

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estudo das metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores nas
formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de
Chagas

por

Rafaelle Christine Gomes Fares Gusmão

Belo Horizonte
Abril de 2013

TESE DBCM-CPqRR R.C.G.F. GUSMÃO 2013

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estudo das metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores nas
formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de
Chagas

por

Rafaelle Christine Gomes Fares Gusmão

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título de
Doutor em Ciências na área de concentração de
Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dr. Rodrigo Correa Oliveira

Co-orientação: Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Belo Horizonte
Abril de 2013

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

G982e Gusmão, Rafaelle Christine Gomes Fares.
2013

Estudo da metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores nas formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas / Rafaelle Christine Gomes Fares Gusmão. – Belo Horizonte, 2013.

XXII, 143 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: 150 - 165

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Doença de Chagas/patologia 2. *Trypanosoma cruzi*/patogenicidade 3. Cardiomiopatia chagásica/patologia
I. Título. II. Corrêa-Oliveira, Rodrigo (Orientação). III. Estanislau, Juliana de Assis Silva Gomes

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Estudo das metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores nas formas
clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas**

por

Rafaelle Christine Gomes Fares Gusmão

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (Presidente)

Prof. Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

Prof. Dra. Adriana Bozzi de Melo

Prof. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima

Prof. Dr. André Talvani

Suplente: Prof. Dra. Liz Ribeiro do Valle Antonelli

Tese defendida e aprovada em: 30/04/2013.

COLABORADORES

Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ – Rio de Janeiro

Dra. Luciana Ribeiro Garzoni

Dra. Mariana Caldas Waghabi

Instituto de Pesquisa Evandro Chagas / FIOCRUZ – Rio de Janeiro

Dr. Roberto Magalhães Saraiva

Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Manoel Otávio Costa Rocha

Giovane Rodrigo Sousa

Departamento de Morfologia – Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Walderez Ornelas Dutra

Dra. Jeane Correa

Ms. Karine Silvestre Ferreira

Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ – Minas Gerais

Nayara Ingrid de Medeiros

Dra. Roberta Oliveira Prado

SUPORTE FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – nº 478846/2009-6).

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

Dedico este trabalho ao meu esposo, meu maior incentivador, aos meus pais e aos meus irmãos por aliviarem o peso dessa árdua caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu refúgio e fortaleza, socorro bem presente. Ele é poderoso para fazer infinitamente mais e hoje ele me proporciona viver infinitamente mais do que um dia sonhei, pensei e pedi. Ele me sustentou nos momentos mais difíceis e trouxe alegria e esperança ao meu coração. Cheguei até aqui, porque Ele é comigo!

Ao Dr. Rodrigo pela orientação e amizade, por acreditar no meu potencial e investir na minha carreira científica. Obrigada pelo exemplo profissional, pelo incentivo e ensinamentos que contribuíram para a minha formação científica.

À Dra Juliana, minha co-orientadora e amiga, pela oportunidade de aprender ciência ao seu lado e por investir em mim desde a minha iniciação científica. Poucas palavras não poderiam expressar minha gratidão por todo o seu encorajamento e confiança. Obrigada por todos os ensinamentos que me tornaram uma pessoa mais madura.

Ao Dr. Manoel Otávio pelos valiosos ensinamentos que muito contribuíram para o meu crescimento científico. Obrigada por acreditar em mim e por me proporcionar a oportunidade de conviver com os pacientes portadores da doença de Chagas. Obrigada pela disponibilidade na obtenção do sangue dos pacientes utilizados neste estudo.

Aos doadores de sangue, por confiarem no potencial desse trabalho e por aceitarem participar da nossa pesquisa. A participação de cada um foi essencial para a execução desse trabalho e a convivência com todos me trouxe ricos conhecimentos práticos sobre a doença de Chagas.

À Clari por toda a alegria e por sempre estar disposta a me ajudar. À Luciana pela amizade, alegria e todo o auxílio, principalmente durante a fase experimental desse trabalho. À Tiza e à Simone pelo auxílio e paciência na parte de Citometria de Fluxo.

À estudante de iniciação científica Nayara pelo auxílio e companhia durante a realização dos experimentos, mas principalmente pela amizade. Foi um imenso prazer poder acompanhá-la no início da sua bela carreira científica. Nossa convivência me trouxe grande aprendizado.

À minha amiga Roberta pela ajuda em tantos momentos. Nossa amizade foi fundamental

durante essa etapa. Obrigada por sua alegria e dedicação.

Às minhas grandes amigas Fernanda, Jack, Ana Thereza e Anna Carolina por sempre torcerem por mim.

À todos os funcionários e estudantes do Laboratório de Imunologia pela convivência e aprendizagem.

Aos amigos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares/UFMG por me receberem com tanto carinho, pelo agradável convívio e auxílio em todos os momentos.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou e à Universidade Federal de Minas Gerais pela infraestrutura técnica.

Ao meu querido esposo, Wesley, por todo o companheirismo, pela compreensão em todos os momentos e por todo amor e carinho. Obrigada por me incentivar e me ajudar a realizar meus sonhos.

Aos meus pais por sempre investirem na minha carreira profissional e por sempre me apoiarem. Obrigada pelos ensinamentos que levarei sempre comigo. Aos meus irmãos que me trazem tanta alegria e carinho.

Aos meus sogros que me incentivaram e torceram por mim. Obrigada pelo exemplo de estudo e dedicação.

À toda a minha família e aos amigos de longos anos que sempre torceram pelo meu sucesso.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse trilhar esses caminhos.

SUMÁRIO

Lista de figuras	XIV
Lista de tabelas	XVII
Lista de abreviaturas	XVIII
Resumo	XXI
Abstract	XXII
1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. REVISÃO DA LITERATURA	27
4. POPULAÇÃO DE ESTUDO, MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 População estudada	39
3.2 Amostras de sangue	40
3.3 Preparo dos Antígenos derivados da Forma Tripomastigota (TRIPO) do <i>T. cruzi</i>	41
3.4 Detecção das MMPs 2 e 9 e dos TIMPs 1 e 2 em amostras de soro por Milliplex	42
3.5 Detecção das MMPs 2 e 9 e dos TIMPs 1 e 2 em amostras de soro por Zimografia	43
3.6 Avaliação do padrão de citocinas (TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-1 β) em amostras de soro	44
3.7 Análise dos níveis intracitoplasmáticos das metaloproteinases em leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas por reações de imunofluorescência através da citometria de fluxo	47
3.7.1 Avaliação <i>ex vivo</i> dos níveis intracitoplasmáticos das MMPs	47

3.7.2 Análises dos níveis intracitoplasmáticos das MMPs após estimulação <i>in vitro</i>	47
3.8 Extração de DNA de amostras do sangue periférico	49
3.9 Detecção de polimorfismo de nucleotídeo único em genes codificadores de membros da família das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e de seu inibidor (TIMP-1)	50
3.10 Preparo de microtecidos cardíacos – Cultura primária tridimensional de cardiomiócitos	51
3.11 Tratamento do microtecido cardíaco com soro de indivíduos não infectados e de pacientes com doença de Chagas	53
3.12 Western Blot para detecção de proteínas de matriz extracelular	53
3.13 Análise estatística	55
4. RESULTADOS	56
4.1 Avaliação das metaloproteinases 2 e 9 e dos inibidores teciduais de metaloproteinases 1 e 2 em amostras de soro de indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas	57
4.1.1 Avaliação dos níveis séricos das MMPs 2 e 9 determinados por Milliplex	57
4.1.2 Avaliação dos níveis séricos das MMPs 2 e 9 determinados por zimografia	61
4.2 Correlação entre os níveis de citocinas e os níveis séricos e atividade enzimática das metaloproteinases 2 e 9	62
4.3 Avaliação da expressão de metaloproteinases 2 e 9 por células do sistema imune (linfócitos e monócitos) do sangue periférico de indivíduos não-infectados e de pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas, antes e após estímulo por antígenos do <i>T. cruzi</i>	67
4.3.1 Avaliação dos níveis intracitoplasmáticos de MMP-2	67
4.3.2 Avaliação dos níveis intracitoplasmáticos de MMP-9	70

4.3.3 Avaliação da principal fonte celular das MMPs 2 e 9, a partir de leucócitos mononucleares	72
4.4 Avaliação do efeito <i>in vitro</i> do soro de indivíduos não infectados e de pacientes portadores de diferentes graus de acometimento cardíaco da doença de Chagas sobre a expressão de proteínas de matriz do microtecido cardíaco, utilizando cultura tridimensional de cardiomiócitos	74
4.5 Avaliação da ocorrência de polimorfismo de nucleotídeo único em genes codificadores de membros da família das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e de seu inibidor (TIMP-1)	80
4.5.1 Avaliação do perfil genotípico e alélico	81
4.5.1.1 Polimorfismo G/A na posição -1575 do gene MMP-2	81
4.5.1.2 Polimorfismo C/T na posição -1306 do gene MMP-2	82
4.5.1.3 Polimorfismo C/T na posição -735 do gene MMP-2	83
4.5.1.4 Polimorfismo C/T na posição -1562 do gene MMP-9	84
4.5.1.5 Polimorfismo C/T na posição +372 do gene TIMP-1	85
4.5.2- Análise entre os níveis séricos de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 e a distribuição dos genótipos e alelos dos respectivos genes	87
4.5.2.1-Análise dos níveis séricos da MMP-2 de indivíduos NI e portadores da doença de Chagas de acordo com as frequências genotípicas referentes aos polimorfismos -1575 G/A; -1306 C/T e -735 C/T	87
4.5.2.2-Análise dos níveis séricos da MMP-9 de indivíduos NI e portadores da doença de Chagas de acordo com as frequências genotípicas referentes ao polimorfismo -1562 C/T	90
4.5.2.3-Análise dos níveis séricos da TIMP-1 de indivíduos NI e portadores da doença de Chagas de acordo com as frequências genotípicas referentes ao polimorfismo +372 C/T	91
4.5.3- Análise entre os níveis séricos de MMP-2 e TIMP-1 e a presença ou ausência do alelo polimórfico	92

4.5.3.1-Análise dos níveis séricos da MMP-2 de indivíduos NI e portadores da doença de Chagas de acordo com a presença ou ausência dos alelos polimórficos referentes aos polimorfismos -1575 G/A; -1306 C/T e -735 C/T	93
4.5.3.2-Análise dos níveis séricos de TIMP-1 de indivíduos NI e portadores da doença de Chagas de acordo com a presença ou ausência dos alelos polimórficos referentes aos polimorfismos +372 C/T	95
5. DISCUSSÃO	97
6. CONCLUSÃO	112
7. ANEXOS	114
Anexo I – Artigo aceito para publicação	115
Anexo II – Carta do aceite do artigo	142
Anexo III – Artigos publicados em colaboração	145
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das MMP-9 e MMP-2	32
Figura 2. Esquema da estratégia de trabalho	41
Figura 3. Representação da metodologia utilizando o sistema Luminex	43
Figura 4. Gel de zimografia	44
Figura 5 Análise de citocinas e quimiocinas por citometria de fluxo	46
Figura 6. Esferóide de cardiomiócitos	52
Figura 7. Agregados de esferóides de cardiomiócitos	53
Figura 8. Imagem do resultado de western blot após revelação em filme de raio-X	54
Figura 9. Análise dos níveis séricos das MMPs 2 e 9 dosados por Milliplex	58
Figura 10. Análise dos níveis séricos dos TIMPs 1 e 2	59
Figura 11. Correlação entre os níveis séricos das MMPs 2 e 9 e os níveis séricos dos TIMPs 1 e 2, dosados por Milliplex.	60
Figura 12. Análise da atividade enzimática das MMPs 2 e 9 em amostras de soro	61
Figura 13. Correlação entre os níveis séricos das citocinas e das MMPs 2 e 9, dosados por Milliplex, de indivíduos não infectados e de pacientes portadores da doença de Chagas	63
Figura 14. Correlação entre os níveis séricos das citocinas e das MMPs 2 e 9, dosados por zimografia, de indivíduos não infectados e de pacientes portadores da doença de Chagas	65
Figura 15. Esquema representativo dos principais resultados obtidos a partir da análise de correlação entre os níveis séricos das citocinas e as MMPs 2 e 9	66

Figura 16. Análise da expressão da metaloproteinase-2 por linfócitos e monócitos	69
Figura 17. Análise da expressão da metaloproteinase-9 por linfócitos e monócitos	71
Figura 18. Avaliação da produção de MMP-2 e MMP-9 por células mononucleares do sangue periférico e suas subpopulações	73
Figura 19. Análise da contração de esferóides estimulados com soro	75
Figura 20. Análise da expressão de proteínas de matriz em microtecido cardíaco	76
Figura 21. Correlação entre a expressão de MMP-2 e -9 e a expressão de laminina e fibronectina	78
Figura 22. Esquema representativo dos principais resultados obtidos a partir da análise de correlação entre a expressão de proteínas de matriz e as MMPs 2 e 9	79
Figura 23. Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com as frequências genótípicas referentes ao polimorfismo -1575 A/G	88
Figura 24. Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com as frequências genótípicas referentes ao polimorfismo -1306 C/T	89
Figura 25. Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com as frequências genótípicas referentes ao polimorfismo -735 C/T	90
Figura 26. Análise dos níveis séricos da MMP-9 de acordo com as frequências genótípicas referentes ao polimorfismo -1562 C/T	91
Figura 27. Análise dos níveis séricos da TIMP-1 de acordo com as frequências genótípicas referentes ao polimorfismo +372 C/T	92
Figura 28. Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com a presença (GA+AA) ou ausência (GG) do alelo polimórfico -1575 A	93
Figura 29. Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com a presença (CT+TT) ou ausência (CC) do alelo polimórfico -1306 T	94

Figura 30. Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com a presença (CT+TT) ou ausência (CC) do alelo polimórfico -735 T	94
Figura 31. Análise dos níveis séricos da TIMP-1 de acordo com a presença (CT+TT) ou ausência (CC) do alelo polimórfico +732 T	95
Figura 32. Esquema representativo dos principais resultados encontrados	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das MMPs	33
Tabela 2. Identificação dos polimorfismos estudados	50
Tabela 3. Condições da PCR utilizada para a identificação de polimorfismos	51
Tabela 4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos estudados	81
Tabela 5. Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo G/A na posição -1575 do gene MMP-2	82
Tabela 6. Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição -1306 do gene MMP-2	83
Tabela 7. Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição -735 do gene MMP-2	84
Tabela 8. Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição -1562 do gene MMP-9	85
Tabela 9. Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição +372 do gene TIMP-1 de pacientes do sexo feminino	86
Tabela 10. Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição +372 do gene TIMP-1 de pacientes do sexo masculino	86
Tabela 11. Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição +372 do gene TIMP-1 em pacientes dos gêneros feminino e masculino	87
Tabela 12. Resumo dos resultados da avaliação da ocorrência de polimorfismos em genes da MMP-2, MMP-9 e do TIMP-1	96

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC** – Alofococianina
- BSA** – Albumina sérica bovina
- CARD** – Indivíduos portadores da forma clínica cardíaca
- CBA** – Cytometric Bead Array
- CCL** – Quimiocina [Chemokine (C-C motif) ligand]
- CD** – Grupos de diferenciação (Cluster of differentiation)
- CD4** – Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
- CD8** – Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
- CD41** – Marcador de superfície celular da subpopulação de monócitos
- CDG** – Indivíduos portadores da forma clínica cardiodigestiva
- CO₂** – Gás carbônico ou Dióxido de carbono
- CTR-DIP** – Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
- CX43** – Conexina 43
- CXCL** – Quimiocina [Chemokine (C-X-C motif) ligand]
- DAPI** - 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
- DIG** – Indivíduos portadores da forma clínica digestiva
- ECG** – Eletrocardiograma
- EDTA** – Etilenodiaminotetracético
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- EUA** – Estados Unidos da América
- FITC** – Isotiocianato de fluoresceína
- FL** – Fluorescência
- FSC** – Forward Scatter/ Tamanho celular
- HAS** – Hipertensão arterial sistêmica
- IFN- γ** - Interferon gamma
- Ig** – Imunoglobulina
- Ig CTL** – Controle de Isotipo
- IL**- Interleucina

IND – Indivíduos portadores da forma clínica indeterminada

LT – Linfócito T

MEC – Matriz Extracelular

MFF – Solução fixadora

MFI – Intensidade Média de Fluorescência

MMPs - Metaloproteinases

NI – Indivíduos não infectados

NO – Óxido nítrico

OD – Densidade Ótica (Optical Density)

OR – Risco relativo (Odds Ratio)

PBS – Tampão Fosfato Salínico

PBS-P – PBS-W a 0,5% de saponina

PBS-W – PBS a 0,5% de albumina sérica bovina

PE – Ficoeritrina

PerCP – Proteína Clorofila Piridinina

ROS – Radicais Livres

RPMI – Meio de cultura (Rosweel Park Memorial Institute)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

SA - Estreptavidina

SDS – Duodecil Sulfato de Sódio

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SPSS – Software Statistical Package for Social Sciences

SSC – Side Scatter/ Granulosidade e complexidade interna de uma célula

TA – Temperatura Ambiente

TGF- β – Fator de Crescimento Tumoral Beta

Th1 – Células T CD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2 – Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas

TIMPs – Inibidores teciduais de metaloproteinases

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

Treg – Células T reguladoras

TRIPO – Formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UTR – Região Flanqueadora de porções gênicas codificadoras

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

Zn – Zinco

3D - Tridimensional

RESUMO

A cardiomiopatia dilatada crônica decorrente da infecção pelo *T. cruzi* está associada com o remodelamento do miocárdio e com a fibrose intersticial, o que resulta em mudanças significativas da matriz extracelular (MEC). O remodelamento da MEC é regulado por enzimas proteolíticas como as metaloproteinases de matriz (MMPs). Nesse estudo, avaliamos pela primeira vez o envolvimento das MMPs 2 e 9 e seus inibidores (TIMPs) em pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND) e cardíaca (CARD) da doença de Chagas. Nossos resultados mostraram que os níveis séricos da MMP-9 estão associados com a gravidade do acometimento cardíaco e que a MMP-9 possui maior potencial de atividade proteolítica no soro de pacientes CARD. Os níveis séricos de TIMP-1 não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Por outro lado, os níveis séricos de TIMP-2 foram maiores no grupo CARD. A partir da análise de correlação, foi possível observar uma possível especificidade do TIMP-1 pela MMP-9. A análise da produção de MMPs por linfócitos T e monócitos mostrou que essas células do sistema imune são capazes de produzir MMP-2 e MMP-9 e, ainda que linfócitos T CD8⁺ são as principais células mononucleares produtoras de MMP-2 e MMP-9. A partir da cultura tridimensional de cardiomiócitos de camundongos, observamos que existem componentes no soro dos pacientes com doença de Chagas capazes de induzir a expressão de componentes da matriz extracelular no microtecido cardíaco. Além disso, MMP-2 apresentou correlação negativa com proteínas de matriz (laminina e fibronectina) e com citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), enquanto que a MMP-9 apresentou correlação positiva com proteínas de matriz (laminina e fibronectina) e com a citocina inflamatória IL-1 β . A partir da análise da ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único, não foi possível observar influência da genética do hospedeiro sobre os níveis séricos das MMPs 2 e 9 e seus inibidores, bem como sobre a morbidade da doença de Chagas. Nossos resultados sugerem que MMP-2 e MMP-9 participam de maneira diferente na patogênese da doença de Chagas, sendo que a MMP-9 parece estar mais envolvida no processo inflamatório e no remodelamento cardíaco. Em resumo, nossos resultados mostram, pela primeira vez, o envolvimento da MMP-9, mas não da MMP-2, na cardiomiopatia chagásica. Esses dados são inovadores e representam um avanço no conhecimento dos mecanismos envolvidos no estabelecimento e manutenção da patologia do acometimento cardíaco na doença de Chagas.

