INF- γ e TNF- α), as citocinas do tipo Th2, irão contribuir para a regulação da resposta imune frente à infecção, reduzindo, desta forma, os danos teciduais induzidos pelo processo inflamatório. As citocinas IL-4 e IL-10 são citocinas reguladoras que possuem funções imunossupressoras, agindo através da inibição da ativação de macrófagos, da síntese de NO bem como da redução da atividade das células Th1 produtoras de IFN- γ (DUTRA et al., 2005). Portanto, vários estudos têm demonstrado que os mecanismos imunorregulatórios podem afetar a morbidade da doença nas formas clínicas crônicas. Neste contexto, associa-se a FIDC a um perfil de citocinas anti-inflamatórias, representada por alta expressão de IL-10, enquanto a forma crônica cardíaca está associada a mais alta produção de INF- γ e TNF- α em relação a IL-10, levando a um perfil inflamatório (ARAUJO et al., 2007; GOMES et al., 2003; VITELLI-AVELAR et al., 2005).

A fim de determinar o perfil de resposta imune nos pacientes FIDC, analisou-se a correlação entre os níveis de citocinas regulatórias e inflamatórias bem como o padrão de citocinas que guiam as respostas imunes Th1 e Th2. Os resultados demonstraram uma correlação positiva entre os níveis de TNF- α e IL-10 bem como IFN- γ e IL-4, demonstrando um controle da resposta inflamatória durante a FIDC. Este controle inflamatório também foi evidenciado por DÁvila e colaboradores (2009), ao observarem uma correlação positiva entre os níveis de IL-10 e IFN- γ no soro de pacientes FIDC, diferentemente dos pacientes na forma cardíaca da DC, onde há uma falta de regulação entre citocinas pró e anti-inflamatórias associada à doença severa, assim como demonstrado em pacientes com leishmaniose (GAZE et al., 2006).

O balanço inflamatório bem como as citocinas que guiam o tipo de resposta Th1 e Th2, foi avaliado a partir da razão TNF- α /IL-10 e IFN- γ /IL-4 que demonstraram uma resposta favorável aos mecanismos de controle da inflamação nos pacientes FIDC, baseado nos baixos níveis de TNF- α e elevados níveis de IL-4. A IL-4, por sua vez, tem propriedades anti-inflamatórias, tendo ação sobre os linfócitos T e B, células NK, mastócitos, células endoteliais e macrófagos ativados. Sua principal atividade é determinar o perfil da resposta imune Th2, através da indução da proliferação e diferenciação de linfócitos B, aumento da expressão de moléculas MHC classe II, possibilitando assim maior ativação de células Th2 (RIBEIRO et al., 2008). Além, da sua capacidade de ativar macrófagos a expressar receptores de manose, que o leva a aumentar suas funções microbidas, e a participar no reparo tecidual em infecções parasitárias crônicas bem como em doenças alérgicas. Esse balanço Th1/Th2 favorável a uma resposta Th2 anti-inflamatória, corroboram com outros estudos, onde pacientes FIDC apresentavam a razão IL-10/TNF- α aumentada, baseada na baixa expressão de TNF- α e alta expressão de IL-10 (DUTRA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2008; SOUZA et al., 2007), demonstrando que há uma modulação nas respostas imunes Th1. A análise dos resultados fortalece a hipótese de que uma regulação eficiente na produção de citocinas pró-inflamatória ocorre nos paciente com FIDC, permitindo que esses permaneçam na fase assintomática da doença.

O processo inflamatório está intimamente associado à disfunção endotelial e conseqüentemente a distúrbios tromboembólicos que desempenham um importante papel na progressão da DC. Isto demonstra a importância da busca de

conhecimento sobre mecanismos envolvidos na imunorregulação da DC. Em 2012, foi sugerida a participação do sistema purinérgico nos processos de tromborregulação bem como na regulação das respostas imunes nos pacientes com a FIDC, através da modulação da atividade de ecto-enzimas em plaquetas e linfócitos. Em conjunto, é sugerido que a modulação da atividade de enzimas do sistema purinérgico regulam os níveis extracelulares de ATP e adenosina, contribuindo para a persistência do parasito no tecido do hospedeiro bem como para o limite do processo inflamatório, e conseqüentemente o desenvolvimento de formação de trombos (SOUZA et al., 2012a; 2012b). Considerando que as células imunes inflamatórias exibem certo grau de plasticidade a fim de se adaptar a um novo microambiente, é relevante avaliar outros componentes da sinalização purinérgica que possam estar envolvidos nos mecanismos de imunorregulação na DC.

Neste contexto, diversos estudos têm demonstrado a importância dos receptores purinérgicos na sinalização do ATP e da adenosina na patogênese de doenças inflamatórias autoimunes bem como de infecções por diversos patógenos (AROSIO et al., 2010; CAPECCHI et al., 2005; CHAVES et al., 2009; CORRÊA et al., 2010; COUTINHO-SILVA et al., 2003; KUSNER & ADAMS, 2000; OLIVEIRA et al., 2013; VARANI et al., 2003). Portanto, baseando-se na hipótese de que receptores purinérgicos poderiam estar envolvidos nos mecanismos que modulam eventos pró e anti-inflamatórios durante a FIDC, foi avaliada, pela primeira vez, a expressão dos receptores P2X7, P2Y11 e A2A em linfócitos de pacientes com a FIDC.

O ATP extracelular é liberado nos sítios inflamatórios, funcionando como uma molécula sinalizadora de dano celular. Portanto, fatores que o reconhecem ou o processam são susceptíveis a serem significativamente modulados conforme o processo inflamatório é efetivado. A ativação do receptor P2X7 pelo ATP extracelular dá início a vários processos celulares, incluindo alterações na morfologia da célula, liberação de IL-1 β , ativação do fator transcricional NF- κ B, ativação da fosfolipase D, apoptose (KIM et al., 2001) mediada por caspases e/ou necrose (BIANCO et al. 2009), sendo que a morte celular induzida pela ativação do receptor P2X7 é altamente dependente do tipo celular (TAMAJUSUKU et al. 2010). Ao mesmo tempo, mecanismos responsáveis por alterações nas respostas celulares

frente a diferentes níveis de ATP extracelular, podem comprometer as respostas protetoras e uma inflamação ilimitada pode resultar como uma consequência.

Atribui-se ao ATP um duplo efeito biológico, pela sua capacidade de gerar uma inflamação ou uma tolerância imunológica, amplificando um sinal potencialmente modulado por suas diferentes concentrações no meio extracelular. A primeira e mais simples explicação dos efeitos inibitórios do ATP é que a regulação da inflamação é dependente da sua biotransformação em seu nucleosídeo correspondente, a adenosina que possui efeitos antagônicos ou supressores nas respostas imunes e inflamatórias. Porém, acredita-se também que o ATP possa ter uma atividade imunodepressora devido a sua citotoxicidade em células que guiam a inflamação e possuem alto nível de expressão do receptor P2X7 como as células dendríticas, macrófagos ou linfócitos T (DI VIRGILIO et al., 2009).

Os efeitos mediados pelo ATP extracelular via receptor P2X7, como a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α) (SUZUKI et al., 2004) e L-selectina, que é molécula de adesão importante para a ligação de linfócitos ao endotélio (GU et al., 1998) são importantes no desenvolvimento de doenças cardiovasculares associadas à aterosclerose. Partindo deste pressuposto surge a hipótese de que a modulação da expressão do receptor P2X7 poderia estar relacionada ao controle dos danos teciduais cardíacos, limitando a progressão da DC nos pacientes com a FIDC.

Estudos têm demonstrado que a modulação da expressão do receptor P2X7 está associada à patogênese de doenças autoimunes inflamatórias, como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, em que a baixa expressão deste receptor levaria à diminuição da indução da apoptose de células imunes bem como a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β (PORTALES-CERVANTES et al., 2010). Poucos estudos foram desenvolvidos, durante a fase aguda da DC, em relação à expressão do receptor P2X7, incluindo, observações no aumento da permeabilização celular associada ao receptor P2X7 bem como seu envolvimento na morte celular induzida pelo ATP na atrofia do timo (COUTINHO et al. 1998; MANTUANO-BARRADAS et al. 2003). No entanto, neste estudo pela primeira vez, pode-se observar que os linfócitos periféricos dos pacientes durante a FIDC expressam o receptor P2X7 sem alteração significativa nos seus níveis em relação ao grupo controle.