ABSTRACT

Dilated chronic cardiomyopathy (DCC) in Chagas disease is associated with myocardial remodeling and interstitial fibrosis, resulting in significant extracellular matrix (ECM) modifications. ECM remodeling is regulated by proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs). In this study, we evaluated, for the first time, the serum MMPs 2 and 9 levels, as well as their main cell sources in the peripheral blood from patients presenting the indeterminate (IND) or cardiac (CARD) clinical forms of Chagas disease. Our results showed that MMP-9 serum levels are associated with the severity of Chagas disease. The serum levels of TIMP-1 were not different between the studied groups; however the serum levels of TIMP-2 were higher in CARD group. The correlation analysis showed a possible specificity of TIMP-1 for MMP-9. The analysis of MMPs production by T lymphocytes showed that CD8⁺ T cells are the main source of both MMP-2 and MMP-9 molecules. Using a new 3-dimensional model of fibrosis we also observed that serum from patients with Chagas disease induced an increase in the extracellular matrix components in cardiac spheroids obtained from mice cardiomyocytes. Furthermore, MMP-2 and MMP-9 have showed different profile of correlation with matrix proteins (laminin and fibronectin) and inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) in patients with Chagas disease. Our results suggest that MMP-2 and MMP-9 show distinct activities in Chagas disease pathogenesis. While MMP-9 seems to be involved with the inflammation and cardiac remodeling of Chagas disease, MMP-2 does not show any correlation with inflammatory molecules. There are many factors involved in the determination of the severity and progression of Chagas disease, and host genetics is certainly a contributing factor for the development of the disease. Therefore, we evaluated whether there were significant polymorphisms in MMPs and TIMPs genes. Our results did not show any association between polymorphisms occurrence and morbidity of the disease. In conclusion, our data stress the involvement of MMP-9, and not of MMP-2, in heart disease and, for the first time, its participation in chagasic cardiomyopathy. These data are innovative and represent an advance in the knowledge of the mechanisms involved in the establishment/maintenance of the Chagas heart disease pathology.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, enfermidade negligenciada causada pelo *Trypanosoma cruzi*, continua sendo um sério problema para a saúde pública, afetando cerca de 10 milhões de pessoas na América Latina (WHO, 2012). Durante a fase crônica, muitos pacientes permanecem assintomáticos caracterizando a forma clínica indeterminada, que pode durar toda a vida do paciente. Entretanto, 20 a 30% dos pacientes desenvolvem a forma cardíaca da doença.

A manifestação cardíaca da doença de Chagas é caracterizada por intensa resposta inflamatória com destruição de fibras cardíacas no foco inflamatório e comprometimento dos plexos nervosos, levando ao aparecimento de fibrose no miocárdio com consequente insuficiência cardíaca (Andrade, 2000; Rocha et al., 2007; Nunes et al., 2012). Além disso, a cardiomiopatia chagásica leva a depressão da contratilidade miocárdica e a dilatação do ventrículo esquerdo que tem sido associada ao remodelamento cardíaco e à fibrose intersticial (Timonen et al., 2008). O processo de remodelamento cardíaco é regulado por enzimas proteolíticas, como, por exemplo, as metaloproteinases de matriz (MMPs).

Dentre as diferentes MMPs, MMP-2 e MMP-9 destacam-se por seu envolvimento em doenças cardíacas. Muitas evidências demonstram que as MMP-2 e MMP-9 estão presentes no miocárdio e são capazes de degradar todos componentes da matriz do coração (Polyakova et al., 2010). Uma maior atividade dessas MMPs pode resultar em degradação das fibras de colágeno, remodelamento da matriz extracelular com consequente dilatação ventricular progressiva (Li et al., 2000; Vanhoutte et al., 2006; Polyakova et al., 2010).

Vários estudos buscam compreender os mecanismos envolvidos no controle e/ou desenvolvimento das formas graves da doença de Chagas objetivando identificar marcador(es) de prognóstico de evolução da morbidade. Nesse contexto, o estudo das metaloproteinases nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas é de grande importância para um melhor entendimento da patogênese da cardiomiopatia chagásica.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar o envolvimento das metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores (TIMPs 1, 2 e 4) nas formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a presença e o potencial de atividade proteolítica de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), de TIMPs (TIMP-1 e TIMP-2), em amostras de soro de indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas;
- Avaliar os níveis séricos de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) em amostras de indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas
- Avaliar os níveis intracitoplasmáticos das metaloproteinases 2 e 9 em leucócitos do sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas, antes e após estímulo com antígenos do *T. cruzi*;
- Avaliar o efeito *in vitro* do soro de indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas sobre a expressão de proteínas de matriz do microtecido cardíaco, utilizando um modelo tridimensional de cultura de cardiomiócitos de camundongos;
- Avaliar a correlação entre as variáveis estudadas e as diferentes formas clínicas da doença de Chagas;
- Avaliar a ocorrência de polimorfismo de nucleotídeo único em genes codificadores de membros da família das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e de seu inibidor (TIMP-1) a partir de amostras do sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas;
- Avaliar a associação entre os polimorfismos e os níveis séricos das metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores com as formas clínicas da doença de Chagas.

REVISÃO DA LITERATURA

A doença de Chagas foi primeiramente descrita em 1909 por Carlos Chagas, que reportou seus elementos clínicos, anatomopatológicos, epidemiológicos, bem como seu agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, transmitido por inseto da ordem Hemiptera (Chagas, 1909). Após um século de sua descoberta, a doença de Chagas continua a ser um sério problema de saúde e econômico em muitos países da América Latina. Estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* nas Américas, principalmente, na América Latina, e mais de 25 milhões estejam em risco de infecção (WHO, 2012). Além disso, devido o crescimento da migração populacional, um maior número de casos de doença de Chagas, importados da América Latina, tem sido detectado em áreas não endêmicas, tais como América do Norte e muitas partes da Europa, Ásia e Oceania, tornando a doença um problema global (Schmunis & Yadon, 2010).

A principal forma de transmissão da doença ao homem é a vetorial, considerada, ainda hoje, responsável por mais de 70% dos casos em países onde não existe controle vetorial sistemático (Coura & Dias, 2009). Ela ocorre pelo contato do hospedeiro vertebrado com as fezes e/ou urina do inseto vetor, contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* (Barreto, 1979). A infecção dos insetos ocorre durante a sucção do sangue do hospedeiro vertebrado infectado, quando as formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas e, uma vez no intestino do inseto, passam por alterações morfológicas e fisiológicas transformando-se em formas epimastigotas e, posteriormente, em tripomastigotas metacíclicas. Os tripomastigotas metacíclicos são expelidos com as fezes e/ou urina do inseto vetor no local da picada, após o repasto sanguíneo, e penetram no hospedeiro através da pele lesada ou da mucosa. As formas tripomastigotas se desenvolvem no interior de diferentes tipos de células do hospedeiro vertebrado, onde se transformam em formas amastigotas que se multiplicam por sucessivas divisões binárias, evoluindo, posteriormente, para as formas tripomastigotas. As células infectadas rompem-se e os parasitos livres invadem células próximas ou alcançam a corrente sanguínea disseminando a infecção para os diferentes órgãos e sistemas (Dias, 2000).

Outras formas de transmissão também já foram descritas, como oral (pela ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*), transfusional, congênita, por transplante de órgãos ou acidentes laboratoriais (Bittencourt, 1976; Brener, 1987; Schmunis, 1991; Dias, 2000; Brasil, 2005, Barbosa et al., 2012). No Brasil, desde a década de 1970, diretrizes de combate à doença foram desenvolvidas no sentido de interromper, com a maior agilidade possível, a

transmissão da doença. A utilização de inseticidas eficientes, a melhoria das habitações rurais, com adequada higiene e limpeza, além de medidas preventivas para controlar a transmissão por meio das transfusões de sangue e derivados foram métodos utilizados com sucesso no controle da transmissão (Silveira & Dias, 2011). Os esforços se concentram atualmente no sentido de manter os resultados obtidos, consolidar o controle de focos residuais, impedir o estabelecimento de novos focos de transmissão vetorial e, principalmente, controlar a transmissão oral (Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2005).

A doença de Chagas possui duas fases sucessivas: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por elevada parasitemia, que é facilmente detectada em exames de sangue a fresco. Após um período de incubação de uma ou duas semanas, alguns indivíduos podem desenvolver sinais e sintomas graves, tais como febre, calafrios, náusea e vômito, diarreia, erupção cutânea e irritação da meninge. Podem apresentar ainda, lesão inflamatória no local da entrada do parasito (chagoma), edema periorbital unilateral (sinal de Romana), conjuntivite, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Porém, em alguns pacientes, a fase aguda passa despercebida e o paciente queixa-se apenas de febre e mal-estar (Coura, 2007; Moncayo & Silveira, 2009). Anormalidades laboratoriais não são específicas e podem incluir anemia, trombocitopenia e elevação das enzimas hepáticas e cardíacas (Tanowitz et al., 2009).

Em muitos pacientes, com o desenvolvimento da resposta imune específica tanto celular quanto humoral, a parasitemia diminui e os sinais e sintomas são resolvidos completamente em cerca de 2 a 4 meses, ocorrendo a recuperação de um estado aparentemente saudável (Moncayo & Silveira, 2009; Tanowitz et al., 2009). Esses indivíduos entram, então, na fase crônica da doença de Chagas que perdura por toda a vida do indivíduo infectado.

Do ponto de vista clínico, as manifestações desenvolvidas durante a fase crônica permitem a classificação dos pacientes em diferentes formas clínicas: indeterminada (IND), cardíaca (CARD), digestiva (DIG) ou cardiodigestiva (CDG). A forma clínica IND é observada na maioria dos pacientes infectados (50-60%). Esses pacientes apresentam testes sorológicos e/ou parasitológicos positivos para o *T. cruzi* e exames clínicos como eletrocardiográficos e radiológicos (silhueta cardíaca, esôfago e cólon) normais (Dias, 1989; Macedo, 1997; Moncayo & Silveira, 2009; Tanowitz et al., 2009). No entanto, exames adicionais e mais sofisticados podem demonstrar nesses pacientes algumas alterações e anormalidades, geralmente discretas, que podem significar tanto um processo evolutivo em marcha quanto apenas resquícios de processo agudo ou crônico inicial já cicatrizado e sem progressão clínica ou anatômica (Rocha et al., 2003).

Os pacientes portadores da forma clínica IND podem permanecer sem manifestações clínicas graves atribuídas à persistência do parasito. Entretanto, cerca de 2 a 5% desses indivíduos irão desenvolver a forma CARD a cada ano, enquanto uma menor porcentagem irá apresentar a forma DIG (Macedo, 1980; Dias, 1989). A forma clínica DIG apresenta prevalência de 6-9% em indivíduos acometidos pela doença de Chagas e tem como principais manifestações clínicas as dilatações do cólon e esôfago, podendo desenvolver formas graves como o megacólon e megaesôfago, respectivamente. A denominação de forma clínica DIG foi inicialmente proposta por Rezende (1959) para os casos de pacientes que apresentavam a doença de Chagas, sem a presença de alterações cardíacas, mas com megacólon e/ou megaesôfago bem caracterizados (Dias, 1989). As manifestações da forma clínica DIG são atribuídas à destruição de nervos do plexo mientérico que levaria a perda da coordenação motora, retenção de conteúdo semi-sólido, hipertrofia muscular e dilatação (Koeberle & Nador, 1955). Estudos mostram que alguns pacientes podem apresentar comprometimento simultâneo do trato gastrointestinal e do tecido cardíaco, caracterizando a forma clínica CDG (Dias, 1989).

A alteração cardíaca é a manifestação clínica mais frequente da fase crônica da doença, afetando 20-40% de indivíduos, variando de alguns anos a décadas após a infecção inicial (Rassi Jr et al., 2000; Moncayo & Silveira, 2009; Tanowitz et al., 2009). A cardiomiopatia chagásica crônica caracteriza-se por infiltrado de células mononucleares, destruição de fibras cardíacas no foco inflamatório e comprometimento dos plexos nervosos, levando ao aparecimento de fibrose no miocárdio com conseqüente insuficiência cardíaca (Andrade, 2000; Rocha et al., 2007; Nunes et al., 2012). Além disso, a cardiomiopatia chagásica leva a depressão da contratilidade miocárdica e a dilatação do ventrículo esquerdo que tem sido associada ao remodelamento do miocárdio e à fibrose intersticial (Timonen et al., 2008). O quadro clínico varia significativamente de acordo com a extensão e localização das lesões cardíacas. Nos estágios iniciais, o paciente pode apresentar sintomas leves, relacionados a distúrbios de ritmo. Nos estágios intermediários, as manifestações clínicas persistem ou se intensificam, podendo ser detectado aumento do coração, de grau leve a moderado. Nos estágios finais, há acentuado aumento do coração com grave insuficiência cardíaca congestiva, fenômenos tromboembólicos e arritmias graves (Mady et al., 1994).

Os mecanismos envolvidos no estabelecimento/manutenção das diferentes formas clínicas da doença de Chagas são complexos e, por ainda não serem totalmente compreendidos, muitos grupos de pesquisa concentram seus estudos na busca de marcadores de prognóstico de evolução dessas manifestações clínicas graves. Elementos ligados ao *T.*

cruzi (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo, tamanho do inóculo) e ao hospedeiro (idade, sexo, raça, estado nutricional, genética, perfil da resposta imune) são apontados como possíveis fatores que influenciariam o desenvolvimento das formas graves da doença, mas parâmetros específicos preditivos e o papel de cada um destes fatores ainda não foram identificados (Rassi Jr et al., 2006; Costa & Lorenzo, 2009).

O prolongado período de latência e a escassez no número de parasitos, contrapostos à intensidade e à extensão das lesões, têm levado diversos autores a avaliarem o envolvimento de fatores auto-ímmunes na patogênese da lesão chagásica (Wood et al., 1982; Acosta & Santos-Buch, 1985; Kierszenbaum, 1986; Van Voorhis & Eisen, 1989; Levitus et al., 1991; Cunha-Neto et al., 1995; Kalil & Cunha-Neto, 1996; Al-Sabbagh et al., 1998; Ribeiro dos Santos et al., 2001; Cunha-Neto et al., 2006; Fonseca et al., 2007). Entretanto, outros trabalhos sugerem que o parasitismo intracelular pode ser mais frequente do que previamente demonstrado por microscopia ótica, sugerindo haver, na patologia chagásica, participação direta da reatividade imunológica contra células parasitadas (Jones et al., 1993; Vago et al., 1996; Añez et al., 1999; Palomino et al., 2000; Higuchi et al., 1993, 1997, 2003; Gutierrez et al., 2009). Existe, ainda, a coexistência desses dois fatores, resposta imune e parasitismo. Apesar da resposta autoimune contra antígenos do coração ser importante para a patogênese da doença de Chagas, a persistência do parasito ou de antígenos do parasito indica que sua permanência é necessária para sustentar essa resposta (Soares et al., 2001).

De fato, a resposta imune que se segue à infecção pelo *T. cruzi* representa importante fator na determinação do destino da infecção. Dentre os fatores imunológicos que podem ser destacados estão o reconhecimento de antígenos do parasito por uma série de receptores de membrana, a ativação de diferentes tipos celulares e, a produção de citocinas e quimiocinas e outros fatores solúveis essenciais para o controle da parasitemia. No entanto, esses mesmos fatores, que controlam a parasitemia, também podem contribuir para o dano inflamatório que causa a morbidade na doença de Chagas (Sathler-Avelar et al., 2009). Por exemplo, a presença de níveis elevados de citocinas e quimiocinas induzidas pelo *T. cruzi* no infiltrado inflamatório no miocárdio, pode causar morbidade e mortalidade e levar a alterações crônicas na estrutura cardíaca, tais como deposição de colágeno e fibrose (Ribeiro dos Santos et al., 2001; Teixeira et al., 2002).

Além dos elementos imunológicos, componentes proteicos da MEC têm ganhado destaque em vários estudos por sua importante participação no remodelamento do tecido conjuntivo, que ocorre em muitos processos fisiológicos normais. Dentre esses componentes, destacam-se as metaloproteinases de matriz (MMPs).

As MMPs são uma família multigênica, codificada por 24 genes distintos em humanos, que são expressos como 26 diferentes endopeptidases, cálcio e zinco-dependentes (Mannello & Medda, 2012) (Tabela 1). Essa família de proteínas compartilha a mesma topologia estrutural, com pré e pós-domínios, seguidos de um domínio catalítico (Figura 1). O pré-domínio NH₂-terminal é uma pequena porção hidrofóbica que direciona a síntese dessas proteínas para o retículo endoplasmático e a secreção para o espaço extracelular. O pró-domínio, localizado após o pré-domínio e com aproximadamente 80 aminoácidos, mantém a enzima em sua forma inativa. O domínio catalítico, por sua vez, possui um íon zinco (Zn²⁺) ligado ao sítio ativo e essa ligação é feita por três resíduos conservados de histidina na sequência AH₆EXGHXXGXXH. O sítio ativo é o local onde os substratos se ligam especificamente à proteína (Parks et al., 2004; Geurts et al., 2011; Mannello & Medda, 2012).

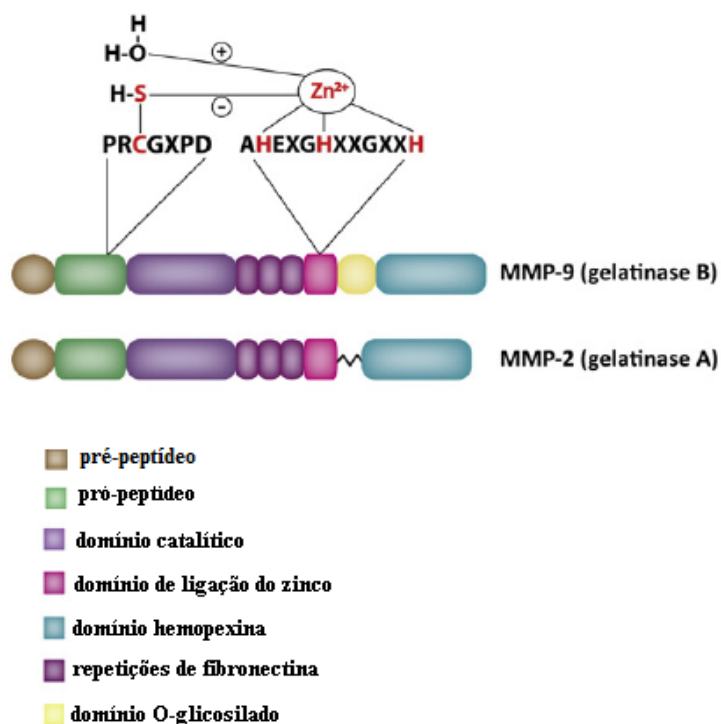


Figura 1 – Estrutura das MMP-9 e MMP-2.

Representação esquemática da organização de domínios nas MMP-2 e MMP-9. A estrutura padrão de uma MMP é constituída de um pré-peptídeo na porção NH₂, um pró-peptídeo, um domínio catalítico, um conservado sítio de ligação ao zinco (Zn²⁺) e um domínio hemopexina na porção C terminal. MMP-2 e MMP-9 se diferenciam por três repetições de domínios semelhantes à fibronectina, local onde a gelatina e o colágeno se ligam. Além disso, a MMP-9 é a única MMP que contém um domínio O-glicosilado rico em serina, treonina e prolina. A interação entre a cisteína no pró-peptídeo e o Zn²⁺ mantém a enzima latente. A ativação das MMPs pela remoção do pró-peptídeo por um mecanismo chamado de troca de cisteína permite que o Zn²⁺ interaja com uma molécula de água e que o substrato se ligue à proteína. Fonte: adaptado de Geurts et al., 2011.

Tabela 1 – Classificação das MMPs

MMP	Nome Descritivo	Principais Substratos
MMP-1	Colagenase intersticial	Colágenos I, II, III
MMP-2	Gelatinase A	Colágenos IV e V, elastina, fibronectina, gelatina
MMP-3	Estromelisina-1	Colágeno IV, pró-colágeno I, laminina
MMP-7	Matrilisina	Caseína, colágeno IV, elastina, fibronectina, laminina, gelatina I
MMP-8	Colagenase-2	Colágeno I, fibrinogênio, neutrófilo C, gelatina
MMP-9	Gelatinase B	Colágenos IV e V, elastina, gelatina I
MMP-10	Estromelisina-2	Caseína, gelatina
MMP-11	Estromelisina-3	Ainda não conhecido
MMP-12	Metaloelastase de macrófago	Fibrinogênio, fator XII
MMP-13	Colagenase-3	Colágenos I, II e III, fibrinogênio, gelatina, fator XII
MMP-14	Transmembrana-1	Colágenos I, II e III, caseína, fibronectina, fibrinogênio, gelatina
MMP-15	Transmembrana-2	Fibronectina, laminina
MMP-16	Transmembrana-3	Pro-MMP-2
MMP-17	Transmembrana-4	Fibrina, fibrinogênio, gelatina
MMP-18		Ainda não conhecido
MMP-19		Caseína, colágeno IV, fibrina, fibronectina, gelatina, laminina
MMP-20	Enamelisina	Amelogenina
MMP-21		Ainda não conhecido
MMP-23		Ainda não conhecido
MMP-24	Transmembrana-5	Gelatina
MMP-25	Transmembrana-6, Leucolisina	Colágeno IV, fibrina, fibronectina, gelatina
MMP-26	Endometase, Matrilisina-2	Colágeno IV, fibrinogênio, fibronectina, gelatina I
MMP-28	Epilisina	Caseína

Fonte: Adaptado de Rydlova et al., 2008.

As MMPs são secretadas em sua forma latente, como pró-enzimas ou zimogênios, e, por isso, requerem ativação proteolítica que ocorre após remoção do pró-peptídeo NH₂-terminal. Esse processo é acompanhado pela quebra de ligação entre o grupo tiol da cisteína no pró-peptídeo e o zinco no domínio catalítico. Dessa maneira, o local para ligação ao substrato fica exposto e o zinco disponível para se ligar a uma molécula de água, cuja presença é indispensável para o processo catalítico (Geurts et al., 2011; Mannello & Medda, 2012). Esse processo de ativação pode ser mediado por proteases e outras MMPs, ou alternativamente, por tratamentos químicos com ureia, detergentes e radicais livres (ROS) (Geurts et al., 2011).

Cada uma das MMPs apresenta particularidades em sua estrutura e são classificadas em grupos de acordo com seu substrato específico e com a organização de seu domínio catalítico. O grupo das gelatinases é composto pelas MMP-2 e MMP-9 e se diferencia dos outros grupos por possuir um domínio adicional semelhante à fibronectina, que é responsável pela ligação dessas enzimas ao colágeno desnaturado e à gelatina. Além disso, a MMP-9 ainda se diferencia da MMP-2, pois possui um domínio O-glicosilado que confere flexibilidade à sua estrutura, permitindo movimentos independentes, e, assim, facilitando a interação dos substratos com o sítio ativo (Opdenakker et al., 2001a; Geurts et al., 2011).

As MMPs são capazes de degradar componentes proteicos da MEC e, por isso, participam de uma variedade de processos fisiológicos como angiogênese, reparação tecidual, morfogênese, mobilização de células tronco e cicatrização de feridas (Nagase et al., 2006; Geurts et al., 2011). Durante esses processos fisiológicos a atividade das MMPs está sob um estreito controle combinando ativação e inibição. Os níveis de expressão das MMPs são precisamente regulados por fatores genéticos e epigenéticos, bem como pós-transcricionalmente por hormônios, fatores de crescimento, citocinas e interações célula-célula e célula-matriz, podendo ser reguladas, também, por inibidores fisiológicos endógenos (Kupai et al., 2010; Geurts et al., 2011). Dentre os inibidores endógenos, os principais são os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Nagase et al., 2006; Geurts et al., 2011).

O genoma humano tem 4 genes que codificam os TIMPs (TIMP-1 a 4). Os quatro TIMPs humanos possuem, entre eles, cerca de 40% de similaridade na sequência gênica (Brew & Nagase, 2010). Em geral, todos os TIMPs são capazes de inibir os mais de 20 diferentes tipos de MMPs, mas existem diferenças na especificidade entre eles (Brew & Nagase, 2010). Os TIMPs se ligam às pró-MMPs por meio da ligação de seu domínio C-terminal com o domínio hemopexina da pró-enzima. Essa interação é relativamente específica, sendo que TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 se ligam à MMP-2, e TIMP-1 e TIMP-3 à

MMP-9. Uma vez que essa interação não envolve a porção N-terminal do TIMP, o complexo TIMP-MMP ainda é capaz de interagir com uma segunda proteína, como, por exemplo, as metaloproteinases transmembrana (Manello & Medda et al., 2012). Os TIMPs possuem outras atividades biológicas independentes da inibição de MMPs, como, por exemplo, promoção da proliferação celular, atividade anti-angiogênica, pró e anti-apoptótica (Nagase et al., 2006; Brew & Nagase, 2010).

A partir do momento que ocorre desequilíbrio entre os níveis de MMPs e TIMPs, o processo fisiológico passa a ser patológico, desencadeando diversas doenças como câncer, artrites, inflamação, diabetes, e doenças cardiovasculares (Kupai et al., 2010). Já foi demonstrado que o remodelamento da matriz extracelular por desequilíbrio entre MMPs e TIMPs provoca a perda da integridade estrutural do coração e, conseqüentemente, a cardiopatia (Li et al., 2000; Geurts et al., 2011). De fato, níveis aumentados ou desregulados de MMPs são observados em qualquer doença que tem por característica a inflamação (Parks et al. 2004).

Dentre as diferentes MMPs, MMP-2 e MMP-9 destacam-se por seu envolvimento em doenças cardíacas. Muitas evidências demonstram que as MMP-2 e MMP-9 estão presentes no miocárdio e são capazes de degradar todos os componentes da matriz do coração (Polyakova et al., 2010). Uma maior atividade dessas MMPs pode resultar em degradação das fibras de colágeno, remodelamento da matriz extracelular com conseqüente dilatação ventricular progressiva (Li et al., 2000; Vanhoutte et al., 2006; Polyakova et al., 2010). Além disso, podem clivar proteínas intracelulares como trombina e miosina durante o estresse oxidativo (Opdenakker et al., 2001a; Gao et al., 2003; Nagase et al., 2006). Schulz (2007) mostrou que MMP-2 e MMP-9 são ativadas no coração humano após a isquemia e sua atividade correlaciona-se negativamente com o índice de função contrátil do ventrículo esquerdo e positivamente com a duração da isquemia.

A fibrose cardíaca não é definida apenas pelo aumento da concentração de proteínas da matriz no interstício, mas também pela mudança de conformação, organização e ligações cruzadas dessas proteínas (Li et al., 2000). Polyakova et al. 2010 mostraram que o aumento da expressão das MMPs, especialmente das gelatinases 2 e 9, está associado à maturação de colágeno I e III em pacientes com insuficiência cardíaca, indicando a importância das MMPs na configuração, ativação e deposição do colágeno no processo de fibrose. Na falência cardíaca, o colágeno é degradado por MMPs, que estão em níveis aumentados, e substituído por fibras de colágeno com fraca capacidade de interação, promovendo a dilatação dos ventrículos (Brower et al., 2006). Além disso, a digestão da matriz extracelular libera

moléculas com potente efeito na síntese de matriz, tais como fatores de crescimento de ligação à matriz e as matriquinas, que são peptídeos de matriz fragmentados que apresentam atividade biológica na regulação da atividade das células do tecido conjuntivo. O resultado final é, muitas vezes, aumento das MMPs acompanhado de aumento da fibrose (Li et al., 2000).

Mudanças na expressão das MMPs podem ser decorrentes de alteração genética, conhecida como polimorfismo. Polimorfismo genético é a denominação dada à coexistência de mais de uma forma variante de um gene num dado locus, na frequência acima de 1-2%, na constituição genética de uma população (De Nardini, 2009). Muitos trabalhos têm encontrado associação direta entre a ocorrência de polimorfismos nas sequências gênicas das MMPs e a mudança na atividade dessas proteínas, levando a predisposição ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Mizon-Gerard et al., 2004; Haberbosch & Gardemann, 2005; Abilleira et al., 2006, Ye, 2006). Wang e colaboradores (2011) mostraram que o polimorfismo da MMP-9 -1562 C/T é um fator de risco associado ao infarto do miocárdio, entretanto, essa associação varia em diferentes populações. Estudando o polimorfismo -1575 G/A da MMP-2 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, Bahrehmand e colaboradores, 2012, observaram associação entre a ocorrência do polimorfismo e o aumento dos níveis circulantes de MMP-2, e que esse aumento estaria relacionado ao risco de desenvolver doenças cardiovasculares.

Pode-se imaginar que as MMPs participam de processos patológicos simplesmente degradando moléculas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e laminina (Opdenakker et al., 2001a). Entretanto, essas enzimas possuem extensa variedade de funções biológicas com atuação em várias biomoléculas, incluindo citocinas, quimiocinas e hormônios, promovendo a regulação da resposta imune. Por outro lado, as citocinas também podem influenciar a expressão de MMPs (Geurts et al., 2011).

As MMPs são essenciais para o tráfego de leucócitos pelos tecidos, a partir da digestão de moléculas da matriz extracelular (Parks et al., 2004; Hu et al., 2007). As MMP-2 e MMP-9 também clivam quimiocinas como CCL2 (MCP-1) e citocinas como TGF- β e IL-1 promovendo um mecanismo indireto de regulação de fluxo de células para o foco inflamatório (Deschamps & Spinale, 2006). Apesar das MMPs serem cruciais para resposta inflamatória, a atividade descontrolada dessas proteases pode provocar dano tecidual grave ocasionando, em alguns casos, a morte do hospedeiro (Geurts et al., 2011).

As MMPs estão associadas a processos de remodelamento tecidual e têm papel importante nas doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários (Geurts et al., 2011).

Gutierrez et al., 2008 mostrou que camundongos infectados pelo *T. cruzi* tratados com inibidores de MMP-2 e MMP-9 apresentam decréscimo significativo na inflamação cardíaca e aumento da sobrevida, além de níveis reduzidos de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico (NO). Esses autores sugerem que as MMP-2 e 9 são importantes na indução da miocardiopatia na infecção pelo *T. cruzi*, possivelmente devido à migração de células inflamatórias para o tecido cardíaco. Apesar da infecção pelo *T. cruzi* induzir redução das formas latentes e ativas da MMP-9 em hepatócitos *in vitro*, tanto MMP-2 quanto MMP-9 são induzidas pelo *T. cruzi* em culturas de cardiomiócitos (Geurts et al., 2011).

O rompimento da arquitetura da matriz extracelular, com o deslocamento de células inflamatórias para o foco inflamatório, tem sido apontado como principal mecanismo pelo qual MMP-2 e MMP-9 contribuem para a patogênese da miocardite chagásica (Gutierrez et al., 2008). Entretanto, esse mecanismo não está totalmente esclarecido.

Considerando-se as informações acima, as MMPs podem ser destacadas como moléculas importantes na origem das alterações patológicas do miocárdio, entretanto não existem estudos *in vivo* que correlacionem a atividade dessas enzimas com a disfunção cardíaca na doença Chagas. O presente estudo avalia a hipótese de que: “os níveis, bem como, o potencial de atividade proteolítica das metaloproteinases são diferentes entre pacientes que apresentam formas clínicas distintas da doença de Chagas, contribuindo para a inflamação no ambiente cardíaco e exercendo papel fundamental na patogênese da cardiomiopatia chagásica”. Esse trabalho apresenta-se como inovador e de grande relevância para o estudo da doença de Chagas, uma vez que avalia o efeito direto das MMPs 2 e 9 permitindo a identificação de possíveis marcadores de prognóstico da infecção chagásica que antecedem o dano cardíaco intrínseco à doença.

POPULAÇÃO DE ESTUDO, MATERIAIS E MÉTODOS

POPULAÇÃO DE ESTUDO, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População estudada

Os pacientes portadores da doença de Chagas foram recrutados no Ambulatório de referência em doença de Chagas do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP), da Faculdade de Medicina/UFMG. Os critérios e descrição das formas clínicas foram baseados de acordo com Rocha et al, 2007:

Grupo IND: Constituído por pacientes portadores da forma clínica indeterminada (IND) que apresentaram positividade sorológica e/ ou parasitológica para doença de Chagas; ausência de sintomas e/ ou sinais da moléstia; eletrocardiograma (ECG) convencional normal; estudos radiológicos do coração, esôfago e cólon normais.

Grupo CARD: Constituído por pacientes portadores da forma clínica cardíaca grau V (CARD) que apresentaram ECG com alterações avançadas, extra-sístoles ventriculares frequentes, aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole e silhueta cardíaca aumentada.

Os indivíduos não infectados (NI) foram selecionados pelos pesquisadores, pertencendo ao convívio pessoal dos mesmos, cuja procedência demográfica era conhecida, considerando os critérios de exclusão mencionados a seguir. A coleta da amostra foi realizada no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR). Critérios e descrição dos indivíduos NI:

Grupo NI: Constituído por indivíduos não-infectados (NI) que apresentaram um mínimo de dois resultados negativos, além de ausência de indícios clínicos e epidemiológicos do diagnóstico de doença de Chagas.

Critérios de seleção

Após avaliação clínica, eletrocardiográfica e laboratorial, foram selecionados pacientes de acordo com os seguintes critérios: diagnóstico sorológico para a doença de Chagas, caracterizado pela presença de pelo menos duas reações sorológicas positivas dentre as três técnicas empregadas (ELISA, Hemaglutinação e Reação de imunofluorescência indireta), idade compreendida entre 30 e 70 anos; presença de alterações eletrocardiográficas compatíveis com associação do bloqueio completo do ramo direito e hemibloqueio anterior esquerdo; níveis de tensão arterial dentro de faixa na normalidade (sistólica < 160 mmHg e diastólica < 90 mmHg), ausência de evidências clínicas e complementares de acometimento cardíaco não relacionado à doença de Chagas, e ausência de condições clínicas que possam

alterar a função cardiocirculatória; conclusão dos exames propostos; consentimento voluntário de participação na pesquisa.

Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo todos os pacientes que não preencheram os critérios de inclusão definidos, acima, e os que apresentaram:

- * Impossibilidade ou ausência de disponibilidade para a realização dos exames propostos;
- * Hipertensão arterial sistêmica (HAS), definida operacionalmente como: pressão arterial medida durante o exame físico 160/95 mmHg, em mais de uma oportunidade ou; pressão arterial medida durante o exame físico entre 140-159/90-94 mmHg, em mais de uma oportunidade, associado a: 1) história de hipertensão arterial sistêmica, ou; 2) quarta bulha ao exame físico, ou; 3) provável sobrecarga ventricular esquerda ao ECG pelo critério de Romhilt-Estes, ou; 4) evidências de dilatação aórtica à radiografia de tórax.
- * Evidências clínicas ou laboratoriais de hipo ou hipertireoidismo;
- * Diabetes mellitus ou tolerância reduzida à glicose, conforme anamnese, dosagem de glicemia em jejum e, se necessário, prova de tolerância oral à glicose;
- * Episódio prévio sugestivo de doença reumática aguda;
- * Doença pulmonar obstrutiva crônica, evidenciada pela história clínica, exame físico, ECG e alterações radiológicas sugestivas;
- * Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420 g de etanol (média diária acima de 60 g de etanol);
- * Evidências clínicas, eletrocardiográficas e/ ou ergométricas de cardiopatia isquêmica;
- * Outras cardiopatias;
- * Gravidez, definida por critérios laboratoriais;
- * Qualquer outra doença sistêmica significativa crônica ou aguda que possa interferir nos resultados dos métodos propostos.
- * Anemia significativa, definida arbitrariamente com hemoglobina menor que 10g/dl;
- * Distúrbios hidroeletrólíticos, especificamente, níveis séricos anormais de potássio e sódio;
- * Insuficiência renal, definida pelo aumento dos níveis de creatinina e ureia plasmáticas, associadas ou não às manifestações clássicas de uremia.