As moléculas pró-inflamatórias como o IFN- γ e o TNF- α podem aumentar a expressão e a função do receptor P2X7 em monócitos/macrófagos (BLANCHARD et al., 1991), porém, citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β é capaz de prevenir esta regulação, limitando os processos imunes e inflamatórios mediados pelo receptor P2X7 (GADEOCK et al., 2010). Um estudo recente sobre a infecção crônica pelo *Schistosoma mansoni*, demonstrou uma relação entre uma resposta Th2 e a redução na expressão do receptor P2X7 em células endoteliais mesentéricas, a fim de limitar o dano endotelial causado pela infecção (OLIVEIRA et al., 2013). Baseado nessas evidências, na observação de uma polarização Th2 no sistema imune dos pacientes na FIDC e na presença de uma NTPDase na superfície externa do *T. cruzi*, capaz de interagir nas respostas do hospedeiro (FIETTO et al., 2004; SANTOS et al., 2009) foi proposto que durante a FIDC poderia haver uma baixa regulação do receptor P2X7 em linfócitos.

Ao analisar a expressão gênica e proteica do receptor P2X7 em linfócitos de pacientes na FIDC, no entanto, não foi observada alteração em relação ao grupo controle. A função do receptor P2X7 pode variar entre os indivíduos, levando em consideração a sua capacidade citotóxica, ou seja, de gerar grandes poros na membrana celular através da sua estimulação por elevadas concentrações de ATP extracelular. O receptor P2X7 nos linfócitos dos pacientes na FIDC foi capaz de alterar a permeabilização celular *in vitro* através da indução por altas concentrações de ATP. Estes resultados sugerem que na presença de baixa regulação nos níveis de citocinas inflamatórias a partir da produção de citocinas anti-inflamatórias, não há uma modulação na expressão do receptor P2X7 nos linfócitos periféricos na FIDC, sendo preservada a sua capacidade citotóxica. Além disso, sugere-se que a via de sinalização mediada pelo receptor P2X7 durante a FIDC não está comprometida, porém as concentrações de ATP no meio extracelular não são suficientes para sua ativação, devido à presença de uma estimulação de baixo grau pelo *T. cruzi* na FIDC bem como da atividade de enzimas responsáveis pelo metabolismo do ATP. A partir disto, especulou-se que outros purinoreceptores poderiam estar contribuindo para a imunomodulação na FIDC, como o receptor P2Y11 e o A2A. Uma vez que estes receptores exercem efeitos inibitórios nas respostas imunes, a partir da produção aumentada de AMP cíclico intracelular (TALVANI et al., 2009).

A imunomodulação negativa ocorre na presença de muito mais baixas concentrações de ATP do que as necessárias para ativar P2X7, e de forma

independente de sua ativação. Portanto, as células ao serem intermitentemente expostas de forma lenta e crônica ao ATP, os seus efeitos são muito mais sutis, modulando as respostas imunes em direção à tolerância imunológica e supressora através da ativação de receptores do tipo P2Y, como o P2Y11 (DI VIRGILIO et al., 2009). Portanto, a sinalização induzida pela estimulação do receptor P2Y11 atua como um importante sinal de parada nas respostas imunes a fim de evitar condições que favoreçam a autoimunidade, prevenir um processo inflamatório excessivo, e conseqüentemente, evitar alterações cardiovasculares, situações essas que estão intimamente envolvidas na patogênese da DC. Entre 25% e 30% dos pacientes FIDC, evoluem para a forma cardíaca crônica da DC (MEDEI et al., 2008), portanto, mecanismos que regulam os eventos cardiovasculares são importantes no controle da evolução da doença. O receptor P2Y11 não é expresso em plaquetas, mas está associado à regulação cardíaca e vascular, através dos seus efeitos inotrópicos positivos, por estar expresso em diversas outras células, como células imunes, células endoteliais e cardiomiócitos (BALOGH et al., 2005).

Há evidências de que em condições de hipóxia, ocorra a diminuição da expressão do receptor P2Y11, que leva à perda da sua atividade imunossupressora, e conseqüentemente favorece ao desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio (CHADET et al., 2015). No caso da FIDC, foi proposto que uma modulação na expressão do receptor P2Y11 poderia estar envolvida nos mecanismos que previnem estimulação excessiva da inflamação, e protegendo os tecidos de danos oxidativos (BOURS et al., 2006). No entanto, foi observado que os linfócitos dos pacientes na FIDC expressam o gene do receptor P2Y11 sem alteração nos seus níveis em relação ao grupo. Segundo Guo e colaboradores (2008), sugere-se que normalmente há uma correlação positiva entre os níveis de expressão do RNAm de um determinado gene e da proteína correspondente. A partir disto, sugere-se que há subsídios suficientes para a síntese proteica, e pode-se prever que, durante a FIDC, tanto o nível de expressão gênica quanto proteica do receptor P2Y11 encontram-se inalteradas em relação ao grupo controle. Porém, investigações sobre a sua funcionalidade em relação à manutenção do microambiente estabelecido durante a FIDC devem ser realizadas, assim como a expressão deste receptor em diferentes formas clínicas da DC.

A capacidade do ATP extracelular de promover tolerância imune é determinada pela integração de diferentes sinais desencadeados por ele mesmo

bem como por outros mediadores no microambiente, como a adenosina. Assim, uma interação desencadeada entre os receptores P1 e P2 estimulados pela adenosina e pelo ATP, respectivamente, deve iniciar uma comunicação entre cascatas de sinalizações intracelulares que guiam a imunorregulação. A partir disto, supõe-se que outros mecanismos da sinalização purinérgica possam estar envolvidos na imunopatologia da FIDC, como a via de sinalização adenosinérgica.

Devido às propriedades imunossupressoras da adenosina extracelular, os seus receptores específicos têm sido importantes alvos moleculares na patofisiologia da inflamação. O seu acúmulo no meio extracelular, apresenta um papel imunomodulador, por limitar as respostas inflamatórias, e conseqüentemente ter um impacto em importantes aspectos da função cardiovascular, incluindo a frequência e a força dos batimentos cardíacos, a condução do impulso cardíaco, a perfusão coronária, o crescimento e remodelagem cardiovascular e resistência vascular e cardíaca frente a agressores (RIVKEES & WENDLER, 2012). Além disto, a adenosina pode contribuir para o estabelecimento da infecção por diversos parasitos, como os tripanossomatídeos, que utilizam a via de síntese *de novo* do hospedeiro para a síntese de purinas, como um mecanismo de sobrevivência (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; MAIOLI et al., 2004).

Entre os receptores adenosinérgicos, destaca-se o receptor A2A pela sua importância na modulação da inflamação através dos seus efeitos anti-inflamatórios, como a inibição da ativação de células T e o controle na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e IFN- γ por diversas células imunes (HASKÓ et al., 2000; LAPPAS et al., 2005; PANTHER et al., 2003). A expressão e a função desses receptores são reguladas por fatores inflamatórios endógenos, incluindo as citocinas pró-inflamatórias (KHOA et al., 2001). Esse mecanismo de proteção contra a produção inapropriada de citocinas pode ser evidenciado, por exemplo, na insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Tem sido relatado que em condições de isquemia cardíaca, há um aumento nos níveis de TNF- α circulante que induzem um aumento da expressão do receptor A2A em células mononucleares periféricas, que conseqüentemente, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o próprio TNF- α . Portanto, o efeito inibitório do receptor A2A mediado pela adenosina acumulada no meio extracelular pode ser atribuído ao aumento do AMP cíclico intracelular, que atenua a atividade transcricional do NF- κ B (CAPECCHI et al., 2005).

Há uma regulação coordenada dos efeitos da adenosina extracelular por ação de ecto-enzimas do sistema purinérgico, além da sinalização desencadeada pelos receptores purinérgicos. Asakura e colaboradores (2007) demonstraram que uma diminuição da expressão gênica de receptores adenosinérgicos no miocárdio pode prejudicar a sinalização induzida pela adenosina, contribuindo assim para a patofisiologia da ICC. No entanto, uma redução na atividade da E-ADA, a fim de preservar a adenosina no meio extracelular, pode compensar a redução na expressão dos receptores, melhorando a função cardíaca nos pacientes.

Na FIDC, pode-se observar que há uma diminuição dos níveis de TNF- α e um aumento de IL-4 circulante, além de uma diminuição da expressão gênica do receptor A2A em linfócitos periféricos. Neste caso, os resultados sugerem que possivelmente o microambiente anti-inflamatório gerado durante a FIDC está associado à modulação negativa da expressão do receptor A2A em linfócitos, a fim de limitar a imunossupressão exercida pela adenosina extracelular. Para que o sinal inibitório da adenosina extracelular na resposta imune seja parcialmente efetivo, ou seja, não comprometa o controle do parasitismo e a vigilância imunológica do hospedeiro, a redução na atividade da E-ADA em linfócitos de pacientes na FIDC (SOUZA et al., 2012) parece exercer papel importante para preservar a adenosina no meio extracelular e garantir seus efeitos mediados pela presença de uma baixa expressão de receptores A2A. Portanto, a via de sinalização adenosinérgica parece estar envolvida, nos mecanismos imunorregulatórios durante a FIDC, devido essencialmente à atividade imunossupressora da adenosina em estágios mais tardios da inflamação diferentemente da sinalização induzida pelo ATP através do receptor P2Y₁₁ (FREDHOLM et al., 2007; SITKOVSKY & OHTA, 2005).