3.2 Amostras de sangue

As amostras de sangue de pacientes portadores da doença de Chagas e de indivíduos não infectados foram coletadas da seguinte maneira: 5 mL de sangue periférico foram coletados em tubos Vacutainer contendo o anti-coagulante EDTA (Becton Dickinson, CA,

USA) para a extração de DNA e posterior avaliação da presença de polimorfismos; 10 mL de sangue periférico foram coletados em tubos vacutainer contendo o anticoagulante heparina (Becton Dickinson, CA, USA) para a marcação de MMP-2 e MMP-9 em leucócitos; 10 mL de sangue periférico foram coletados em tubos vacutainer sem anti-coagulante (Becton Dickinson, CA, USA) para a separação de amostras de soro. As amostras de soro foram obtidas após centrifugação dos tubos de coleta de sangue por 10 minutos a 3000 rpm, em temperatura ambiente. O soro foi separado, aliquotado em tubos tipo eppendorf e armazenados a -70°C para a realização dos experimentos de zimografia, dosagem de citocinas, quimiocinas e MMP2 e -9, e cultura de cardiomiócitos. Esses passos estão esquematizados na figura 2.

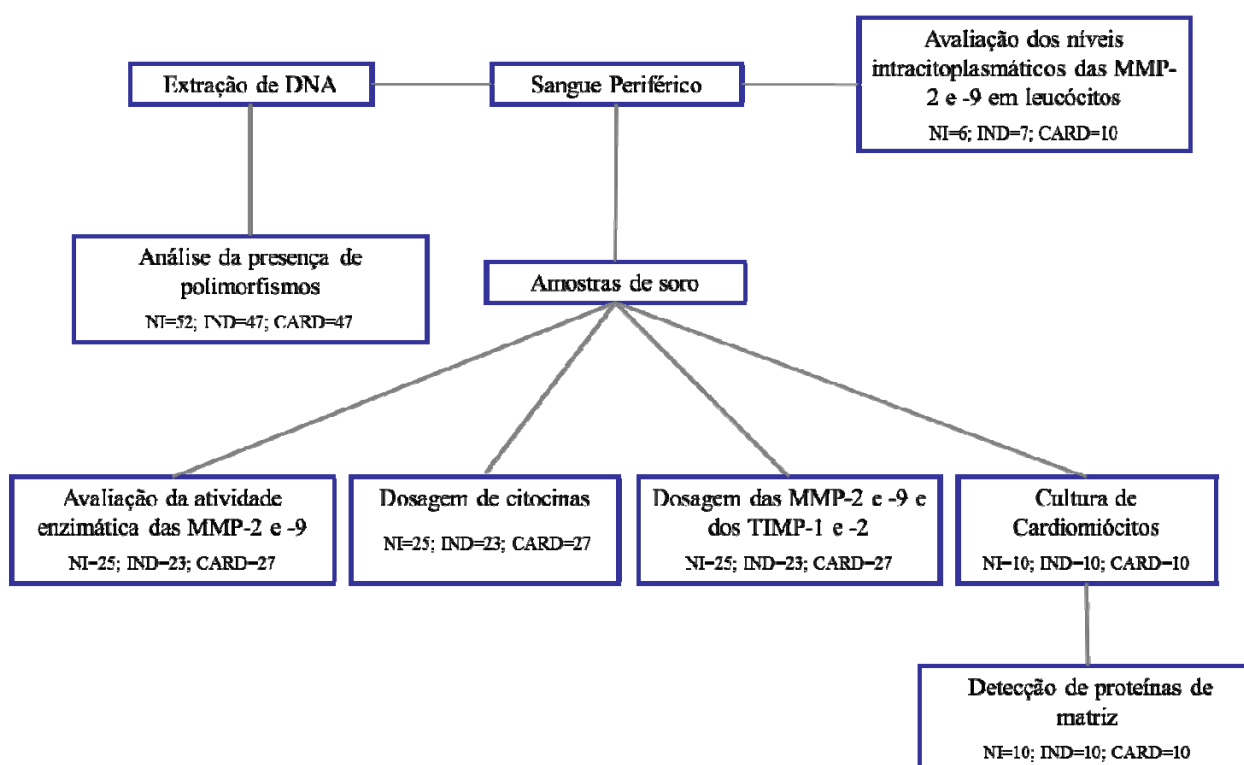


Figura 2 – Esquema da estratégia de trabalho.

Representação esquemática da estratégia de trabalho com os experimentos realizados, bem como o número de pacientes envolvidos em cada etapa experimental NI, indivíduos não infectados. IND, pacientes portadores da forma clínica indeterminada. CARD, pacientes portadores da forma clínica cardíaca.

3.3 Preparo dos Antígenos derivados da forma Tripomastigota (TRIPO) do *T. cruzi*

As formas tripomastigotas da cepa Y foram obtidas de cultura de células Vero mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os

parasitos foram lavados três vezes em solução salina (PBS 0,15M pH=7,4) por centrifugação e a massa úmida congelada e degelada três vezes. Completou-se a ruptura total dos parasitos por homogeneização em tubos Potter Elvejen a 20.000 g 5 vezes por 60 segundos cada, com 30 segundos de intervalo em banho de gelo. Subsequentemente, as suspensões foram centrifugadas a 50000 g durante 60 minutos a 4°C contra PBS. O fluido sobrenadante límpido foi coletado, dialisado por 48 horas a 4°C, esterilizado por filtração em filtro Millipore 0.45µm e mantido em pequenas alíquotas (1mL) a -70°C até o uso. A concentração proteica foi dosada com auxílio do equipamento NanoDrop (Thermo Scientific) e a concentração utilizada foi de 20µg/mL.

3.4 Detecção das MMPs 2 e 9 e dos TIMPs 1 e 2 em amostras de soro

Para esse ensaio foi utilizada a Tecnologia Luminex™ xMAP, utilizando os Kits Milliplex (Instituto Genese de Análises Clínicas, Lifescience, Brasil) que envolve um processo exclusivo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. A diluição do soro dos pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos NI utilizada foi de 1:20 e 1:50, para dosagem de MMP-2 e MMP-9, e TIMP-1 e TIMP-2, respectivamente. Os ensaios se fundamentam na metodologia “sanduíche” convencional de dois-sítios e foram realizados em placas de 96 poços, onde já se encontrava o mix de microesferas acoplado a anticorpos de captura específicos para MMPs 2 e 9 e TIMPs 1 e 2. Os padrões e as amostras foram adicionados para que ocorresse a ligação do anticorpo de captura ao analito específico. A próxima etapa foi a adição do anticorpo de detecção biotilado que se ligou ao analito específico. O resultado final foi amplificado através de incubação com estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). SA-PE se ligou ao anticorpo biotilado e é responsável pela revelação do ensaio, por meio da emissão de sinal fluorescente. As microesferas foram lidas no equipamento Luminex através de sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. No Luminex, um feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal de em cada microesfera. Ao passarem pelo fluxo celular Luminex, cada microesfera foi identificada e o sinal SA-PE associado a elas foi quantificado. Os valores dos padrões permitiram a construção de uma curva padrão, a partir da qual foi feita a quantificação das amostras. O resultado final foi obtido em pg/mL (Figura 3).

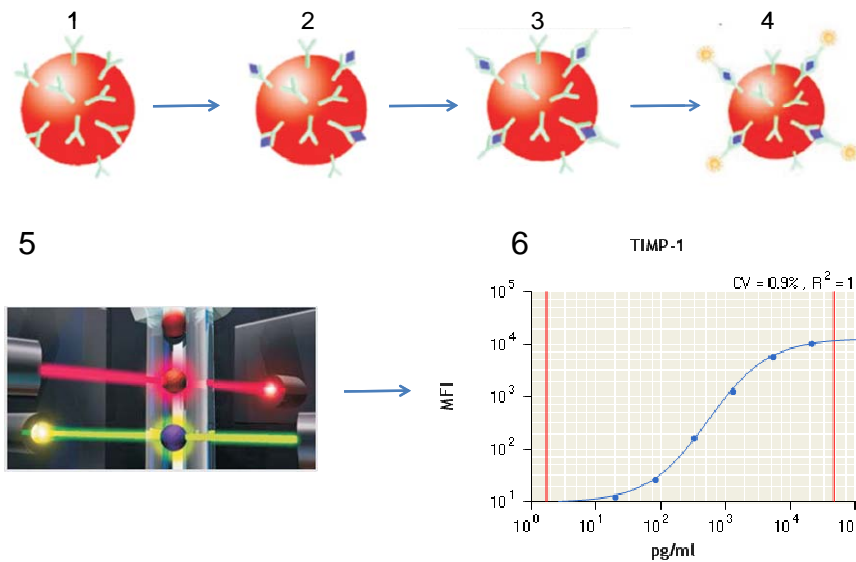


Figura 3 – Representação da metodologia utilizando o sistema Luminex.

Os ensaios se fundamentam na metodologia “sanduíche” convencional de dois-sítios e são realizados em placas de 96 poços. Resumidamente, os kits utilizam proporções precisas de dois fluoróforos, criando 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex. Os kits foram desenvolvidos com estas microesferas e se fundamentam no imunoensaio. Anticorpos de captura específicos para cada proteína foram imobilizados às microesferas através de ligações covalentes não reversíveis (1). A proteína, presente no soro, se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas (2) e a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção (3 e 4). O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo (5). O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera. Cada microesfera é identificada e o sinal dado pela SA-PE (estreptavidina conjugada com PE) é quantificado. A partir de uma curva padrão, os valores das amostras são quantificados (6). Fonte: Instituto Genese de Análises Clínicas.

3.5 Detecção dos níveis séricos das MMPs por Zimografia

A técnica de zimografia consiste de eletroforese, à 0°C, em gel descontínuo de poli(acrilamida), próprio para avaliação de proteínas, contendo substrato enzimático (gelatina do tipo II). O gel foi preparado com 1mg/mL de gelatina (Sigma). As amostras de soro foram aplicadas com concentração proteica de 40 ug, determinada após dosagem de proteína com BCA Protein Assay Kit (Pierce). Em cada gel, foram utilizados padrão de peso molecular (New England Biolabs) e controles positivos representados por MMP-2 e MMP-9 recombinantes (0,001mg/mL, Calbiochem). A corrida de eletroforese foi feita a 100V e 35mA. Após a eletroforese, o duodecil sulfato de sódio (SDS) foi removido com duas

lavagens de Triton-X-100 a 2,5%. O gel foi incubado *overnight*, sob temperatura de 37°C, em solução de Tris 50mM para que as enzimas renaturassem e degradassem o substrato proteico. Após a incubação, o gel foi corado por 1 hora com Comassie Blue (0,5g de Comassie Blue, 200mL de Metanol, 50mL de ácido acético) e posteriormente descorado em solução própria (250mL Etanol, 80mL ácido acético) por tempo suficiente para visualização das bandas. A coloração com azul de comassie permitiu a detecção de bandas de atividade proteolítica incolores, em contraste com a coloração azul do gel (Figura 4). A imagem do gel foi obtida pelo scanner GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad) e a quantificação das bandas foi realizada no programa Quantity One. O programa analisa as bandas de acordo com os pixels da área selecionada. Uma vez que a área de atividade enzimática é incolor, ou seja, não possui pixels, a análise foi feita subtraindo a área em mm² pelo volume OD, valores dados pelo programa, para obtenção do valor correspondente aos níveis de MMPs, que também podem ser interpretados como potencial de atividade enzimática (Vandooren et al., 2013).

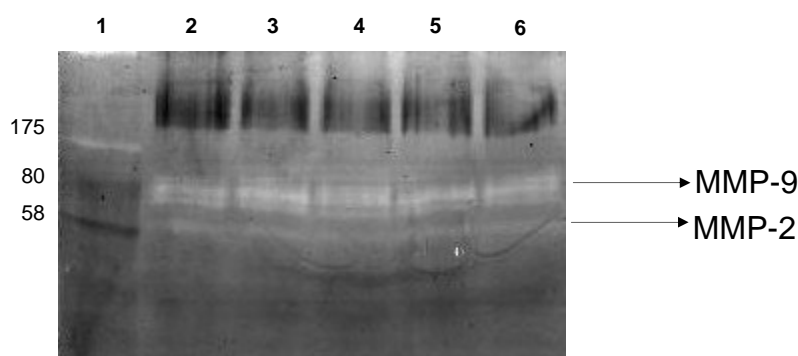


Figura 4 – Gel de zimografia

Representação de um gel de zimografia. A atividade proteolítica das MMP-2 e -9 é identificada a partir de bandas incolores em contraste com a coloração escura do gel. A partir do peso molecular é possível distinguir MMP-9 e MMP-2. O número 1 corresponde ao padrão de peso molecular em Kb e os números de 2 a 6 correspondem às amostras de soro aplicadas no gel.

3.6 Avaliação do padrão de citocinas (TNF- α , IL-10, IL-6, e IL-1 β) em amostras de soro e sobrenadante de cultura.

As citocinas foram quantificadas utilizando-se o sistema citofluorométrico com microesferas fluorescentes (Cytometric Bead Array-CBA, Becton Dickinson-BD), que emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e

distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas e as quimiocinas humanas. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas moléculas solúveis no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Para esse ensaio foi utilizado o Kit inflamatório, não sendo necessário diluir as amostras.

Para a reação, 25 μ L da mistura de esferas de captura, marcadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina estudada foram transferidas para tubos de 12x75mm destinados ao controle negativo e às amostras a serem testadas. Em seguida, 25 μ L do diluente G e das amostras a serem testadas foram adicionados aos seus respectivos tubos. Logo depois, foram adicionados 18 μ L do coquetel de anticorpos monoclonais humanos marcados com PE (Human Inflammation PE Detection Reagent). Os tubos foram incubados por 3 horas, à temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L da solução tampão PBS (Tampão Fosfato Salínico) e centrifugadas a 400 g, por 7 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi aspirado e descartado, restando aproximadamente 100 μ L em cada tubo. As amostras foram levadas para leitura no citômetro de fluxo. Para aquisição dos dados das amostras, o aparelho foi ajustado utilizando o BD FACSComp Software e o BD Calibrate Beads. O objetivo do ajuste do aparelho consiste em definir os parâmetros de tamanho (Forward Scatter –FSC) e granulosidade (Side scatter- SSC) adequados para o posicionamento das esferas de captura em gráficos de tamanho versus granulosidade. Após a seleção das esferas, procede-se o ajuste da intensidade da Fluorescência 3 (FL3) para permitir a segregação das esferas policromáticas, apresentando diferentes intensidades de fluorescência, em histogramas unidimensionais. Para cada tubo processado foram adquiridos 1800 eventos dentro da região selecionada R1 que equivale a 300 eventos por citocina ou quimiocina testada.

Após leitura, a análise do perfil de citocinas foi feita seguindo o protocolo proposto pelo fabricante através da utilização do BD CBA Analyses Software com auxílio do Microsoft Excel, modificado como descrito a seguir. O programa BD CBA Analysis Software faz a seleção automática da região das esferas de captura em gráficos de tamanho versus granulosidade. Em seguida, o programa separa as esferas em função da intensidade da FL3 e analisa o deslocamento das esferas em função da intensidade da fluorescência 2 (FL2) em gráficos bidimensionais de FL2 versus FL3. A ligação da citocina ou quimiocina presente na amostra de interesse à esfera de captura e a revelação da ligação através do uso de um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas marcadas com PE pode ser evidenciado através do deslocamento do conjunto de esferas para a região de maior

intensidade de fluorescência em relação ao tubo controle negativo, sem soro humano (Figura 5). Os valores correspondentes à intensidade média de fluorescência FL2 na escala logarítmica foram utilizados como a unidade de análise semi-quantitativa para cada citocina ou quimiocina analisada. Os valores foram expressos em pg/mL e intensidade média de fluorescência (MFI). No presente trabalho, as análises foram feitas utilizando os valores de MFI.

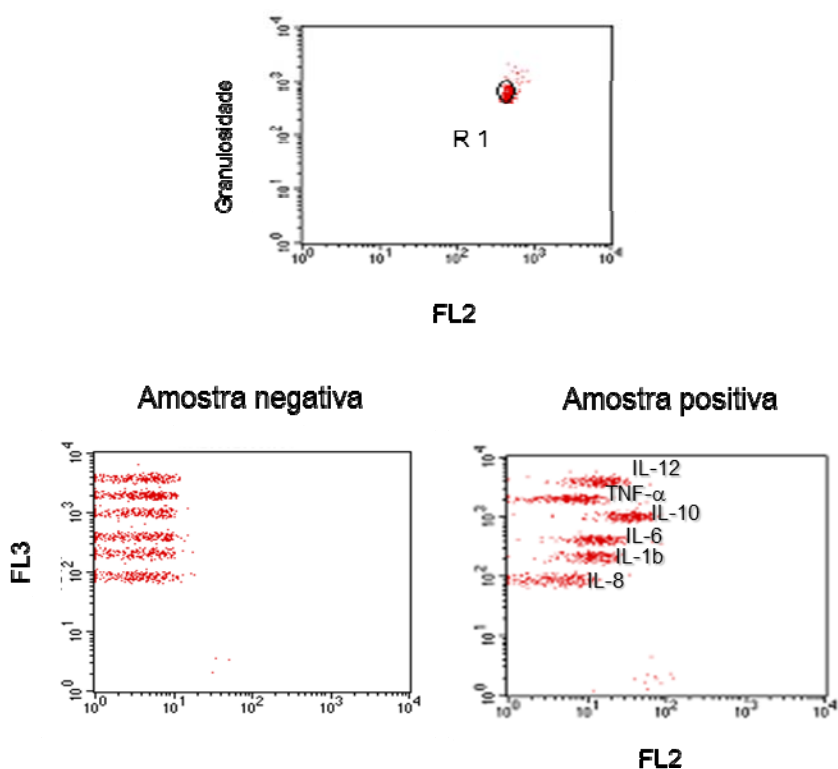


Figura 5 – Análise de citocinas por citometria de fluxo

Representação dos gráficos de distribuição pontual obtidos a partir da leitura das amostras no citômetro de fluxo FACScalibur utilizando o kit inflamatório. Primeiramente, as esferas são selecionadas em gráficos de Granulosidade versus FL2 (A). Após a seleção das esferas, as mesmas são separadas em função da intensidade da FL3 (B). A análise é feita a partir do deslocamento das esferas em função da intensidade da fluorescência 2 (FL2) em gráficos bidimensionais de FL2 versus FL3 (C). O gráfico B representa uma amostra negativa e o gráfico C representa uma amostra positiva.

3.7 Análise dos níveis intracitoplasmáticos das metaloproteinases em leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas por reações de imunofluorescência através da citometria de fluxo

3.7.1 Análise ex vivo dos níveis intracitoplasmáticos das metaloproteinases

Aliquotas de 100µl das amostras de células sanguíneas foram coletadas a vácuo em tubos de 5mL contendo anticoagulante EDTA (Vacutainer - BD, E.U.A), transferidos para tubos de poliestireno 5ml (Falcon - Becton Dickinson - BD, E.U.A) e incubadas com anticorpos monoclonais de superfície marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), Alofocianina (APC) ou Cloreto de Peridina Clorofila (PerCP). As células e anticorpos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras de células foram lisadas e fixadas em 2mL de solução de lise comercial (50.000USP/L de heparina, 2,85g/L de citrato de sódio, 30mL/L de dietilenoglicol e 54mL/L de formaldeído), por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada às amostras 1ml de PBS-W (PBS pH 7.4, contendo 0.5% BSA e 0.1% de azida sódica) e estas foram centrifugadas a 400g por 10 minutos a 18°C (Centrifuga Beckman Modelo j-6b, E.U.A). O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas com 2ml de PBS W. Para a detecção dos marcadores intracitoplasmáticos foram acrescentados ao tubo 2,5ml de PBS-P (PBS, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 10 minutos à temperatura ambiente. Seguidos da adição de 20µL de anticorpo anti-MMPs marcado com PE ou FITC, diluído em PBS-P ao respectivo tubo, e posteriormente incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 1mL de PBS-W. No final, foram adicionados 200uL de solução fixadora - MFF (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/l de cloreto de sódio, pH 7,2 - reagentes SIGMA, E.U.A). As amostras contendo a suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FACScalibur - BD, E.U.A). Foram analisados em torno de 70.000 eventos totais.

3.7.2 Análise dos níveis intracitoplasmáticos das metaloproteinases após estimulação in vitro

As células sanguíneas dos pacientes que participaram deste estudo foram coletadas em tubo Vacutainer estéril contendo heparina. Aliquotas de 1mL de sangue total foram adicionadas a tubos de polipropileno de 14mL (Falcon, E.U.A). As células do sangue

periférico foram incubadas na presença de meio RPMI (Gibco), recebendo a denominação de cultura controle (C) ou na presença de antígenos solúveis tripomastigotas (TRIPO) do *T. cruzi*, com uma concentração final de 20µg/mL, recebendo a denominação de cultura com estímulo específico (TRIPO). Os tubos foram previamente incubados durante 18 horas em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C (Forma Scientific EUA). Em seguida, foram adicionados a todos os tubos de cultura 20µl de Brefeldina A (Sigma, EUA) na concentração de 1mg/mL. As amostras foram incubadas por mais quatro horas em estufa nas mesmas condições acima. A utilização da Brefeldina assegura a retenção da citocina no interior da célula, uma vez que essa substância mantém a citocina no complexo de Golgi. Após a incubação, 200µL de EDTA (Sigma, EUA) na concentração final de 2mM foram adicionados diretamente às culturas. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 15 minutos em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C. Esse procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados e comparáveis. Posteriormente, foram adicionadas as amostras de sangue 3mL de PBS-W (PBS pH 7.4, contendo 0.5% BSA e 0.1% de azida sódica) e estas foram centrifugadas a 400g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi aspirado deixando um volume final de 2mL. Foram transferidos 200µL deste sangue para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon, EUA) previamente identificados e com os anticorpos correspondentes e em seguida, incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lisadas e fixadas em 2mL de solução de lise comercial (50.000USP/L de heparina, 2,85g/L de citrato de sódio, 30mL/L de dietilenoglicol e 54mL/L de formaldeído) por 10 minutos à temperatura ambiente. ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1mL de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos à 18°C. O conteúdo foi vertido e 200µL de solução fixadora – MFF (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2 - reagentes SIGMA, E.U.A) adicionada aos tubos.

Para a detecção dos marcadores intracitoplasmáticos foram acrescentados ao tubo 2,5ml de PBS-P (PBS, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 10 minutos à temperatura ambiente. Seguidos da adição de 20µL de anticorpo anti-citocina ou anti-MMPs marcado com PE, diluído em PBS-P ao respectivo tubo, e posteriormente incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 1mL de PBS-P e em seguida, com 1mL de PBS-W. No final, foram adicionados 200uL de solução fixadora MFF. As amostras contendo a suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo

(FACScalibur - BD, E.U.A). Foram analisados em torno de 70.000 eventos dentro da população de linfócitos totais. As moléculas de superfície analisadas foram: CD14PerCP (BD, USA. Clone MΦP9), CD8 FITC (BD, USA. Clone HIT8a) e CD8 PerCP (BD, USA. Clone SK1), CD4APC (BD, USA. Clone RPA-T4). Os marcadores intracitoplasmáticos analisados foram: MMP-2 PE (R&D Systems. Clone 1A10) e MMP-9 FITC (R&D Systems. Clone 56129). A diluição para esses marcadores intracitoplasmáticos foi de 1:7.

3.8 Extração de DNA de amostras do sangue periférico

O DNA das amostras de sangue periférico foi extraído utilizando-se o protocolo de fenol-clorofórmio descrito por Miller et al, 1988, modificado em nosso laboratório. No processo de extração do DNA, um volume de 200µL de sangue venoso periférico coletado em tubo vacutainer, contendo o anticoagulante EDTA, foi transferido para tubos cônicos de 1,5mL utilizando pipetas plásticas de transferência e adicionados 1mL de solução de Tris NH₄Cl (1:9) (Tris HCl 0,17 M pH 7,65/NH₄Cl 0,155M) previamente aquecida a 37°C. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C durante 5 minutos, sendo posteriormente centrifugadas a 900 g por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado deixando 400µL no tubo (o sobrenadante foi descartado em solução de hipoclorito de sódio 5%). O procedimento descrito foi repetido utilizando dessa vez 600µL da mesma solução e descartando-se todo o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado com 1 mL de solução salina 0,9%. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 900 g durante 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado e descartado em solução de hipoclorito. Em seguida, adicionou-se 150µL de HIGH TE (Tris HCl pH 8,0 100mM/ EDTA pH8,0 40mM), e o precipitado foi ressuspensionado por agitação no vórtex. Adicionou-se, então, 200µL de solução de Lise de Madissen (Tris HCl 0,1 M pH8,0/ EDTA 0,5M pH8,0/ SDS 0,2%/ NaCl 1M) pré-aquecida a 50°C, 10µL de solução de proteinase K (20mg/mL) e as amostras incubadas a 37°C *overnight* (ON). Após esse período, 400µL de fenol (saturado com Tris) foram adicionados em cada uma das amostras, homogeneizando lentamente por inversão, durante 20 minutos e, em seguida, centrifugadas a 900 g por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido e, então, a fase aquosa foi aspirada e transferida para um novo tubo cônico de 1,5mL, no qual foram adicionados 400µL de clorofórmio – álcool iso-amílico (24:1) à temperatura ambiente. As amostras foram novamente homogeneizadas por 20 minutos e então centrifugadas a 900 g por 5 minutos. A nova fase aquosa formada foi aspirada e transferida para outro tubo cônico de 1,5mL, no qual adicionou-se 40µL de acetato de sódio (3M) e 450 µL de álcool isopropílico gelado. A amostra foi homogeneizada lentamente até o DNA

precipitar e centrifugada a 900 g por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram vertidos por 5 minutos em papel absorvente. O DNA foi ressuspendido em 30µL de LOW TE (Tris HCl 10mM pH8,0 / EDTA 40mM pH8,0) e incubado em banho Maria a 57°C por 5 minutos. A quantificação da concentração de DNA de cada amostra foi realizada em NanoDrop 100 (Thermo Scientific) utilizando-se 1µL da amostra de DNA. As amostras foram diluídas em água Mili-Q para que uma concentração final de 50ng fosse obtida.

3.9 Detecção de polimorfismo de nucleotídeo único em genes codificadores de membros da família das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e de seu inibidor (TIMP-1)

A partir do DNA isolado do sangue periférico, conforme protocolo descrito acima, a genotipagem foi realizada pelo método *Real Time* PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando o sistema *TaqMan*. Foram utilizados *primers* e sondas, confeccionados pela Applied Biosystems, correspondentes a cada SNP. O sistema *TaqMan* utiliza, além dos *primers*, uma sonda (oligonucleotídeo) contendo um corante fluorescente repórter ligado a sua extremidade 5' (VIC e FAM) e um *quencher* não fluorescente ligado a extremidade 3' (MGB). Essa sonda liga-se a uma região do DNA posterior ao *primer*. Quando a polimerase começa a sintetizar o fragmento de DNA a partir do *primer*, ela é capaz de clivar a sonda e separar o corante do *quencher*, havendo, dessa forma, liberação de um sinal fluorescente. Cada alelo possui uma sonda fluorescente diferente, permitindo determinar o genótipo do polimorfismo a ser estudado de acordo com a(s) fluorescência(s) produzida(s). As identificações dos polimorfismos estudados estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 - Identificação dos polimorfismos estudados

<i>Gene</i>	<i>Posição</i>	<i>Troca de Bases</i>	<i>Cromossomo*</i>	<i>rs</i>
MMP-2	-1575	G/A	16q13-q21	243866
MMP-2	-1306	C/T	16q13-q21	243865
MMP-2	-735	C/T	16q13-q21	2285053
MMP-9	-1562	C/T	20q11.2-q13.1	3918242
TIMP-1	+372	C/T	Xp11.3-p11.23	4898

* Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

As reações de PCR foram realizadas no termociclador em tempo real da Bio-Rad (CFX96 Real-Time, Bio-Rad Laboratories, USA). Foi utilizado um volume final de reação de 20 µL, contendo 50 ng de DNA diluídos em 9 µL de água, 10µL de *master mix* (TaqMan) e 0,5µL de primer. Essas reações foram realizadas em placas de 96 poços (Bio-Rad, USA), sendo incluídos controle positivo e controle negativo. As condições de realização das reações estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Condições da PCR utilizada para a identificação de polimorfismos

<i>Condições</i>	<i>Temperatura</i> °C	<i>Duração</i>	<i>Ciclos</i>
Ativação da AmpliTaq polimerase	95	10 minutos	-
Desnaturação	95	15 segundos	40
Anelamento/extensão	60	1 minuto	40

As análises foram realizadas através do software CFX-manager (Bio-Rad). Considerando que cada alelo está associado a um fluoróforo diferente, a apresentação de apenas um sinal fluorescente refere-se ao genótipo homozigoto, enquanto que a apresentação de dois sinais fluorescentes refere-se ao genótipo heterozigoto.

3.10 Preparo de microtecidos cardíacos – Cultura primária tridimensional de cardiomiócitos

Células musculares cardíacas foram obtidas de acordo com método descrito por Meirelles e colaboradores (1986), a partir dos corações de embriões de camundongos suíços com 18 dias de gestação. Os camundongos suíços fêmeas foram provenientes do biotério de experimentação animal do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- LW-21/09) da FIOCRUZ-RJ.

As fêmeas grávidas foram eutanasiadas individualmente em câmara com dióxido de carbono (CO₂), mergulhadas em álcool 70% e fixadas na placa de contenção (placa de cortiça) com a região ventral voltada para cima para remoção dos embriões. O peritônio foi exposto com auxílio de tesoura e pinça e, com outro par de pinça e tesoura, abriu-se a cavidade

peritoneal para retirada do útero, que foi colocado em placa de petri contendo solução de Ringer (NaCl 154mM, KCl 3,35mM, CaCl₂ 1,7mM, pH 7,0). Os embriões foram removidos, decapitados e foi feito um pequeno corte no esterno para retirada dos corações. Os átrios foram descartados e, os ventrículos, fragmentados com auxílio de bisturi. O tecido fragmentado foi lavado em PBS e submetido à dissociação mecânica (com pipeta e agitador magnético por 5 minutos a 37°C) e enzimática sequencial com solução de tripsina 0,025% e colagenase 0,01% em PBS. A cada processo de dissociação o sobrenadante foi coletado e guardado em tubos de 15mL no gelo. Os tubos foram identificados com o número do processo de dissociação. O sobrenadante da primeira dissociação não foi coletado, pois tinha basicamente hemácia, por isso, a coleta do sobrenadante foi iniciada a partir da segunda. Foram feitas em média 12 repetições da dissociação, até desaparecer o grumo, sendo que a cada dissociação verificou-se a liberação de células no sobrenadante com auxílio do microscópio. Após o término da dissociação, a suspensão celular foi lavada e submetida à centrifugação a 400 g, por 10 minutos a 4°C. Ao final da lavagem as células foram colocadas em um único tubo para contagem em câmara de Neubauer. As células foram cultivadas ($2,5 \times 10^4$ /poço) em placas de 96 poços com fundo em U, previamente revestidas com agarose 1%. A cultura foi mantida em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2% de extrato embrionário de embriões de galinha, 1% de L-glutamina, 2,5mM de CaCl₂, nitrato férrico, hepes e penicilina. As culturas foram mantidas e conservadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, por 96 horas para formação dos esferóides. Os esferóides são, portanto, agregados de cardiomiócitos, fibroblastos e matriz extracelular (Figura 6)

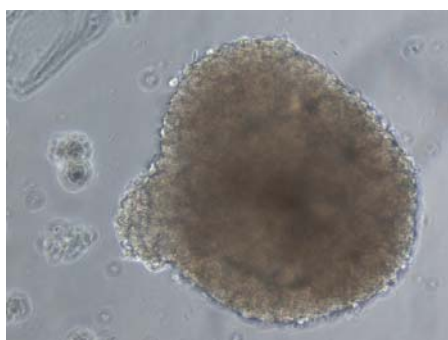


Figura 6 – Esferóide de cardiomiócitos

Representação do tamanho de um esferóide de cardiomiócitos (25×10^3 células) em placas de fundo em U (96 poços) após 96 horas de cultura na ausência de soro humano. Imagens obtidas a partir de microscópio de contraste de fase (Olympus). Aumento: 400X

3.11 Tratamento do microtecido cardíaco com soro de indivíduos não infectados e de pacientes com doença de Chagas

A diluição de soro dos pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos NI foi de 1:20, sendo o soro diluído em meio DMEM. Após obtenção dos esferóides conforme protocolo descrito acima, os mesmos foram coletados com auxílio de pipeta Pasteur, lavados e colocados em placas de 24 poços com fundo chato. Cada placa de 96 poços continha 60 esferóides e correspondia a um poço da placa de 24 poços (Figura 7). Os esferóides foram cultivados com o soro, previamente diluído, por 72 horas, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período foram feitas análises de contratilidade a partir da observação dos esferóides em microscópio óptico. O sobrenadante foi separado e armazenado a -70°C até o uso. Os esferóides foram novamente coletados, lavados e submetidos à extração proteica com tampão RIPA (50mM Tris-CL, 150nM NaCl - 0,1% SDS, 1% NP-40 (1mL), 0,5% Deoxicolato, 1mM CaCl₂). Logo depois, as amostras foram sonicadas (QSonica, LLC) por 10 segundos na velocidade 2, e a dosagem de proteína foi feita utilizando o Kit de *BCA Protein Assay Kit* (Pierce).

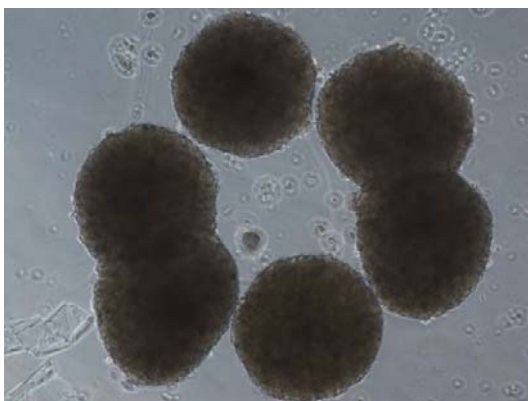


Figura 7 – Agregados de esferóides de cardiomiócitos

Representação de um agregado de esferóides de cardiomiócitos em placas de 24 poços após 72 horas de cultura com soro humano. Imagens obtidas a partir de microscópio de contraste de fase (Olympus). Aumento: 100X

3.12 Western Blot para detecção de proteínas de matriz extracelular

Foram aplicadas 10µg de proteínas em gel descontínuo de poliácridamida a 12%. Procedeu-se com a reação de eletroforese. Em seguida, foi realizada a reação de transferência das amostras do gel para uma membrana de nitrocelulose, utilizando uma cuba apropriada. A reação ocorreu a 100V, 0,10A, por 1 hora. Após esse período, as membranas foram separadas, lavadas com água e, posteriormente, marcadas com corante específico que auxilia na

visualização das bandas, demonstrando que a transferência foi bem sucedida. Após lavagem das membranas para retirada do corante, foi feito o bloqueio de ligações inespecíficas utilizando solução de bloqueio, contendo TBST (Tris 50mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,1%) e 5% de leite em pó desnatado (Molico). Os anticorpos primários α -murinos para MMP-2 (Sigma), MMP-9 (Sigma), TIMPs (1-4, Sigma) e laminina (Sigma) foram incubados com a membrana durante a noite e o bloqueio foi feito apenas por 1h, à 4°C. Já os anticorpos primários α -murinos para Colágeno (Novatec) e Fibronectina (Sigma) foram incubados com a membrana por 2hs e o bloqueio foi durante a noite a 4°C. Foi utilizado, ainda, um controle endógeno com o anticorpo primário GAHPDH (Sigma), que também foi incubado na presença da membrana por 2hs. Os anticorpos primários específicos para MMP-2, MMP-9 e laminina (diluição de 1:1.000), colágeno I e fibronectina (diluição 1:5.000), TIMP-1, TIMP-2 TIMP-3 e TIMP-4 (diluição 1:500) foram diluídos em solução de bloqueio. Foram utilizados anticorpos secundários anti-IgG *mouse* (PIERCE Thermo Scientific) e anti-IgG *rabbit* (PIERCE Thermo Scientific) na diluição 1:10.000, e os mesmos foram incubados com as membranas por 1 hora, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob constante agitação. A revelação da peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o kit Super Signal West Pro (Piere Biotechnology) e filmes de raio-X (Figura 8). Após fixação e revelação, os filmes foram escaneados e as bandas quantificadas com auxílio do programa Quantity One.