Um ponto importante a ser considerado é que além da participação dos linfócitos Th1, controlando o parasitismo e promovendo a expansão de linfócitos T CD8+, e dos linfócitos Th2 responsáveis por diminuir a expressão de células efetoras bem como moléculas que ativam essas células, sustentando o parasitismo (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996), têm sido relacionada uma maior frequência de linfócitos T regulatórios (CD4⁺CD25^{high}) à FIDC. Os linfócitos T regulatórios (Treg), por sua vez, desempenham um importante papel na manutenção da tolerância imunológica e do controle negativo das respostas imunes patológicas, através da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (ARAUJO et al. 2007, VITELLI-AVELAR et al., 2005). Os linfócitos Treg expressam alto nível das

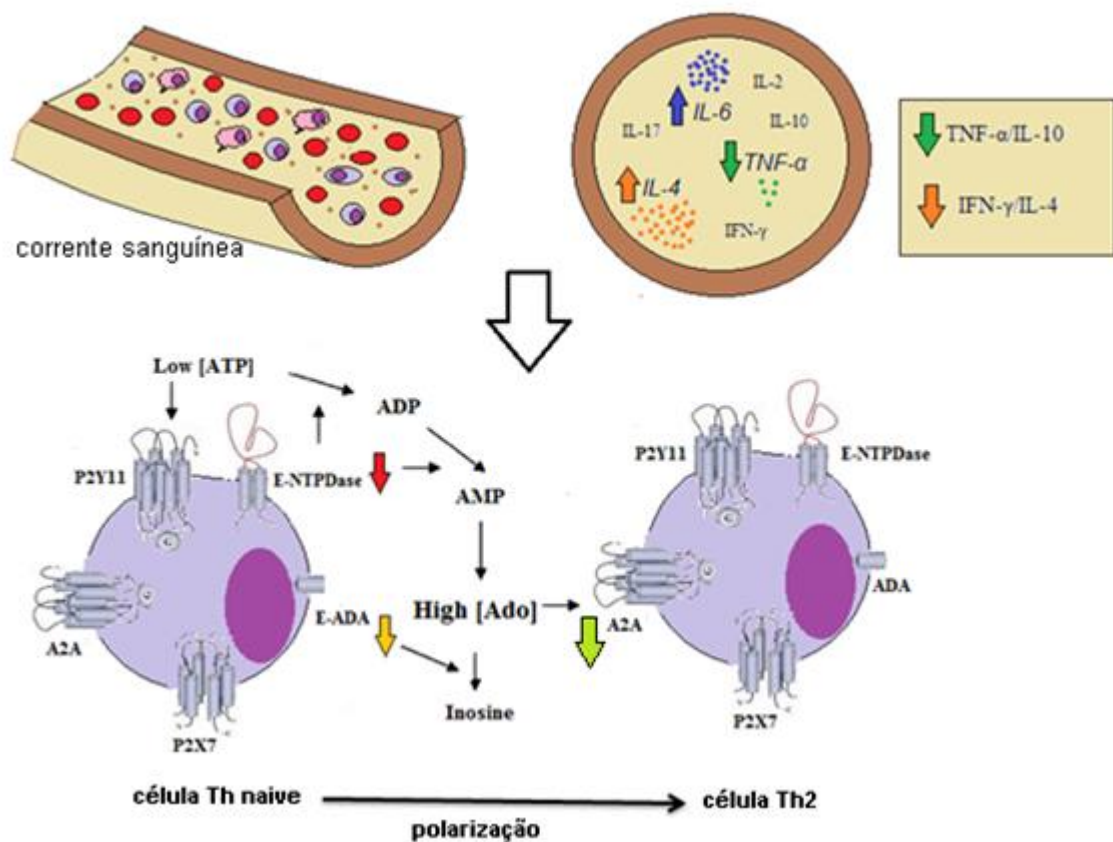
ectonucleotidases, CD39 e CD73, e baixos níveis de ADA, enquanto, as células T efetoras expressam os níveis destas enzimas de forma contrária. Neste contexto, a metabolização do ATP extracelular a partir da atividade de ectonucleotidases na superfície de linfócitos Treg gera a adenosina que ao estimular os receptores A2A dessas células desencadeia a sua expansão bem como o aumento da sua atividade imunorregulatória. Além disto, a ação inibitória da adenosina gerada é atribuída à ativação de receptores A2A em linfócitos T efetores, que reduzem suas atividades imunes, através do aumento da produção de AMP cíclico intracelular. Em conjunto, a inibição da atividade da ADA nas células T efetoras aumenta a imunossupressão mediada por linfócitos Treg. Isto demonstra que a sinalização autócrina e parácrina da adenosina ocorre em diferentes subtipos de linfócitos no sistema periférico, que podem estar contribuindo para a prevenção do progressão da doença crônica da DC.

Em resumo, os resultados deste estudo dão suporte ao fato de que a ausência de sintomas clínicos da DC ocorre devido a um equilíbrio nas respostas imunes Th1 e Th2, através da regulação da secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias, que está associada à adaptação do hospedeiro e ao parasitismo persistente pelo *T. cruzi*. Contudo, o perfil de resposta imune durante a FIDC favorável a uma resposta Th2, parece estar associado à modulação da expressão gênica do receptor A2A, mas não dos receptores purinérgicos P2X7 e P2Y11 nos linfócitos periféricos. Portanto, ao dar continuidade aos estudos relacionados à participação da sinalização purinérgica durante a FIDC, pode-se observar que os mecanismos da sinalização adenosinérgica desempenham um papel importante na regulação das respostas imunes, inflamatórias e vasculares durante a FIDC, controlando a evolução clínica da doença, como esquematizado na Figura 11. Assim, os receptores da adenosina tornam-se alvos potenciais para estudo e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que evitem ou retardem o aparecimento das manifestações clínicas da doença bem como subsídios para o tratamento de outras doenças mediadas pela imunidade.

Por fim, especula-se que além dos mecanismos imunorregulatórios envolvidos na patogênese da DC, os fatores genéticos do hospedeiro são importantes determinantes da prevalência da doença e suas manifestações clínicas, sendo responsáveis pela heterogeneidade da DC. O fato de que somente parte da população que vive em áreas endêmicas torna-se infectada e somente um terço dos

cronicamente infectados desenvolvem sintomas, sugere-se o aprofundamento do estudo genético dos receptores aqui estudados, uma vez que diversos polimorfismos têm sido identificados e associados à susceptibilidade e ao desenvolvimento de diversas doenças.

Figura 11 – Resumo esquemático da modulação da resposta imune e da participação da sinalização purinérgica em linfócitos de pacientes na forma indeterminada da doença de Chagas (FIDC).



Fonte: elaborada pelo autor.

Os pacientes na FIDC apresentam uma regulação na atividade da E-NTPDase e da E-ADA em seus linfócitos periféricos, a fim de manter baixos os níveis de ATP e altos os níveis de adenosina extracelulares, respectivamente (SOUZA et al., 2012). Durante a FIDC, a geração de um microambiente anti-inflamatório, contribui para a modulação negativa na expressão gênica do receptor A2A em linfócitos periféricos, que parece exercer um importante papel em limitar a imunossupressão induzida pela preservação de altos níveis de adenosina extracelular. Em conjunto, estes resultados demonstram que a via de sinalização adenosinérgica representa um importante mecanismo regulatório na resposta imune, inflamatória e vascular na adaptação entre hospedeiro e parasito, prevenindo a evolução clínica da doença.

5 CONCLUSÃO

- Os pacientes com a FIDC apresentaram significativamente mais baixos níveis séricos de TNF- α e mais altos níveis de IL-4 e IL-6 que o grupo controle, demonstrando que há um controle do desenvolvimento da doença, por limitar os processos inflamatórios.
- As alterações nos níveis séricos de citocinas inflamatórias e regulatórias observadas nos pacientes com FIDC demonstraram que o equilíbrio das respostas imunes Th1/Th2 é favorável a uma resposta anti-inflamatória, como resultado de uma adaptação do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*, evitando assim maiores danos teciduais e a evolução clínica da doença.
- Os resultados revelaram que há linfócitos periféricos circulantes que expressam o receptor purinérgico P2X7 nos pacientes FIDC, no entanto, não há modulação na sua expressão com a presença de um microambiente anti-inflamatório.
- O receptor P2X7 dos linfócitos periféricos dos pacientes FIDC demonstrou possuir atividade citotóxica, sendo capaz de induzir dano celular, assim que haja um desequilíbrio na imunidade e que se estabeleça a progressão da DC.
- Foi demonstrado que os linfócitos periféricos de pacientes FIDC também expressam o gene do receptor P2Y11. No entanto, a expressão deste receptor está mantida a níveis basais, sugerindo que esta via de sinalização anti-inflamatória mediada por baixas concentrações de ATP extracelular está preservada.
- Além dos receptores de nucleotídeos avaliados, os linfócitos dos pacientes FIDC expressam o gene do receptor de adenosina A2A. Porém, esta expressão encontra-se diminuída, possivelmente em resposta ao microambiente anti-inflamatório, evitando assim uma imunossupressão capaz de alterar a vigilância imunológica.
- Entre os receptores purinérgicos avaliados, sugere-se que a modulação na sinalização adenosinérgica parece desempenhar importante papel imunorregulatório induzido por um microambiente anti-inflamatório gerado pela infecção com o *T. cruzi*, como um mecanismo dinâmico a fim de manter os pacientes assintomáticos durante a FIDC.