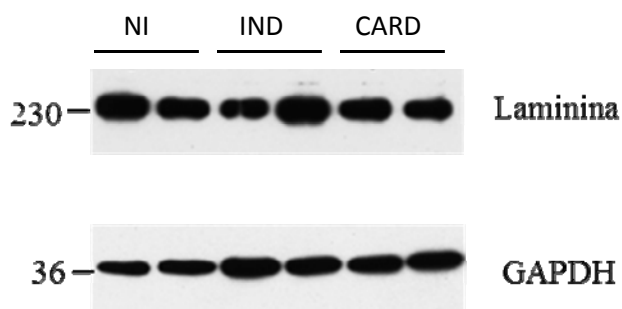


Figura 8 – Imagem do resultado de western blot após revelação em filme de raio-X. Representação de um filme de raio-X correspondente ao western Blot da proteína laminina e do controle endógeno GAPDH, com pesos moleculares de 230Kb e 36Kb, respectivamente. As bandas correspondem à expressão da laminina e de GAPDH por esferóides estimulados com soro de indivíduos não infectados (NI) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND) e cardíaca (CARD) da doença de Chagas.

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir do teste não paramétrico Kruskal Wallis seguido de Dunn's, com o objetivo de detectar diferenças entre os grupos de pacientes, e do teste de Wilcoxon, no intuito de realizar análises pareadas, verificando diferenças entre culturas estimuladas ou não com antígenos do parasito. O nível de significância definido foi de $p < 0,05$ e todas as análises foram realizadas utilizando o Software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA).

Para as análises de correlação foi empregado o teste de Spearman's (rS) Rank (dados não paramétricos) ou de Pearson (dados paramétricos), sendo as análises realizadas utilizando o Software JUMP 5.1 (SAS Institute). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Para as análises dos dados de polimorfismo foi utilizado o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS versão 12.0. IBM corporation, USA), onde foram feitos testes de associação genotípica e alélica univariada. Foi realizado o teste do Qui-quadrado (X^2) para a comparação das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos de estudados. A análise de distribuição genotípica foi realizada em tabela de contingência 3x2 enquanto a distribuição alélica e dos genótipos +/- em tabela 2x2. O Odds Ratio (OR) foi calculado considerando-se um intervalo de confiança de 95%. Foram consideradas significativas as comparações em que $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1 Avaliação das metaloproteinases 2 e 9 e dos inibidores teciduais de metaloproteinases 1 e 2 em amostras de soro de indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas

As MMPs 2 e 9 são proteínas solúveis e, por isso, podem ser encontradas no soro. São secretadas em sua forma latente, sendo necessária uma ativação extracelular. Dessa forma, no soro podem ser encontradas MMPs ativas e inativas (Amălinei et al., 2007; Rydlova et al., 2008). A dosagem dos TIMPs 1 e 2 foi feita através da técnica de Luminex (Millipore's MILLIPLEX™) e a dosagem das MMPs 2 e 9 foi feita através dos ensaios de Milliplex e zimografia, como descrito na metodologia. O kit Milliplex detecta, além das MMPs, complexos MMP-TIMP e produtos da degradação dessas enzimas. Por outro lado, a zimografia detecta os níveis das enzimas em sua forma intacta e, devido à presença do SDS, não permite a visualização de complexos MMP-TIMP. Os resultados da zimografia não indicam atividade enzimática, apenas um potencial de atividade proteolítica, e complementam os resultados de milliplex (Opdenakker et al., 2001b; Vandooren et al., 2013).

4.1.1 Avaliação dos níveis séricos das MMPs 2 e 9 determinados por Milliplex

Os resultados do milliplex mostraram que no grupo CARD os níveis séricos da MMP-2 foram significativamente maiores em relação aos grupos IND e NI (Figura 9A). Em relação à MMP-9, as amostras de soro dos pacientes do grupo CARD apresentaram níveis significativamente maiores da enzima em relação ao grupo NI (Figura 9B). Além da comparação entre os grupos, outra estratégia de análise foi a comparação entre as proteínas. Para essa comparação foram realizados o cálculo de razão e a análise de correlação. A razão entre as duas MMPs mostrou que, em todos os grupos, a expressão de MMP-9, apesar de aparentemente maior quando comparada à expressão da MMP-2, não foi estatisticamente diferente (Figura 9C). Já a análise de correlação mostrou que no grupo IND a correlação entre MMP-2 e MMP-9 foi negativa e significativa, entretanto não foram observadas correlações significativas nos grupos NI e CARD (Figura 9D).

A análise dos níveis de TIMP-1 não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos estudados (Figura 10A). Por outro lado, os níveis séricos de TIMP-2 foram significativamente maiores no grupo CARD em relação aos grupos IND e NI (Figura 10B). A comparação entre os dois inibidores mostrou que a razão entre TIMP-1 e TIMP-2 foi

estatisticamente significativa entre os grupos NI e CARD, comprovando que os níveis de TIMP-1 são maiores que os níveis de TIMP-2 nas amostras estudadas (Figura 10C). Correlação positiva e significativa foi observada entre TIMP-1 e TIMP-2 em todos os grupos estudados (Figura 10D).

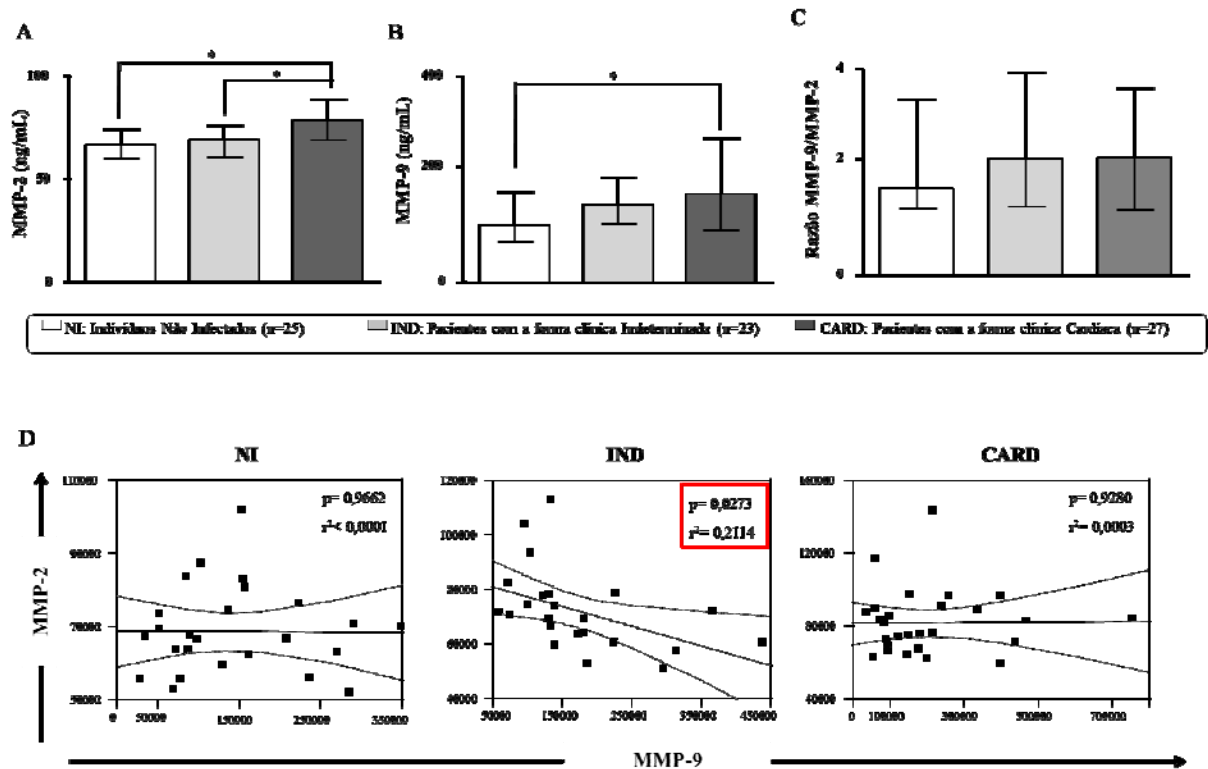


FIGURA 9 – Análise dos níveis séricos das MMPs 2 e 9 dosados por Milliplex.

Os níveis séricos da MMP-2 (A) e da MMP-9 (B) foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, através da tecnologia do luminex. Os valores são expressos em ng/mL e os resultados expressos como mediana com intervalo interquartil. As figuras C e D representam as análises de razão e de correlação respectivamente. As diferenças estatísticas estão representadas por linha conectoras e pelo símbolo “*” e destacadas pelo quadrado vermelho nos gráficos de correlação.

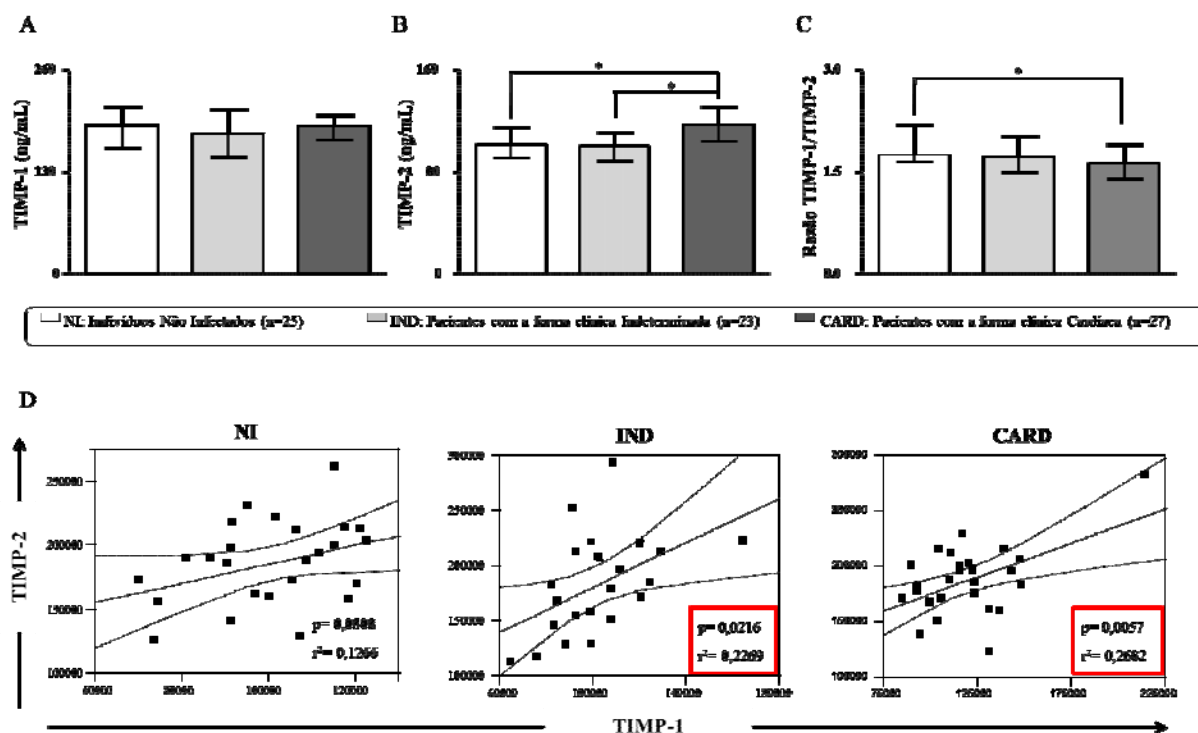


FIGURA 10 – Análise dos níveis séricos dos TIMPs 1 e 2.

Os níveis séricos do TIMP-1 (A) e do TIMP-2 (B) foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os valores são expressos em ng/mL e os resultados expressos como mediana com intervalo interquartil. As figuras C e D representam as análises de razão e de correlação respectivamente. As diferenças estatísticas estão representadas por linha conectoras e pelo símbolo “*” e destacadas pelo quadrado vermelho nos gráficos de correlação.

Na tentativa de verificar qual a relação entre os níveis séricos de MMPs e os TIMPs, realizamos análises de correlação. A análise de correlação entre MMP-2 e TIMP-1 mostrou correlação positiva e significativa apenas no grupo CARD (Figura 11A). Por outro lado, a correlação entre os níveis séricos de MMP-9 e TIMP-1 foi negativa e significativa nos grupos IND e CARD (Figura 11B). A correlação entre MMP-2 e TIMP-2 foi positiva e estatisticamente significativa nos grupos NI, IND e CARD (Figura 11C) e entre os níveis de MMP-9 e TIMP-2 a correlação foi positiva e significativa apenas no grupo NI (Figura 11D).

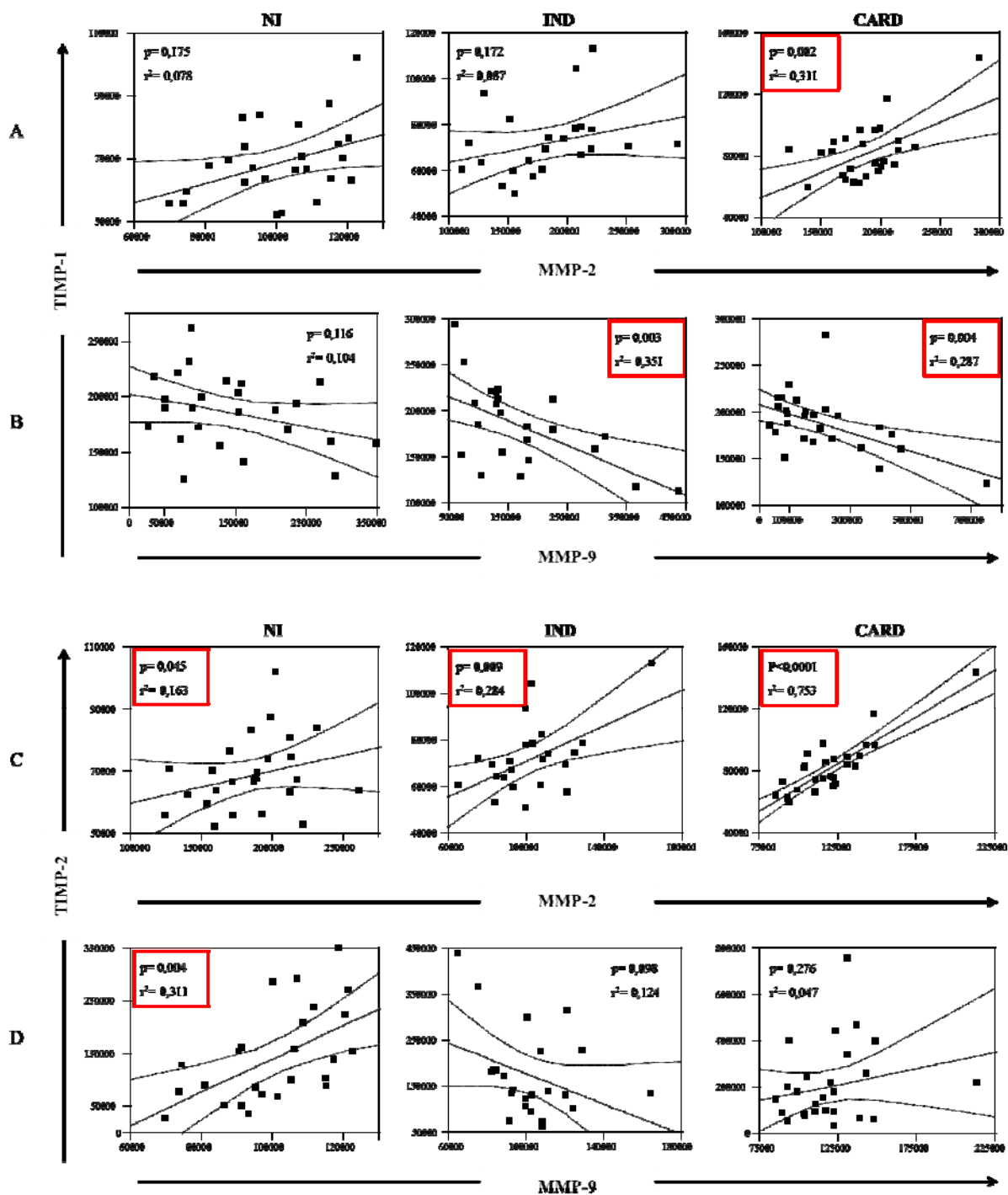


FIGURA 11 – Correlação entre os níveis séricos das MMPs 2 e 9 e os níveis séricos dos TIMPs 1 e 2, dosados por Milliplex.

Os níveis das MMPs e dos TIMPs foram avaliados em amostras de indivíduos NI (n=25) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=23) e cardíaca (CARD, n=27) da doença de Chagas, utilizando a tecnologia do Luminex. A significância das correlações foi dada para $p < 0,05$, como destacado pelos quadrados vermelhos. A e B - Gráficos de correlação entre os níveis séricos de TIMP-1 e os níveis séricos de MMP-2 e MMP-9. C e D - Gráficos de correlação entre os níveis séricos de TIMP-2 e os níveis séricos de MMP-2 e MMP-9.

4.1.2 Avaliação dos níveis séricos das MMPs 2 e 9 determinados por zimografia

Após análise dos níveis de MMP-2 por zimografia, os resultados não revelaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos IND e CARD (Figura 12A). A análise foi feita apenas entre esses dois grupos, pois no grupo NI a MMP-2 não foi detectada através da zimografia. A análise dos dados mostrou, ainda, aumento significativo dos níveis da MMP-9 em amostras de soro de pacientes portadores da forma clínica CARD, em relação ao grupo IND. Além disso, os níveis da MMP-9 em amostras de soro do grupo IND foi menor em relação ao grupo NI (Figura 12B). Foi realizada, ainda, a análise da razão entre MMP-9 e MMP-2, que mostrou que os níveis da MMP-9 são maiores que os níveis da MMP-2, em todos os grupos. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Figura 12C). A análise de correlação entre os níveis séricos dessas proteínas, detectados por zimografia, foi realizada e mostrou que tanto no grupo IND quanto no grupo CARD a correlação é positiva e significativa (Figura 12D)

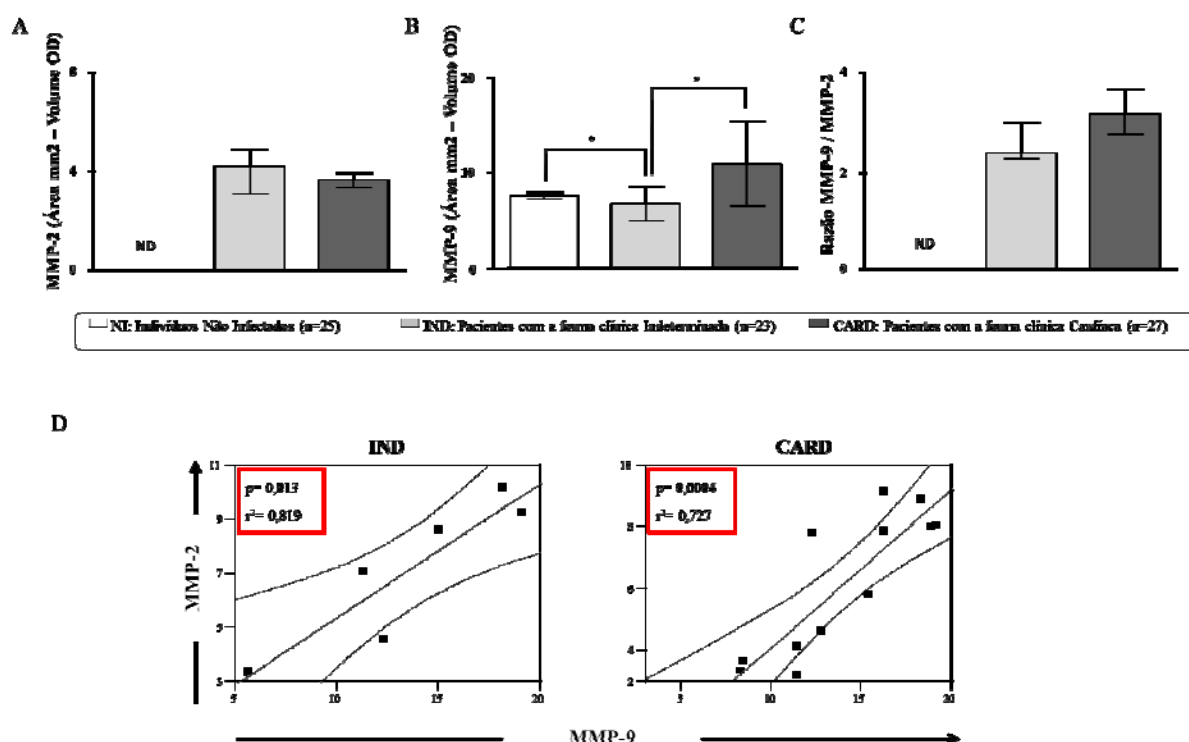


FIGURA 12 – Análise da atividade enzimática das MMPs 2 e 9 em amostras de soro.