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Introdução ao Sistema Imunológico. In:____. **Imunologia Básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico**, 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap.6, p.111-127, 2009.
- ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? **Pharmacology & Therapeutics**, v.64, p.445 – 475, 1994.
- ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Pathophysiological roles. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.78, p.113–145, 1998.
- ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. et al. International Union of Pharmacology. Update and subclassification of the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n.3, p. 281 – 341, 2006.
- ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Experimental Parasitology**, v.84, p.231-44, 1996.
- AGTERESCH, H.J.; DAGNELIE, P.C.; VAN DEN BERG, J. W. et al. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. **Drugs**, v.58, p.211-32, 1999.
- AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. **Advances in Immunology**, v.54, p.1-78, 1993.
- ALVES-FERREIRA, M.; DUTRA, P.M.; LOPES, A.H. et al. Magnesium-dependent ecto-ATP diphosphohydrolase activity in *Herpetomonas muscarum muscarum*. **Current Microbiology**, v.47, p.265-271, 2003.
- ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.; CHIARI, E. et al. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, v.100, p.269-75, 2002.
- ANTONELLI, L.R.; DUTRA, W.O.; ALMEIDA, R.P. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, v.101, p.226-230, 2005.
- ANTONIOLLI, L.; PACHER, P.; VIZI, E.S. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, p. 355-367, 2013.
- ANTÚNEZ, M.I.; CARDONI, R.L. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**, v.71, p.103-9, 2000.
- APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I. et al. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.99, p. 733-41, 2005.

- ARAUJO, F.F.; GOMES, J.A.; ROCHA, M.O. et al. Potential role of CD4⁺CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Frontiers in Bioscience**, v.12, p.2797–2806, 2007.
- ARMSTRONG, S.; KORCOK, J.; SIMS, S. M. et al. Activation of transcription factors by extracellular nucleotides in immune and related cell types. **Purinergic Signalling**, v.3, p.59-69, 2007.
- AROSIO, B.; VIAZZOLI, C.; MASTRONARD, L. et al. Adenosine A2A receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with mild cognitive impairment. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.20, p. 991-996, 2010.
- ASAKURA, M.; ASANUMA, H.; KIM, J. et al. Impact of adenosine receptor signaling and metabolism on pathophysiology in patients with chronic heart failure. **Hypertension Research**, v.30, p.781-7, 2007.
- ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJOJI, K. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic target. **Blood cells, Molecules and Diseases**, v.36, p.217-222, 2006.
- AVILA, J. L.; AVILA, A.; MONZÓN, H. Differences in allopurinol and 4 aminopyrazolo (3,4-d) pyrimidine metabolism in drug-sensitive and insensitive strains of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.11, p.51-60, 1984.
- BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; GOMES, J.A.; ROCHA M. O. et al. IFN-gamma in human Chagas disease: protection or pathology? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.127-131, 1988.
- BALOGH, J.; WIHLBORG, A.K.; ISACKSON, H. et al. Phospholipase C and cAMP-dependent positive inotropic effects of ATP in mouse cardiomyocytes via P2Y₁₁-like receptors. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.39, p.223–230, 2005.
- BARALDI, P.G.; TABRIZI, M.A.; GESSI, S. et al. Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. **Chemical Reviews**, v.108, p.238-63, 2008.
- BAROJA-MAZO, A.; BARBERÀ-CREMADES, M.; PELEGRÍN P. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, p. 79-93, 2013.
- BASSO, A. M.; BRATCHER, N. A.; HARRIS, R. R. et al. Behavioral profile of P2X₇ receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. **Behavioural Brain Research**, v.198, p.83–90, 2009.
- BERMUDES, D.; PECK, K. R.; AFIFI, M. A. et al. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.29252-29260, 1994.

- BERRÊDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C. E.; CHRISPIM, P. P. et al. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.391, p.16-24, 2001.
- BIANCO, F.; COLOMBO, A.; SAGLIETTI, L. et al. Different properties of P2X(7) receptor in hippocampal and cortical astrocytes. **Purinergic Signalling**, v.5, p.233-240, 2009.
- BLANCHARD, D. K.; MCMILLEN, S.; DJEU, J. Y. et al. IFN- γ enhances sensitivity of human macrophages to extracellular ATP-mediated lysis. **Journal of Immunology**, v.147, p.2579–2585, 1991.
- BOEYNAEMS, J. M.; COMMUNI, D. Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.126, p.943-944, 2006.
- BOURS, M. J.; SWENNEN, E. L.; DI VIRGILIO, F. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.358-404, 2006.
- BRENER, Z. Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease. **Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale**, v.65, p.9-13, 1985.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, p. 103-110, 1997.
- BURNSTOCK, G. (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: **Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach**, pp. 107 – 118, Straub, R. W. and Bolis, L. (eds.), Raven Press, New York.
- BURNSTOCK, G.; BOEYNAEM, J.M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signaling**, v. 10, p. 529-564, 2014.
- BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? **General Pharmacology**, v.16, p.433 – 440, 1985.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v.240, p.31 – 304, 2004.
- BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signalling. **Pharmacological Reviews**, v.58, p.58 – 86, 2006.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.64, p.1471 – 1483, 2007.
- CAPECCHI, P. L.; CAMURRI, A.; POMPELLA, G. et al. Upregulation of A2A adenosine receptor expression by TNF-alpha in PBMC of patients with CHF: a

regulatory mechanism of inflammation. **Journal of Cardiac Failure**, v.11, p.67-73, 2005.

CARDILLO, F.; POSTOL, E.; NIHEI, J. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8⁺ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v.122, p.584-595, 2007.

CASCABULHO, C.M.; MENNA-BARRETO, R.F.; COUTINHO-SILVA, R. et al. P2X7 modulatory web in *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, v.103, p.829-838, 2008.

CASELEY E. A.; MUENCH S. P.; ROGER S. et al. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 13344-13371, 2014.

CHADET, S.; IVANES, F.; BENOIST, L. et al. Hypoxia/Reoxygenation Inhibits P2Y11 Receptor Expression and Its Immunosuppressive Activity in Human Dendritic Cells. **Journal of Immunology**, v.195, p.651-60, 2015.

CHAGAS, C. Processos patogênicos da tripanozomíase americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.8, p.5-59, 1916.

CHAVES, S. P.; TORRES-SANTOS, E. C.; MARQUES, C. et al. Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonenses* and its role in parasite elimination. **Microbes and Infection**, v.11, p.842-849, 2009.

CHEN, G.Y.; AND NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews. Immunology**, v.10, p.826-837, 2010.

COBB, B. R.; CLANCY, J. P. Molecular and cell biology of adenosine receptors. **Current Topics in Membranes**, v.54, p.151 – 181, 2003.

COCKCROFT, S.; GOMPERS, B. D. The ATP4- receptor of rat mast cells. **The Biochemical Journal**, v.188, p.789-98, 1980.

COCKCROFT, S.; GOMPERS, B. D. Activation and inhibition of calcium-dependent histamine secretion by ATP ions applied to rat mast cells. **The Journal of Physiology**, v.296, p.229-43, 1979.

CONIGRAVE, A. D.; FERNANDO, K. C.; GU, B. et al. P2Y(11) receptor expression by human lymphocytes: evidence for two cAMP-linked purinoceptors. **European Journal of Pharmacology**, v.426, p.157-163, 2001.

CORREA, G.; MARQUES DA SILVA, C.; DE ABREU MOREIRA-SOUZA, A. C. et al. Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. **Microbes and Infection**, v.12, p.497-504, 2010.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v.465, p.56–57, 2010.

COUTINHO C.M.L.M., PONS A.H., ARAUJO-JORGE T.C. et al. Enhancement of P2Z-associated cell permeabilization during acute phase of Chagas' disease. **Drug Development Research**, v.43, p.38, 1998.

COUTINHO-SILVA, R.; CORREA, G.; SATER, A. A. et al. The P2X(7) receptor and intracellular pathogens: a continuing struggle. **Purinergic Signaling**, v.5, 197-204, 2009.

COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. **Microbes and Infection**, v.14, p.1271-1277, 2012.

COUTINHO-SILVA R.; PERSECHINI P. M.; BISAGGIO, R. D. et al. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. **The American Journal of Physiology**, v.276, p.C1139-1147, 1999.

COUTINHO-SILVA, R.; STAHL, L.; RAYMOND, M. N. et al Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. **Immunity**, v.19, p.403-412, 2003.

CRONSTEIN, B.N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **Journal of Applied Physiology**, v.76, p.5-13, 1994.

CUNA, W. R.; CUNA, C. R. Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p. 503-506, 1995.

CURFS J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. Primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p.742-80, 1997.

DA MATTA GUEDES P. M.; GUTIERREZ, F. R.; MAIA, F. L. et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, p.e604, 2010.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**, v.25, p.4–7, 2004.

DA ROCHA E SILVA, E. O.; GUARITA, O. F.; ISHIHATA, G. K. Chagas disease: vector control activities in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.31, p.99-119, 1979.

D'AVILA, D.A., GUEDES, P.M., CASTRO, A.M., GONTIJO, E.D., CHIARI, E., GALVÃO, L.M. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 100-5, 2009.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E.; DE OLIVEIRA, J. C.; FIGUEIREDO, A. B. et al. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v.10, p.850-7, 2008.

DE JESUS, J. B.; DE SÁ PINHEIRO, A. A.; LOPES, A. H. et al. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. **Zeitschrift FürNaturforschung C, Journal of Biosciences**, v.57, p.890-896, 2002.

DE OLIVEIRA C. M.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. et al. Cytokines and pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, p.255-9, p.260-5, p.137-42, 2011.

DE SOUZA, M. C.; DE ASSIS, E. A.; GOMES, R. S. et al. The influence of ectonucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. **Acta Tropica**, v.115, p.262-9, 2010.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.1-12, 2003.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, p.587-600, 2001.

DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling**, v.1, p.205-209, 2005.

DI VIRGILIO, F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. **Trends in Pharmacology Sciences**, v.28, p.465-472, 2007.

DI VIRGILIO, F.; BOEYNAEMS, J. M.; ROBSON, S. C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. **Current Opinion in Pharmacology**, v.9, p.507-13, 2009.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, p.13-22, 2007.

DIAS, J. C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.22, p.147-156, 1989.

DOS-SANTOS, A. L.; CARVALHO-KELLY, L. F.; DICK, C. F. et al. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. **Experimental Parasitology**, v.167, p.67-75, 2016.

DUHANT, X.; SCHANDENE, L.; BRUYNS, C. et al. Extracellular adenine nucleotides inhibit the activation of human CD4 T lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.169, p.15-21, 2002.

DUTRA, W. O.; COLLEY, D. G.; PINTO-DIAS, J. C. et al. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.51, p.91-97, 2000.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology*, v.21, p.581-7, 2005.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.21, p.287-92, 2008.

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A; MAGALHÃES, L. M. ET AL. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology**, v.36,p.377-87, 2014.

ELTZSCHIG, H. K.; BONNEY, S. K.; ECKLE, T. Attenuating myocardial ischemia by targeting A2B adenosine receptors. **Trends in Molecular Medicine**, p.19, p.345–354, 2013.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic signaling during inflammation. **The New England journal of medicine**, v.367, p.2322-33, 2012.

ERLINGE, D.; BURNSTOCK, G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. **Purinergic Signalling**, v.4, p.1–20, 2008.

ESLICK, G. D.; THAMPAN, B. V.; NALOS, M. et al. Circulating interleukin-18 concentrations and a loss-of-function P2X7 polymorphism in heart failure. **International Journal of Cardiology**, v.137, p.81-3, 2009.

FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; ADINOLFI, E. et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1processing and release. **Journal of Immunology**, v.176, p.3877-3883, 2006.

FERREIRA, R. C.; IANNI, B. M.; ABEL, L. C. et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomiopathy patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.407-11, 2003.

FIETTO, J. L. R.; DEMARCO, R.; NASCIMENTO, I. P. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.316, p.454-460, 2004.

FIGUEIREDO, A. B.; SERAFIM, T. D.; MARQUES-DA-SILVA, E. A. et al. Leishmania amazonensis impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A(2B) adenosine receptor activation, **European Journal of Immunology**, v.42, p.1203-1215, 2012.

FIUZA J. A.; FUJIWARA, R. T.; GOMES, J. A. et al. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, p.e512, 2009.

FLOGEL, U; BURGHOFF, S.; VAN LENT, P. L. et al. Selective activation of adenosine A2A receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. **Science Translational Medicine**, v.4, p.146ra108, 2012.

FORREST, C. M.; HARMAN, G.; MCMILLAN, R. B. et al. Modulation of cytokine release by purine receptors in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.23,p.89–92, 2005.

FREDHOLM, B.B.; CHERN, Y.; FRANCO, R. et al. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. **Progress in Neurobiology**, v.83, p.263-76, 2007.

FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A. et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological Reviews**, v.53, p.527-552, 2001.

FULLER, S. J.; STOKES, L.; SKARRATT, K. K. et al. Genetics of the P2X7 receptor and human disease. **Purinergic Signalling**, v.5, p.257-62, 2009.

GADEOCK, S.; TRAN, J. N.; GEORGIU, J. G. et al. TGF- β 1 prevents up-regulation of the P2X7 receptor by IFN- γ and LPS in leukemic THP-1 monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1798, p.2058-66, 2010.

GALLUCCI, S.; MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. **Current Opinion in Immunology**, v.13, p.114-9, 2001.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v.115, p.22–27, 2010.

GAZE, S. T.; DUTRA, W. O.; LESSA, M. et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.63, p.70-8, 2006.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S. et al. In the absence of endogenous IL-10 mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4 T cells and accompanied by overexpression of IL-12, IFN- γ and TNF- α . **Journal of Immunology**, v.157, p.798–805, 1996.

GOMES, J.A.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; ROCHA, M.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v.71, p. 1185-93, 2003.

GORDON, J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. **The Biochemical Journal**, v.233, p.309-19, 1986.

GORINI, S.; CALLEGARI, G.; ROMAGNOLI, G. et al. ATP secreted by endothelial cells blocks CXCL 1-elicited natural killer cell chemotaxis and cytotoxicity via P2Y receptor activation. **Blood**, v.116, p.4492-4500, 2010.

GU, B.; BENDALL, L. J.; WILEY, J. S. Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. **Blood**, v.92, p.946–951, 1998.

GUEDES, P.M.; ANDRADE, C.M.; NUNES D.F. et al. Inflammation enhances the risks of stroke and death in chronic Chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, p.e0004669, 2016.

GUEDES, P. M.; GUTIERREZ, F. R.; SILVA, G. K. et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, p.e1630, 2012.

GUO, Y.; XIAO, P.; LEI, S. et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.40, p.426-36, 2008.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immunology**, v.25, p.33-39, 2004.

HASKÓ, G.; KUHEL, D. G.; CHEN, J. F. et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A_{2a} receptor-dependent and independent mechanisms. **FASEB Journal**, v.14, p.2065-74, 2000.

HASKÓ, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B. et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v.7, p.759-70, 2008.

HIGUCHI, M.L. Doença de Chagas. Importância do Parasita na Patogenia da Forma Crônica Cardíaca. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.64, p.251-254, 1995.

HOEBERTZ, A.; ARNETT, T. R.; BURNSTOCK, G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.24, p.290-7, 2003.

HORCKMANS, M.; MARCET, B.; MARTEAU, F. et al. Extracellular adenine nucleotides inhibit the release of major monocyte recruiters by human monocyte derived dendritic cells. **FEBS Letters**, v.580, p.747-754, 2006.

HOTEZ, P. J.; FERRIS, M. T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v.24, p.5787-99, 2006.

HUMPHREYS, B. D.; DUBYAK, G. R. Modulation of P2X₇ nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. **Journal Leukocyte Biology**, v.64, p.265-273, 1998.

IANNI, B. M.; ARTEAGA, E.; FRIMM, C. C. et al. Chagas' heart disease: evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.77, p.59-62, 2001.

IDZIKO, M.; FERRARI, D.; ELTZSCHIG, H.K. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature**, v.509, p.310-317, 2014.

IYER, S. S.; PULSKENS, W. P.; SADLER, J. J. et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the NLRP3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p.20388-20393, 2009.

JACOBSON, K. A.; BALASUBRAMANIAN, R.; DEFLORIAN, F. et al G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. **Purinergic Signalling**, v.8, p.419-436, 2012.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Review. Drug Discovery*, v.5, p.247-64, 2006.

JIANG, L. H. Inhibition of P2X(7) receptors by divalent cations: old action and new insight. **European Biophysics Journal**, v.38, p.339-46, 2009.