A atividade enzimática da MMP-2 (A) e da MMP-9 (B) foi avaliada em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os valores foram obtidos a partir da subtração dos valores da área (mm²), da banda selecionada, pelo volume (OD), como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como mediana com intervalo interquartil. As figuras C e D representam as análises de razão e de correlação respectivamente. As diferenças estatísticas estão representadas por linha conectoras e pelo símbolo “*” e destacadas pelo quadrado vermelho nos gráficos de correlação.

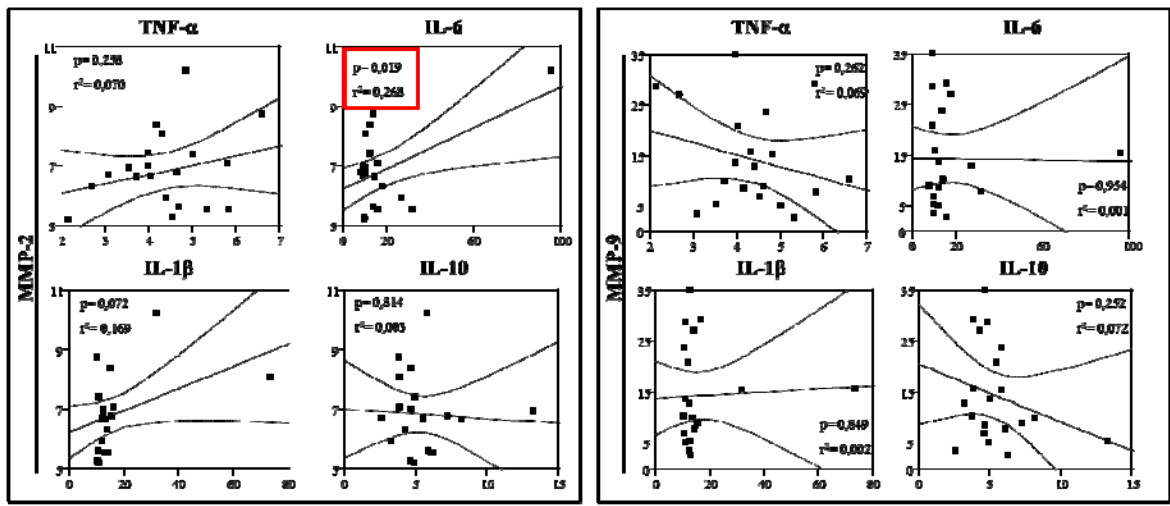
4.2 Correlação entre os níveis de citocinas e os níveis séricos e atividade enzimática das metaloproteinases 2 e 9

As citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e, seguramente, estão envolvidas tanto na resistência a infecção quanto nos mecanismos relacionados à evolução da doença de Chagas. Um balanço entre citocinas inflamatórias e reguladoras representa elemento chave no estabelecimento das distintas formas clínicas da doença de Chagas. De fato, o desequilíbrio entre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias tem sido apontado como um dos fatores determinantes na morbidade da doença (Gomes et al., 2003, 2005; Vitelli-Avelar et al., 2006; Magalhães et al., 2013).

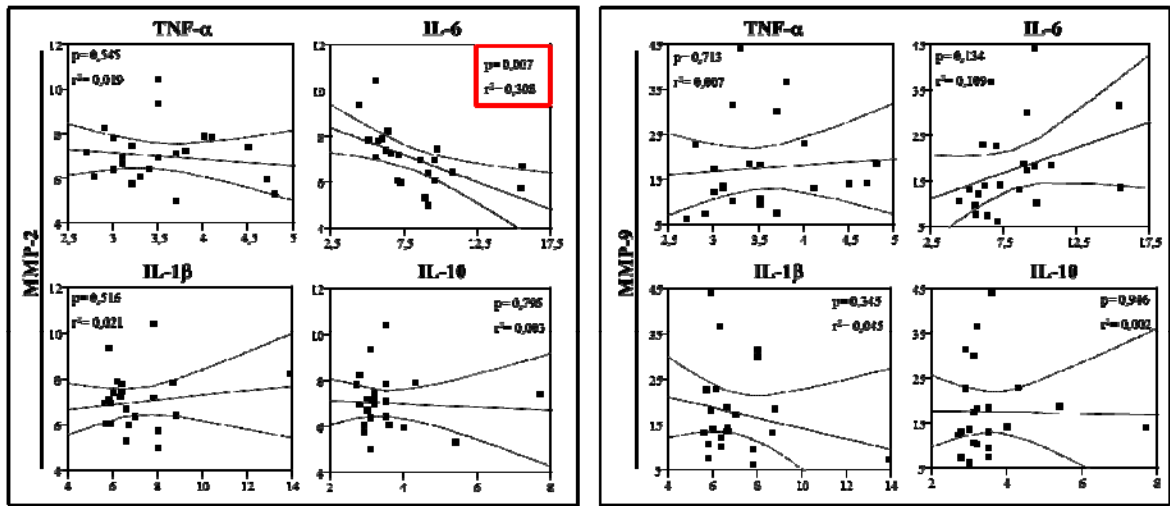
As citocinas também estão envolvidas na ativação das MMPs (Lockwood et al., 2008; Deschamps & Spinale, 2006). Para avaliarmos se havia diferença no balanço e na possível relação entre estes fatores, estudamos a correlação entre os níveis séricos das citocinas e os níveis séricos das MMPs 2 e 9 dosados por Milliplex (Figuras 13) assim como dosados por zimografia (Figura 14). Os níveis séricos das citocinas foram mostrados em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa e apontaram predomínio de citocinas anti-inflamatórias nos pacientes IND e de citocinas inflamatórias nos pacientes CARD (Gomes et al., 2003; 2005). Para a análise de correlação foram selecionadas quatro citocinas, sendo três inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e uma anti-inflamatória (IL-10). As citocinas inflamatórias foram selecionadas a partir de artigos científicos que mostraram a importância dessas citocinas para a ativação das MMPs (Lockwood et al., 2008; Deschamps & Spinale, 2006). A citocina IL-10 foi selecionada baseando-se na sua importância para a regulação da inflamação na doença de Chagas, previamente descrita (Gomes et al., 2003, 2005; de Araújo 2007, 2012).

Os resultados, a partir da dosagem por milliplex, mostraram correlação positiva e significativa entre a MMP-2 sérica e IL-6 no grupo NI. Por outro lado, a correlação entre essas duas variáveis foi negativa e significativa no grupo IND. No grupo CARD não foi observada correlação entre MMP-2 sérica e IL-6. As correlações entre MMP-9 sérica e IL-6 não foram significativas. Além disso, não foi observada correlação entre os níveis séricos de MMP-2 e MMP-9 em relação a TNF- α , IL-1 β e IL-10 nos grupos estudados (Figura 13).

NI



IND



CARD

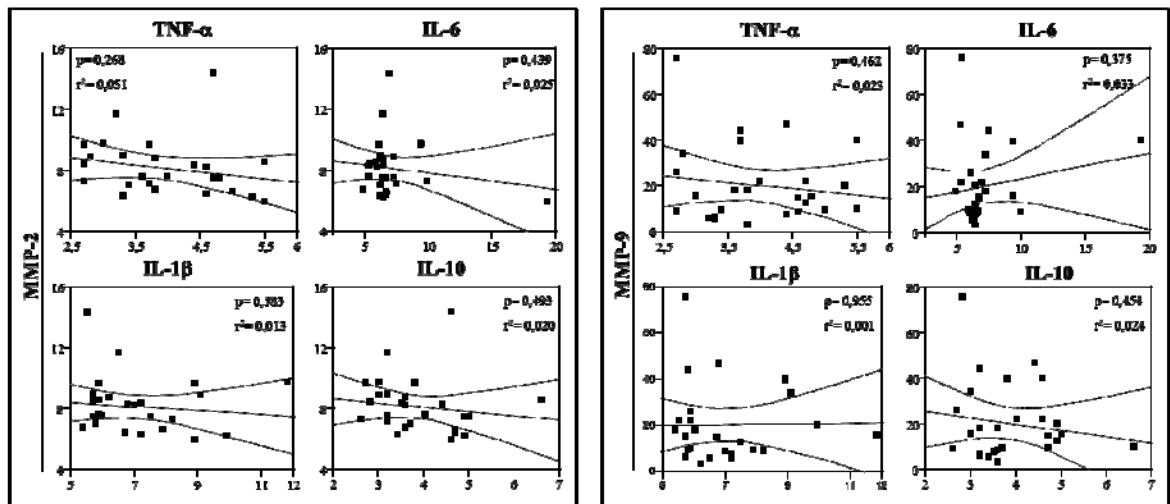


FIGURA 13 – Correlação entre os níveis séricos das citocinas e das MMPs 2 e 9, dosados por Milliplex, de indivíduos não infectados e de pacientes portadores da doença de Chagas

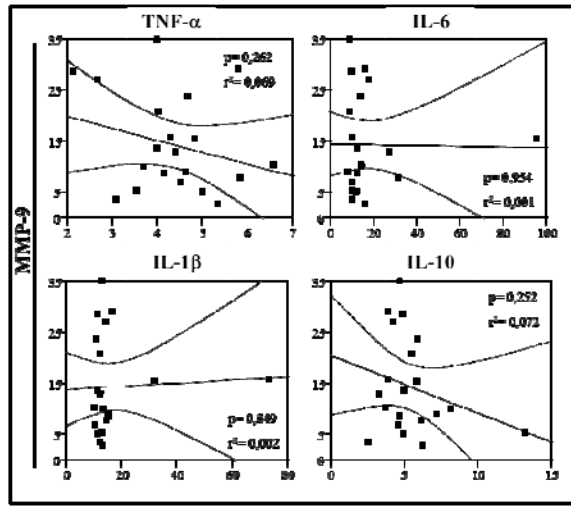
A análise de correlação foi feita como descrito na metodologia. A análise das correlações foi considerada significativa para $p < 0,05$, como destacado pelo quadrado vermelho. Os níveis séricos das citocinas e das MMPs foram dosados em amostras de soro de indivíduos NI ($n=25$) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, $n=23$) e cardíaca (CARD, $n=27$).

A análise das correlações não mostrou muitas diferenças estatísticas entre os vários parâmetros analisados. Entretanto, um ponto importante a ser destacado, principalmente em pacientes portadores da doença de Chagas, é a diferença no perfil entre MMP-2 e MMP-9. As correlações entre as MMPs séricas e TNF- α , bem como IL-1 β e IL-10, não apresentaram grandes diferenças entre os grupos IND e CARD e entre as MMPs. Por outro lado, a correlação entre MMP-2 sérica e IL-6 foi negativa e significativa no grupo IND. Além disso, nos dois grupos, enquanto a correlação entre MMP-2 e IL-6 foi negativa, para MMP-9 essa correlação foi positiva, mas não significativa (Figura 13).

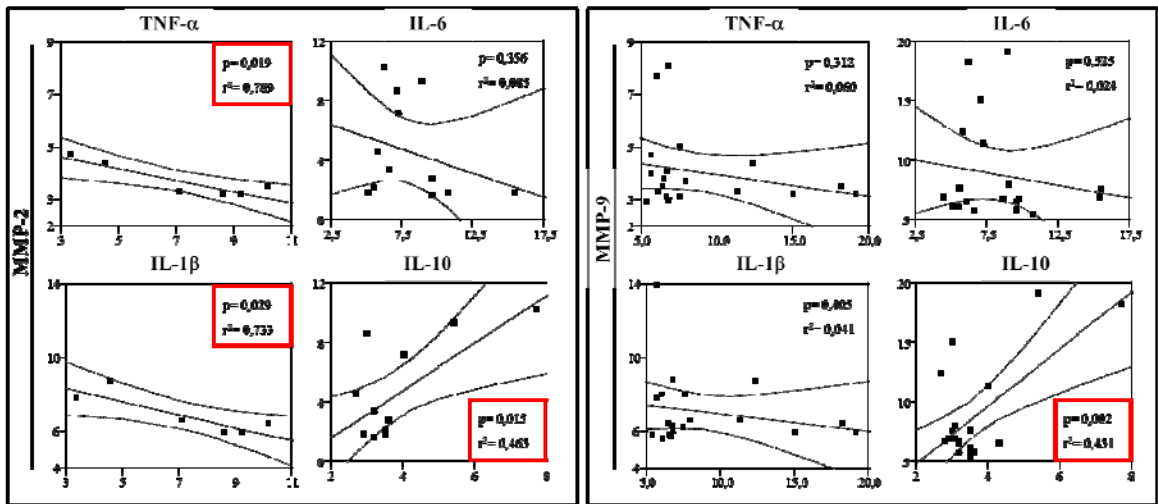
Outra análise realizada foi a correlação entre os níveis séricos das citocinas já mencionadas acima, e os níveis séricos das MMPs dosadas por zimografia. As correlações para MMP-2 não foram mostrados para o grupo NI, pois essa proteína não foi detectada, por essa técnica, nesses indivíduos. Não foram observadas correlações estatisticamente significativas nesse grupo. Para os grupos IND e CARD, foi observado maior número de correlações significativas, principalmente no grupo IND. Observamos correlação significativa apenas para MMP-2 no grupo IND em relação a TNF- α (Figura 14). As correlações com a citocina IL-6 não apresentaram significância estatística. (Figura 14). No grupo IND, a citocina IL-1 β apresentou correlação negativa e significativa com a MMP-2. Já no grupo CARD, a correlação foi positiva e significativa entre IL- β e MMP-9 (Figura 14). Por fim, a citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou correlação positiva e significativa com as MMPs 2 e 9 no grupo IND (Figura 14).

A figura 15 traz um esquema com o resumo dos dados estatisticamente significativos encontrados a partir dessas correlações. Podemos observar claramente que no grupo IND a MMP-2 se correlaciona negativamente com as citocinas inflamatórias e positivamente com a citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, observamos correlação inversa entre os níveis de MMP-2 e MMP-9 nos pacientes do grupo IND. No grupo CARD a MMP-9 também se correlaciona positivamente com IL-10. No entanto, correlação positiva e significativa é, também, observada com a citocina inflamatória IL-1 β .

NI



IND



CARD

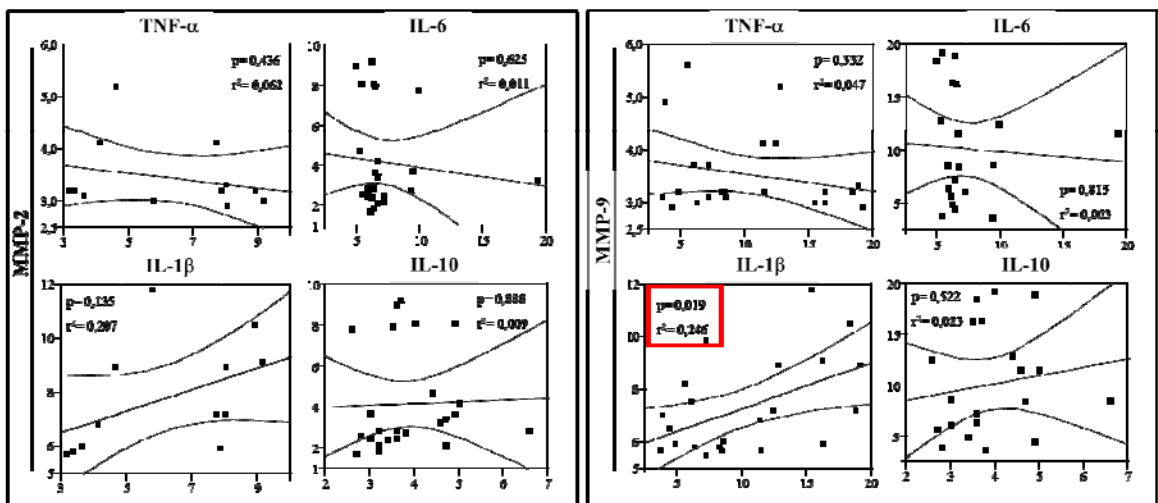


FIGURA 14 – Correlação entre os níveis séricos das citocinas e das MMPs 2 e 9, dosados por zimografia, de indivíduos não infectados e de pacientes portadores da doença de Chagas

A análise de correlação foi feita como descrito na metodologia. A análise das correlações foi considerada significativa para $p < 0,05$. Os níveis séricos das citocinas bem como a atividade enzimática foram dosados em amostras de soro de indivíduos NI ($n=25$) e de pacientes portadores da forma clínica indeterminada (IND, $n=23$) e cardíaca (CARD, $n=27$).