JOHNSON, K. W.; DAVIS, B. H.; SMITH, K. A. cAMP antagonizes interleukin 2-promoted T-cell cycle progression at a discrete point in early G1. **Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of American**, v.85, p.6072-6076, 1988.

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 201-212, 2011.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D.C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, p.e29, 2010.

KHABNADIDEH, S.; PEZ, D.; MUSSO, A. et al. Design, synthesis and evaluation of 2,4-diaminoquinazolines as inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, p.2637-49, 2005.

KHAKH, B. S.; NORTH, R. A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. **Nature**, v.442, p.527-532, 2006.

KHOA, N. D.; MONTESINOS, C.; REISS, A. B. et al. Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A2A receptors in human monocytic THP-1 cells. **Journal of Immunology**, v.167, p.4026-32, 2001.

KIM, M.; JIANG, L. H.; WILSON, H. L. et al. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. **The EMBO Journal**, v.20, p.6347-58, 2001.

KOLLS, J. K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v.21, p.467-476, 2004.

KOPPERUD, R.; KRAKSTAD, C.; SELHEIM, F. et al. cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. **FEBS Letters**, v.546, p. 21-126, 2003.

KRONLAGE, M.; SONG J.; SOROKIN, L. et al. Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis, **Science Signaling**, v.3, p.ra55, 2010.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v.30, p.16e34, 2011.

KUSNER, D. J.; ADAMS, J. ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D. **Journal of Immunology**, v.164, p.379-388, 2000.

LA SALA, A.; FERRARI, D.; CORINTI, S. et al. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. **Journal of Immunology**, v.166, 1611-1617, 2001.

LABASI, J. M.; PETRUSHOVA, N.; DONOVAN, C. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. **Journal of Immunology**, v.168, p.6436-6445, 2002.

LAPPAS, C. M.; RIEGER, J. M.; LINDEN, J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. **Journal of Immunology**, v.174, p.1073-80, 2005.

LAZAROWSKI, E. R.; BOUCHER, R. C. UTP as an extracellular signaling molecule. **Physiology**, v. 16, p. 1-5, 2001.

LEES, M. P.; FULLER, S. J.; MCLEOD, R. et al. P2X7 receptor-mediated killing of an intracellular parasite, *Toxoplasma gondii*, by human and murine macrophages. **Journal of Immunology**, v.184, p.7040-7046, 2010.

LIBERT, F.; PARMENTIER, M.; LEFORT, A. et al. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. **Science**, v.244, p.569 – 572, 1989.

LONDOS, C., COOPER, D. M. AND WOLFF, J. Subclasses of external adenosine receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.77, p.2551 – 2554, 1980.

LOPES, E. R.; DE MESQUITA, P. M.; DE MESQUITA, L. F. Coronary arteriosclerosis and myocardial infarction in chronic Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.65, p.143-5, 1995.

LORENA, V. M.; LORENA, I. M.; BRAZ, S. C. et al. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.72, p.529-39, 2010.

MACEDO A.M., MACHADO C.R., OLIVEIRA R.P., PENA S.D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the

pathogenesis of chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.1-12, 2004.

MAGALHAES, L. M.; VILLANI, F. N.; DO NUNES, M. C. et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v.207, p.661–665, 2013.

MAGUIRE, J.H.; HOFF, R.; SHERLOCK, I. et al. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. **Circulation**, v.75, p.1140-1145, 1987.

MAIOLI, T. U.; TAKANE, E.; ARANTES, R. M. et al. Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. **Parasitology Research**, v.94, p.207-12, 2004.

MANTUANO-BARRADAS, M.; HENRIQUES-PONS, A.; ARAÚJO-JORGE, T.C. et al. Extracellular ATP induces cell death in CD4+/CD8 double-positive thymocytes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, v.5, p.1363-1371, 2003.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nature Review. Immunology**, v.7, p.31-40, 2007.

MARINHO, C. R.; NUÑEZ-APAZA, L. N.; MARTINS-SANTOS, R. et al. 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**, v.66, p.297-308, 2007.

MARIN-NETO, J. A.; MARZULLO, P.; MARCASSA, C. et al. Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas' disease as detected by thallium-201 scintigraphy. **The American Journal of Cardiology**, v.69, p.780-784, 1992.

MARQUES-DA-SILVA, C.; CHAVES, M. M.; RODRIGUES, J. C. et al. Differential Modulation of ATP-Induced P2X7-Associated Permeabilities to Cations and Anions of Macrophages by Infection with *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**, v.6, p.e25356, 2011.

MARTEAU, F.; GONZALEZ, N. S.; COMMUNI, D. et al. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. **Blood**, v.106, p.3860-3866, 2005.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annual Review Immunology**, v. 12, p.991-1045, 1994.

MEDEI, E. H.; NASCIMENTO, J. H. M.; PEDROSA, R. C. et al. Role of autoantibodies in the physiopathology of Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, v.91, p.281-286, 2008.

- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, p.428-435, 2008.
- MEUSER-BATISTA, M.; CORRÊA, J. R.; CARVALHO, V. F. et al. Mast cell function and death in *Trypanosoma cruzi* infection. **The American of Journal Pathology**, v.179, p.1894-1904, 2011.
- MILLER, J. S.; CERVENKA, T.; LUND, J. et al. Purine metabolites suppress proliferation of human NK cells through a lineage-specific purine receptor. **Journal of Immunology**, v.162, p.7376-7382, 1999.
- MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; FULLER, S. J. et al. The role of the P2X₇ receptor in infectious diseases. **PLoS Pathogens**, v.7, p.e1002212, 2011.
- MIYAZAKI, Y.; HAMANO, S.; WANG, S. et al. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v.185, p.1150–1157, 2010.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.17–30, 2009.
- MONTESINOS, M. C.; DESAI, A.; DELANO, D. et al. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. **Arthritis and Rheumatism**, v.48, p.240–7, 2003.
- MOSENDEN, R.; TASKÉN, K. Cyclic AMP-mediated immune regulation— overview of mechanisms of action in T cells. **Cellular Signalling**, v.23, p.1009–1016, 2011.
- MOTT, K. E.; DESJEUX, P.; MONCAYO, A. et al. Parasitic diseases and urban development. **Bulletin of the World Health Organization**, v.68, p.691–698, 1990.
- MULLER, I.; KROPF, P.; ETGES, R. J. et al. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8 T cells. **Infection and Immunity**, v.61, p.3130–3738, 1993.
- MUÑOZ, J.; GÓMEZ I PRAT, J.; GÁLLEGO, M. et al. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). **Acta Tropica**, v.111, p.51-55, 2009.
- NAKAJIMA-SHIMADA, J.; HIROTA, Y.; AOKI, T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.40, p.2455-8, 1996.
- NARA, T.; KAMEI, Y.; TSUBOUCHI, A. et al. Inhibitory action of marine algae extracts on the *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase activity and on the protozoan growth in mammalian cells. **Parasitology International**, v.54, p.59-64, 2005.

NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Interleukin 6: from bench to bedside. **Nature Clinical Practice. Rheumatology**, v.2, p.619-26, 2006.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiological Reviews**, v.82, p.1013 – 1067, 2002

NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Pharmacology of cloned P2X receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.40, p.563-80, 2000.

OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. **Nature**, v.414, p.916–920, 2001.

OLIVEIRA, M. F.; DIAS, A. T. N.; PONTES, V. M. O. Tratamento etiológico da Doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.37, p.209-28, 2008.

OLIVEIRA, S. D.; COUTINHO-SILVA, R.; SILVA, C. L. Endothelial P2X7 receptors' expression is reduced by schistosomiasis. **Purinergic Signalling**, v.9, p.81-89, 2013.

ORRENIUS, S.; MCCONKEY, D. J.; BELLOMO, G. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.10, p.281-5, 1989.

PANTHER, E.; CORINTI, S.; IDZKO, M. et al. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. **Blood**, v.101, p.3985-90, 2003.

PARK, H.; LI, Z.; YANG, X. O. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v.6, p.1133–1141, 2005.

PARVATHENANI, L. K.; TERTYSHNIKOVA, S.; GRECO, C. R. et al. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is upregulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's Disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.13309–13317, 2003.

PELEGRIN, P.; BARROSO-GUTIERREZ, C.; SURPRENANT, A. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. **Journal of Immunology**, v.180, p.7147–7157, 2008.

PENIDO, M. L. O.; RESENDE, D. M.; VIANELLO, M. A. et al. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **European Journal of Pharmacology**, v.570, p.10-17, 2007.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.98, p.1154–1162, 2005.

PONCE, N.E., CANO, R.C.; CARRERA-SILVA, E.A.; LIMA, A.P.; GEA, S.; AOKI, M.P. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from

apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. **Medical Microbiology and Immunol**, v. 201, p. 145-55, 2012.

PORTALES-CERVANTES L.; NIÑO-MORENO P.; DONÍZ-PADILLA L. et al. Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lúpus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Human Immunology**, v.71, p.818-825, 2010.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. **The Lancet Infectious Disease**, v.1, p.92-100, 2001.

PRICE, M.J. Bedside evaluation of thienopyridine antiplatelet therapy. **Circulation**, v.119, p.2625-32, 2009.

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R. M.; KHAN, I. A. et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v.115, p.279-83, 2007.

RAETHER, W.; HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**, v.90, p.19-39, 2003.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v.50, p.413 – 492, 1998.

RASKOVALOVA, T.; HUANG, X.; SITKOVSKY, M. et al. Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *Journal of Immunology*, v.175, p.4383-91, 2005.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, 2010, v.375, p.1388–1402, 2010.

RASSI, A. JR.; RASSI, S. G.; RASSI, A. Sudden death in Chagas' disease. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.76, p.75–96, 2001.

RESHKIN, S. J.; GUERRA, L.; BAGORDA, A. et al. Activation of A(3) adenosine receptor induces calcium entry and chloride secretion in A(6) cells. **The Journal of Membrane Biology**, v.178, p.103–113, 2000.

RIBEIRO, B. M.; CREMA, E.; RODRIGUES, V. JR. et al. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. **Human Immunology**, v.69, p.484-9, 2008.

RIVERA, M. T.; DE SOUZA, A. P.; ARAUJO-JORGE, T. C. et al. Trace elements, innate immune response and parasites. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.41, p.1020-5, 2003.

RIVKEES, S. A.; WENDLER, C. C. Regulation of cardiovascular development by adenosine and adenosine-mediated embryo protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.32, p.851–855, 2012.

ROCHA E SILVA, E.O. et al. Doença de Chagas. Atividades de controle de transmissores no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.31, p. 99-119, 1979.

ROSSI, M.A.; CAROBREZ, S.G. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. **British Journal Experimental of Pathology**, v.66, p.155-160, 1985.

ROTTENBERG, M.; CARDONI, R. L.; ANDERSSON, R. et al. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.28, p.573-82, 1988.

RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101 Suppl 1, p. 327–330, 2006.

SAMUDIO, M.; MONTENEGRO-JAMES, S.; CABRAL, M. et al. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, p.119–21, 1998.

SANSOM, F. M.; NEWTON, H. J.; CRIKIS, S. et al. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. **Cellular Microbiology**, v.9, p.1922-35, 2007.

SANTOS, R. F.; PÔSSA, M. A.; BASTOS, M. S. et al. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.3,p.e387, 2009.

SCHINGNITZ, U.; HARTMANN, K.; MACMANUS, C. F. et al. Signaling through the A2B adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury. **Journal of Immunology**, v.184, p.5271–5279, 2010.

SCHMUNIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, v.31, p.547–557, 1991.

SCHMUNIS, G. A.; ZICHER, F.; MONCAYO, A. Interruption of Chagas' disease transmission through vector elimination. **Lancet**, v.348, p.1171, 1996.

SCHNURR, M.; TOY, T.; SHIN, A. et al. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. **Blood**, v.105, p.1582-1589, 2005.

SCHNURR, M.; TOY, T.; STOITZNER, P. et al. ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling. **Blood**, v.102, p.613-620,2003.

SCHULTE, G.; FREDHOLM, B. B. The G(s)-coupled adenosine A(2B) receptor recruits divergent pathways to regulate ERK1/2 and p38. **Experimental Cell Research**, v.290, p.168-76, 2003.

SEREZANI, C. H.; BALLINGER, M. N.; ARONOFF, D. M. et al. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.39, p.127-32, 2008.

SHER, A.; GAZZINELLI, R. T.; JANKOVIC, D. et al. Cytokines as determinants of disease and disease interection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.85–87, 1998.

SILVA-GOMES, N. L.; ENNES-VIDAL, V.; CAROLO, J. C. Et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (TcNTPDase-1) gene expression is increased due to heat shock and in infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **Parasites & Vectors**, v.7, p.463, 2014.

SILVEIRA, A.C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, p.35-42, 2000.

SITKOVSKY, M. V.; OHTA, A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? **Trends in Immunology**, v.26, p.299-304, 2005.

SKAPER, S. D.; DEBETTO, P.; GIUSTI, P. P2X(7) Receptors in Neurological and Cardiovascular Disorders. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, v.2009, p.861324, 2009.

SMART, M. L.; GU, B.; PANCHAL, R. G. et al. Receptor cell surface expression and cytolitic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.8853–60, 2002.

SOLLE, M.; LABASI, J.; PERREGAUX, D. G. Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.125–132, 2001.

SOUZA V. C. G.; SCHLEMMER K. B.; NOAL C. B. et al. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. **Parasitology International**, v.61, p.690-696, 2012a.

SOUZA V.C.G; SCHLEMMER, K. B.; NOAL, C. B et al. Purinergic system ecto-enzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas disease. **Purinergic Signalling**, v.8, p.753-62, 2012b.

SOUZA, P. E.; ROCHA, M. O.; ROCHA-VIEIRA, E. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection of Immunity**, v.72, p.5283-5291, 2004.

SOUZA, P. E.; ROCHA, M. O.; MENEZES, C. A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces Differential Modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chaga's disease. **Infection and Immunity**, v.75, p. 1886-1894, 2007.

SPOONER, R.; YILMAZ, O. The role of reactive-oxygen-species in microbial persistence and inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p.334-352, 2011.

STAGG, J.; SMYTH, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. **Oncogene**, v.29, p.5346-58, 2010.

SURPRENANT, A.; RASSENDREN, F. A.; KAWASHIMA, E. ET al. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). **Science**, v.272, p.735–738, 1996.

SUZUKI, T.; HIDE, I.; IDO, K. et al Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. **The Journal of Neuroscience**, v.24, p.1–7, 2004.

TAFUTO, S.; I. SILVESTRI, I.; P. D'ANDREA, P. et al. Interleukin-6: biological features and clinical implications. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v.8, p.1–8, 1994.

TALVANI A.; COUTINHO, S, F.; BARCELOS, LDA. S. et al. Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins. **Parasitology Research**, v.104, p.1141-8, 2009.

TALVANI, A.; ROCHA, M. O.; BARCELOS, L. S. et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.943-50, 2004.

TAMAJUSUKU, A. S.; VILLODRE, E. S.; PAULUS, R. et al. Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. **Journal of Cellular Biochemistry**, 109, 983-991, 2010.

TAN, K. S.; NACKLEY, A.G.; SATTERFIELD, K. et al. β 2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF- κ B-independent mechanisms. **Cellular Signalling**, v.19, p.251–260, 2007.

TANOWITZ, H. B.; BURNS, E. R.; SINHA, A. K. et al. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, p.274-281, 1990.

TARLETON, R. L.; GRUSBY, M. J.; POSTAN, M. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **International Immunology**, v.8, p.13-22, 1996.

TARLETON, R.L.; REITHINGER, R.; URBINA, J.A. et al. The challenges of Chagas Disease – grim outlook or glimmer of hope? **PLoS Medicine**, v.4, p.e332, 2007.

TESMER, L. A.; LUNDY, S. K.; SARKAR, S. et al. Th17 cells in human disease. **Immunological Reviews**, v.223, p.87–113, 2008.

TRAUTMANN, A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a 'danger signal'. **Science Signaling**, v.2, p.e6, 2009.

VAN CALKER, D.; MLLER, M.; HAMPRECHT, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. **Journal of Neurochemistry**, v.33, n.5, p.999 – 1005, 1979.

VARANI, K.; LAGHI-PASINI, F.; CAMURRI, A. et al. Changes of peripheral A2A adenosine receptors in chronic heart failure and cardiac transplantation. **FASEB Journal**, v.17, p.280-282, 2003.

VARANI, K.; PADOVAN, M.; VINCENZI, F. et al. A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. **Arthritis Research & Therapy**, v.13, p.R197, 2011.

VERZIIL, D.; IJZERMAN, A. P. Functional selectivity of adenosine receptor Ligands. **Purinergic Signalling**, v.7, p.171-192, 2011.

VITELLI-AVELAR, D. M.; SATHLER-AVELAR, R.; DIAS, J. C. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺CD162CD56⁺ natural killer T cells and CD4⁺CD25^{High} regulatory T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.62, p.297–308, 2005.

VITIELLO, L.; GORINI, S.; ROSANO, G. et al. Immunoregulation through extracellular nucleotides. **Blood**, v.120, p.511-8, 2012.

WANG, L.; JACOBSEN, S. E.; BENGTSSON, A. et al. P2 receptor mRNA expression. profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34⁺ stem and progenitor cells. **BMC Immunology**, v.5, p.16, 2004.

WEN, A.Y.; SAKAMOTO, K.M.; MILLER, L.S. The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. **Journal of Immunology**, v.185, p.6413-6419, 2010.

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. **Trends in Pharmacology Sciences**, v.27, p.211-7, 2006.

WILKIN, F.; DUHANT, X.; BRUYNS, C. et al. The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.166, p.7172-7177, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of Chagas disease**, 2002. Technical Report Series, n.905, p.1–109, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis**, n. 975, 2012. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO_TRS_975_eng.pdf

Acesso em: 12 jan 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em: 04 mar 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Acessado em 13/jun2016).

YANG, R.; LIANG, B. T. Cardiac P2X(4) receptors: targets in ischemia and heart failure? **Circulation Research**, v.111, p.397-401, 2012.

YOSHIZAKI, K.; NAKAGAWA, T.; KAIEDA, T. et al. Induction of proliferation and Igs-production in human B leukemic cells by antiimmunoglobulins and T cell factors. **Journal of Immunology**, v.128, p.1296–301, 1982.

ZHANG, X. J.; ZHENG, G. G.; MA, X. T. et al. Effects of various inducers on the expression of P2X7 receptor in human peripheral blood mononuclear cells. **Sheng Li Xue Bao**, v.57, p.193-8, 2005.

7 APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título do projeto: “Avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com doença de Chagas”

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Instituição/Departamento: Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFSM

Telefone para contato: (55) 3220-9581 ou (55) 9153-3673

Local de coleta de dados: _____

Nome da paciente: _____ **Idade:** ____ anos

Responsável legal: _____

Objetivo do estudo/Riscos/Procedimentos/Benefícios/Sigilo:

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa e a responder um questionário, de forma voluntária, tendo o direito de desistir a qualquer momento.

Objetivo: a pesquisa avaliará a atividade de algumas substâncias que compõem o sangue de pacientes com doença de Chagas e de pessoas sem qualquer outra doença, para melhor entendermos sobre a doença de Chagas e assim obtermos informações capazes de futuramente auxiliar no controle e novos tratamentos, já que no momento não temos vacinas nem tratamentos específicos para esta doença.

Procedimento e riscos: a pesquisa consistirá na coleta de sangue podendo ocorrer o risco de um pequeno desconforto devido à picada da agulha, e do local da coleta ficar dolorido ou arroxeadado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde.

Benefícios: os resultados não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é importante e consiste apenas para ajudar em novos estudos sobre a evolução, controle e tratamento da doença de Chagas.

Confidencialidade: as informações fornecidas no questionário serão de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Em nenhum momento será revelado ou utilizado seu nome.

Acredito ter sido suficientemente informado (a) a respeito deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos deste estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, assim como a garantia de que minhas informações serão

preservadas. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Santa Maria, dede

Assinatura do sujeito de pesquisa/representante legal

N. identidade

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Santa Maria, de de

Assinatura do responsável pelo estudo

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com os pesquisadores:

Daniela Leal – (055) 3220-9581

Viviane Souza – (055) 9153-3673

APÊNDICE B –COLETA DE DADOS

Título do projeto: “Avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com doença de Chagas”

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal - UFSM

Instituição/Departamento: Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFSM

Telefone para contato: (55) 3220- 9581

Identificação número: _____

Data da coleta : _____

Responsável pela coleta: _____

1. Grupo em que pertence o paciente:

Avaliação cardiológica: sim não

Avaliação gástrica: sim não

com doença de chagas recém diagnosticado

com doença de chagas em fase aguda

com doença de chagas em fase intermediária

com doença de chagas em fase crônica - digestiva

com doença de chagas em fase crônica - cardíaca

sem a doença de chagas

2. Paciente com a Doença de Chagas está em tratamento? Com qual medicamento (s)?

não sim _____

3. Paciente possui algum vício (fumo, drogas ou alcoolismo)? sim não

4. Paciente é obeso? sim não

5. Paciente alco

6. Paciente está sob uso de algum medicamento nos últimos dias?

não sim Qual? _____

7. Possui umas das seguintes doenças? Qual?

Hipertensão Doença cardíaca Diabetes Doença auto-imune (Lúpus, p. exemplo)

Câncer Artrite reumatóide Outra infecto-parasitária _____

8. Onde mora? (cidade, estado, etc) _____

9. Possui familiares com a Doença de Chagas?

10. Como e há quanto tempo descobriu estar infectado?

10. Já fez transfusão sanguínea? sim não

Observações: _____

Outras informações relevantes: _____



8 ANEXOS

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO PARA USO DE IMAGENS

Figura 1	<p>Dear Dr. Viviane Souza, Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. Elsevier has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful. Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below: http://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=ebfd049e-0b24-4767-856a-e3569134d863 Order Details Licensee: Viviane Souza License Date: Sep 8, 2016 License Number: 3944360415379 Publication: The Lancet Title: Chagas disease Type Of Use: reuse in a thesis/dissertation Total: 0.00 USD</p>
Figura 2	<p>Dear Dr. Viviane Souza, Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. John Wiley and Sons has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful. Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below: http://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=e4b1fc02-a1c4-4ff7-9a4c-382450c291b3 Order Details Licensee: Viviane Souza License Date: Sep 8, 2016 License Number: 3944400515822 Publication: Parasite Immunology Title: Immunoregulatory networks in human Chagas disease Type Of Use: Dissertation/Thesis Total: 0.00 USD</p>
Figure 4	<p>Dear Dr. Viviane Souza, Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. Nature Publishing Group has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful. Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below: http://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=26a8122f-a118-4f4e-8ca6-6d0322ac2dda Order Details Licensee: Viviane Souza License Date: Sep 8, 2016 License Number: 3944370192011 Publication: Nature Reviews Immunology Title: Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling Type Of Use: reuse in a dissertation / thesis Total: 0.00 USD</p>
Figure 5	<p>Dear Dr. Viviane Souza, Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. Elsevier has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful. Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below:</p>

	<p>http://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=0c1b57cc-2eb6-49c1-b8c0-2d397a5e89c8</p> <p>Order Details Licensee: Viviane Souza License Date: Sep 8, 2016 License Number: 3944380036387 Publication: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes Title: The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling Type Of Use: reuse in a thesis/dissertation Total: 0.00 USD</p>
Figure 9	<p>Dear Dr. Viviane Souza, Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. Wolters Kluwer Health, Inc. has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful. Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below: http://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=417fadd4-c2c6-488c-98de-a619c232a32b</p> <p>Order Details Licensee: Viviane Souza License Date: Sep 8, 2016 License Number: 3944390999780 Publication: Circulation Research Title: Cardiac P2X4 Receptors: Targets in Ischemia and Heart Failure? Type Of Use: Dissertation/Thesis Total: 0.00 USD</p>
Figure 10	<p>Dear Dr. Viviane Souza, Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. Springer has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful. Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below: http://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=4d747912-6239-427e-b37f-424878f2df91</p> <p>Order Details Licensee: Viviane Souza License Date: Sep 8, 2016 License Number: 3944391246215 Publication: Cellular and Molecular Life Sciences Title: Purine and pyrimidine receptors Type Of Use: Thesis/Dissertation Total: 0.00 USD</p>

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com Doença de Chagas.

Número do processo: 23081.008343/2009-10

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0130.0.243.000-09

Pesquisador Responsável: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Setembro/2010- Relatório parcial
Agosto/2011- Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 01/09/2009

Santa Maria, 01 de setembro de 2009.



Edson Nunes de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.

Sua solicitação de **EMENDA**, adição de metodologia e extensão de cronograma, obteve parecer favorável em 18/11/2009.

Sua solicitação de **EMENDA**, adição de metodologia e extensão de cronograma, foi avaliado e obteve parecer favorável em 06/09/2012.

ANEXO C – CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO I

----- Forwarded message -----

From: Microbial Pathogenesis <EvisSupport@elsevier.com>
Date: 2016-04-08 21:17 GMT-03:00
Subject: Submission YMPAT_2016_194 received by Microbial Pathogenesis
To: dbitencourtrosaleal@gmail.com

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: YMPAT_2016_194

Title: EVALUATION OF P2X7 RECEPTOR' EXPRESSION IN PERIPHERAL LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF CHAGAS DISEASE

Journal: Microbial Pathogenesis

Dear Dr. Leal,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Microbial Pathogenesis. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=YMPAT and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Microbial Pathogenesis

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our Customer Support site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | Privacy Policy

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

ANEXO D – CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO II

----- Forwarded message -----

From: **Human Immunology** <ehi@ashi-hla.org>
 Date: 2016-08-10 23:01 GMT-03:00
 Subject: Thank you for your submission to Human Immunology
 To: dbitencourtrosaleal@gmail.com

Dear Dr. Leal,

Thank you for sending your manuscript P2Y11R AND A2AR mRNA EXPRESSION PROFILE IN LYMPHOCYTES FROM INDETERMINATE FORM OF CHAGAS DISEASE PATIENTS for consideration to Human Immunology. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

For Human Immunology, the average editorial time (in weeks) from submission to first decision is: 12.47 and from submission to final decision is: 23.24.

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Human Immunology, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/HIM>