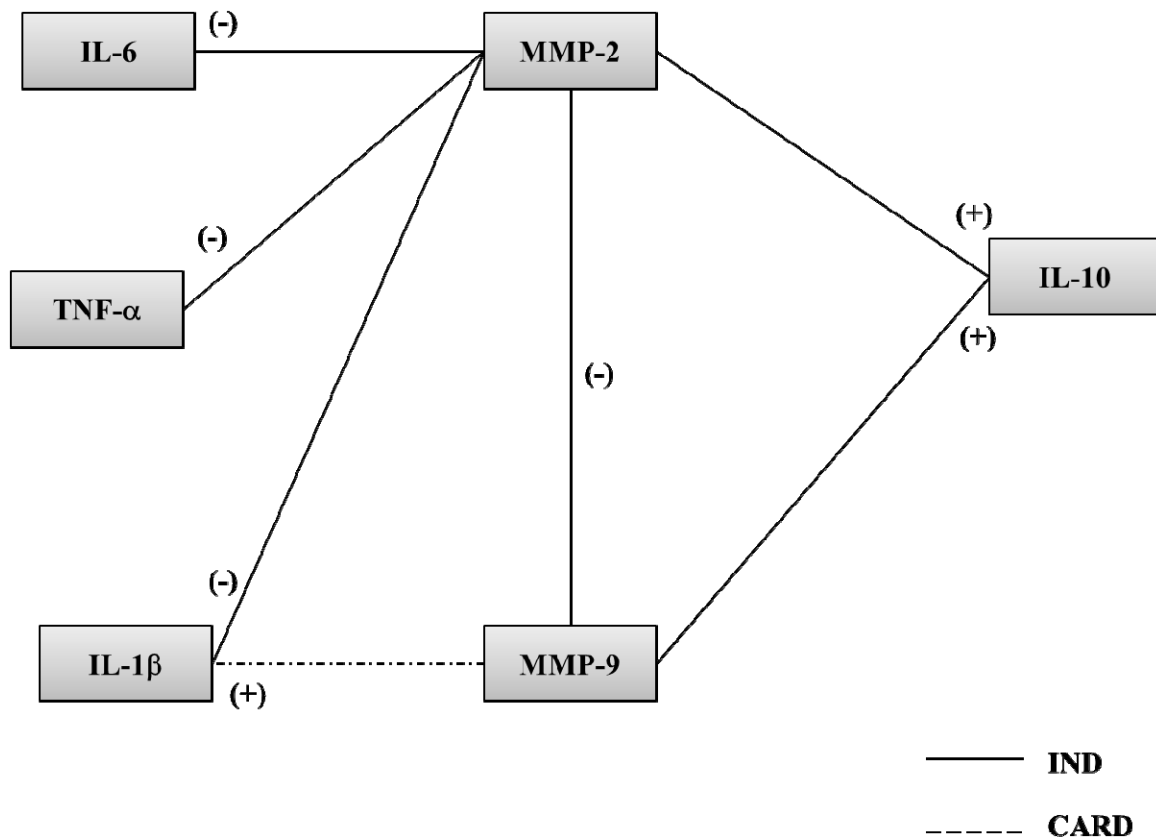


FIGURA 15 – Esquema representativo dos principais resultados obtidos a partir da análise de correlação entre os níveis séricos das citocinas e as MMPs 2 e 9

Esse esquema reúne as principais correlações significativas entre os níveis séricos das citocinas e as MMPs 2 e 9, incluindo-se os níveis séricos dosados pelas duas técnicas, multiplex e zimografia. O objetivo foi resumir o perfil de citocinas encontrado para pacientes portadores da doença de Chagas. A linha contínua representa as correlações encontradas em amostras de pacientes portadores da forma clínica indeterminada (IND) e a linha pontilhada representa as correlações encontradas em amostras de pacientes portadores da forma clínica cardíaca (CARD). A correlação positiva está representada pelo símbolo (+) e a correlação negativa pelo símbolo (-).

4.3 Avaliação da expressão de metaloproteinases 2 e 9 por células do sistema imune (linfócitos e monócitos) do sangue periférico de indivíduos não-infectados e de pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas, antes e após estímulo por antígenos do *T. cruzi*

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença de Chagas e sua morbidade são ainda pouco compreendidos. Acredita-se que estas manifestações são consequência de múltiplos fatores, dentre eles destaca-se a resposta imune. A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas observadas em alguns pacientes (Gomes et al., 2005; Dutra & Gollob, 2008; Sathler-Avelar et al., 2009). Além das citocinas, os leucócitos também estão envolvidos na produção e secreção das MMPs, principalmente MMP-9 (Opdenakker et al., 2001b,c; Brunner et al., 2010; Edsparr et al., 2011).

Considerando-se que monócitos e linfócitos desempenham papel importante na resposta imune desencadeada pelo *T. cruzi* (Gomes et al., 2005, 2012), investigamos a frequência dos níveis intracitoplasmáticos das MMPs 2 e 9 e sua principal fonte celular dentro das células mononucleares.

A expressão das metaloproteinases 2 e 9 foi avaliada intracelularmente em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e em monócitos CD14⁺, no contexto *ex vivo*, na presença e na ausência (cultura controle) de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRIPO).

4.3.1 Avaliação dos níveis intracitoplasmáticos de MMP-2

Após análise dos dados, observou-se maior expressão *ex vivo* de MMP-2 por linfócitos TCD4⁺ de pacientes portadores da doença de Chagas em relação aos indivíduos NI. Entretanto, na cultura controle e após estímulo por TRIPO não observamos diferenças estatisticamente significativas. Não foram observadas diferenças quando comparamos os grupos IND e CARD. Ao comparar a expressão de MMP-2 por LT CD4⁺ na presença e ausência de estímulo, observou-se que no grupo NI a expressão após estímulo foi significativamente maior (Figura 16A).

Os resultados das análises das células T CD8⁺ revelaram maior expressão *ex vivo* de MMP-2 por essas células nos grupos IND e CARD em relação ao grupo NI. Quando em cultura, tanto na ausência quanto na presença de TRIPO, células T CD8⁺ do grupo CARD apresentaram maior expressão de MMP-2 quando comparadas às células CD8⁺ do grupo NI e IND. Além disso, na cultura controle, o grupo CARD apresentou maior percentual de MMP-2

dentro de LT CD8⁺, em relação ao grupo IND. Por fim, LT CD8⁺ do grupo NI na presença de estímulo com TRIPO apresentaram maior expressão de MMP-2 em relação aos LTCD8⁺ na ausência de estímulo (Figura 16B).

A análise da expressão de MMP-2 por monócitos CD14⁺ não mostrou diferenças significativas entre os grupos estudados, tanto no contexto *ex vivo* quanto após cultura. Entretanto, comparando-se a expressão de MMP-2 na cultura controle e após estímulo, monócitos CD14⁺ apresentaram aumento significativo da produção de MMP-2, após estímulo por TRIPO, em todos os grupos estudados (Figura 16C).

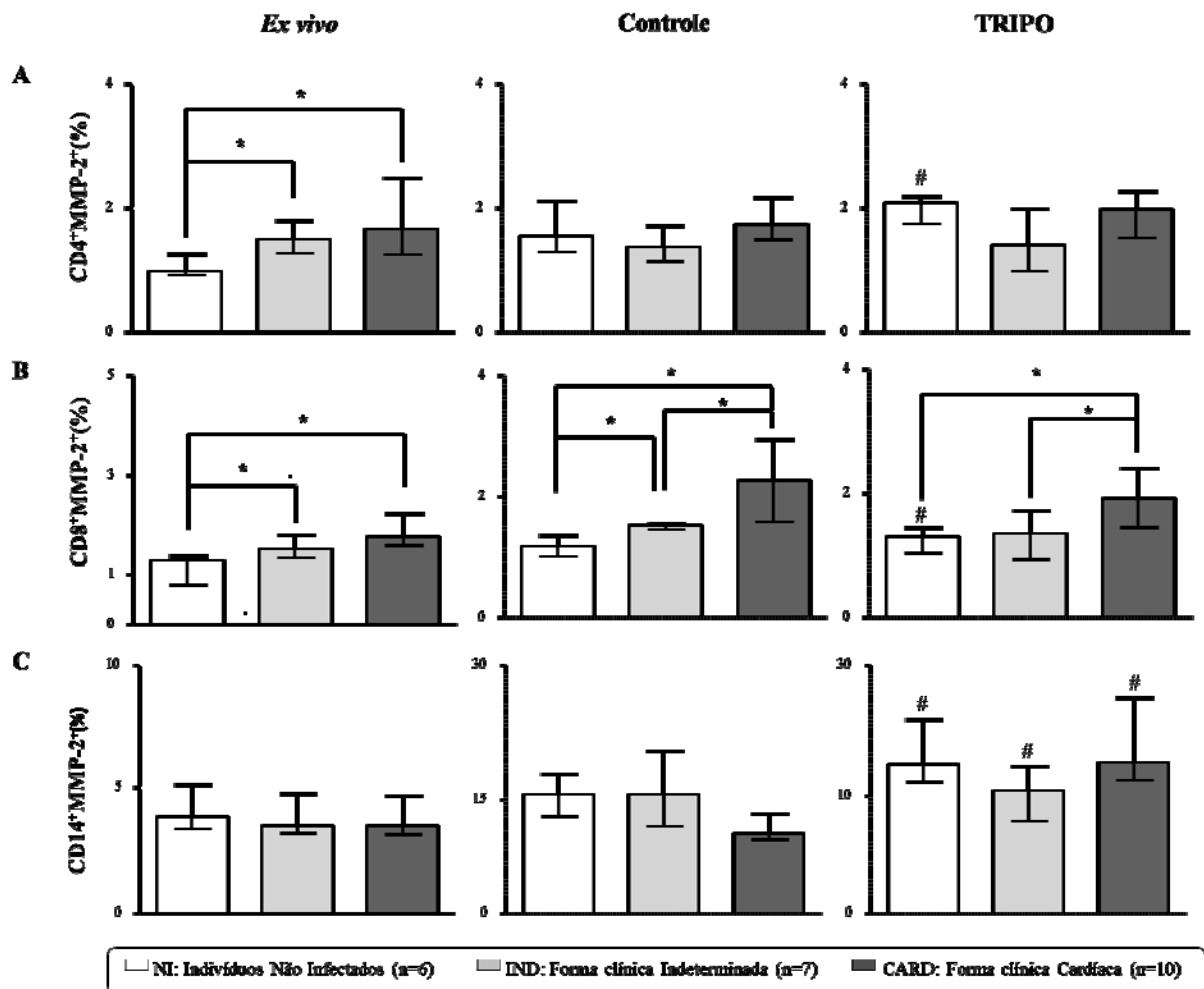


FIGURA 16 – Análise da expressão da metaloproteinase-2 por linfócitos e monócitos.

A expressão das MMP-2 foi avaliada em linfócitos T CD4⁺(A), T CD8⁺ (B) e em monócitos CD14⁺ (C) do sangue periférico de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas. Os valores são expressos em percentual de células positivas. A primeira coluna representa os dados no contexto *ex vivo*, a segunda coluna representa os dados da cultura controle e a terceira coluna representa os dados após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*. As diferenças estatísticas estão representadas por linha conectoras e pelo símbolo “*”. O símbolo “#” significa diferença estatística significativa entre a cultura estimulada com TRIPO e a cultura controle.

4.3.2 Avaliação dos níveis intracitoplasmáticos de MMP-9

A expressão de MMP-9 por LT CD4⁺ foi significativamente maior no grupo CARD em relação ao grupo NI, no contexto *ex vivo*. Na cultura controle não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Após estímulo, a expressão de MMP-9 por linfócitos T CD4⁺ foi maior no grupo NI quando comparada aos grupos IND e CARD. Como observado para MMP-2, no grupo NI, LT CD4⁺ aumentam significativamente a expressão MMP-9 após estímulo com TRIPO em relação às células não estimuladas (Figura 17A).

A expressão de MMP-9 por linfócitos T CD8⁺ foi significativamente maior no grupo CARD em relação ao grupo NI, no contexto *ex vivo*. Novamente, na cultura controle não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Após estímulo por TRIPO, a expressão de MMP-9 por linfócitos T CD8⁺ foi significativamente maior no grupo CARD em relação ao grupo IND. A análise comparativa da expressão antes e após estímulo não mostrou diferenças estatisticamente significativas (Figura 17B).

A análise do percentual de monócitos CD14⁺ expressando MMP-9⁺ mostrou que, no contexto *ex vivo*, esse percentual não se alterou entre os grupos NI, IND e CARD. Por outro lado, os grupos IND e CARD apresentaram percentual de monócitos CD14⁺MMP-9⁺ significativamente maior quando comparado ao percentual de monócitos CD14⁺MMP-9⁺ do grupo NI, na cultura controle e após estímulo com TRIPO. Além disso, após estímulo, a expressão de MMP-9 por monócitos CD14⁺ foi significativamente maior em relação às células não estimuladas em todos os grupos estudados (Figura 17C).

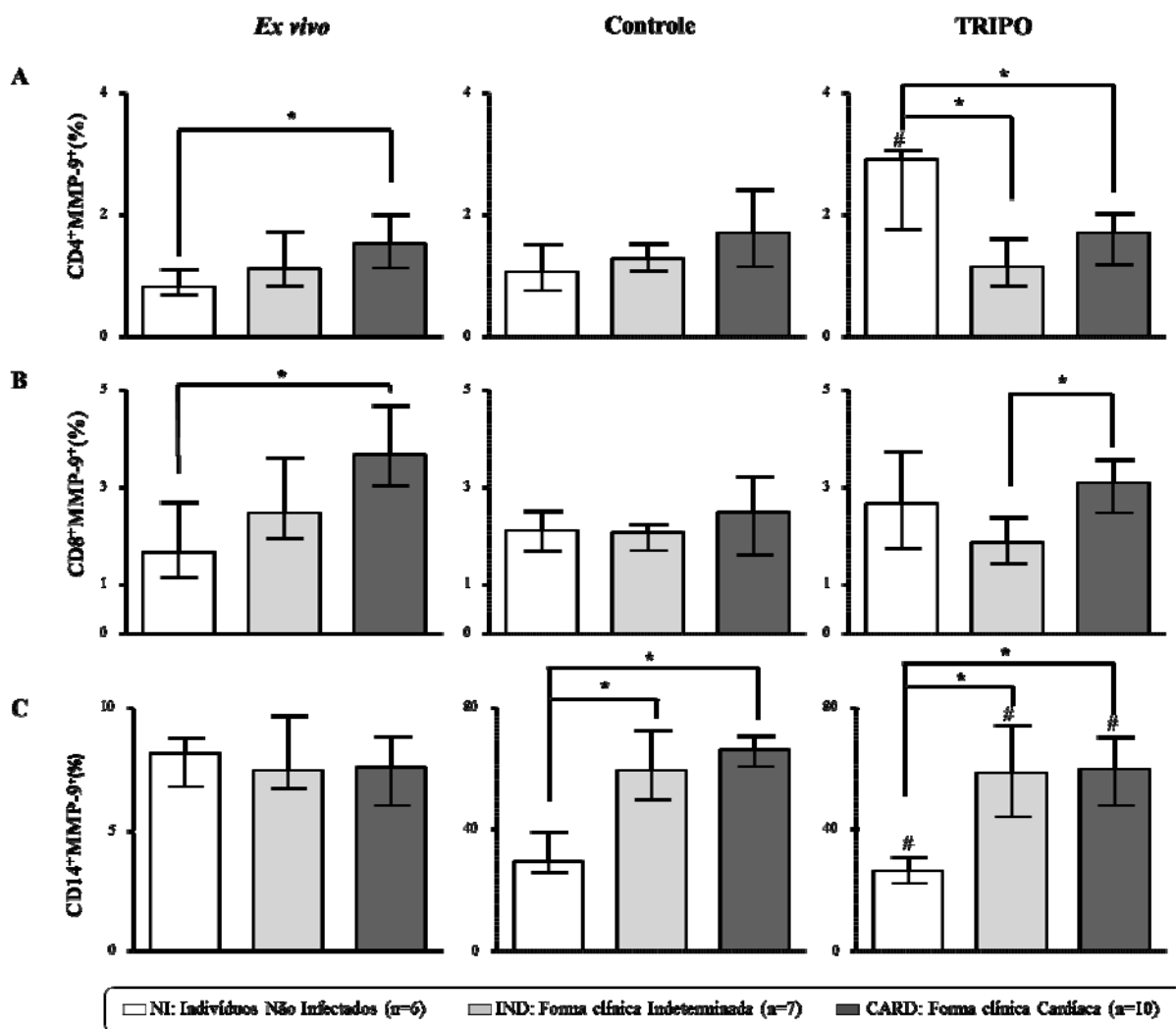


FIGURA 17 – Análise da expressão da metaloproteinase-9 por linfócitos e monócitos.

A expressão das MMP-9 foi avaliada em linfócitos T CD4⁺(A), T CD8⁺ (B) e em monócitos CD14⁺ (C) do sangue periférico de indivíduos NI (n=6) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=7) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas. Os valores são expressos em percentual de células positivas. A primeira coluna representa os dados no contexto *ex vivo*, a segunda coluna representa os dados da cultura controle e a terceira coluna representa os dados após estimulação *in vitro* por antígenos de *T. cruzi*. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”. O símbolo “#” significa diferença estatística significativa entre a cultura estimulada com TRIPO e a cultura controle.

4.3.3 Avaliação da principal fonte celular das MMPs 2 e 9, a partir de leucócitos mononucleares

A partir dos resultados mostrados acima, o próximo questionamento foi qual seria a principal fonte das MMPs, dentro das células mononucleares. Foram feitas análises adicionais para obtenção de evidências a cerca do número de células mononucleares MMP-2⁺ e MMP-9⁺. Nossos dados mostram que a expressão intracelular de MMP-2 foi significativamente maior em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quando comparados aos monócitos CD14⁺, em indivíduos NI. Nos grupos IND e CARD, os linfócitos TCD8⁺ se destacaram como as células que mais expressaram MMP-2, em relação aos linfócitos T CD4⁺ e aos monócitos CD14⁺. Ainda nesses grupos, a expressão intracelular de MMP-2 foi significativamente maior em linfócitos T CD4⁺ quando comparados aos monócitos CD14⁺ (Figura 18A).

A expressão intracelular de MMP-9 não foi diferente entre os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e os monócitos CD14⁺, em indivíduos NI. No grupo IND, a expressão de MMP-9 foi maior em linfócitos TCD8⁺ em relação aos monócitos CD14⁺. Os linfócitos TCD8⁺ também foram as células que mais expressaram MMP-9 no grupo CARD, mas em relação aos linfócitos TCD4⁺ (Figura 18B).

De maneira geral, nossos resultados mostram que em todos os grupos os linfócitos TCD8⁺ são as células que mais expressaram MMP-2. Além disso, em pacientes com doença de Chagas linfócitos TCD8⁺ são a principal fonte de MMP-9 também (Figura 18).

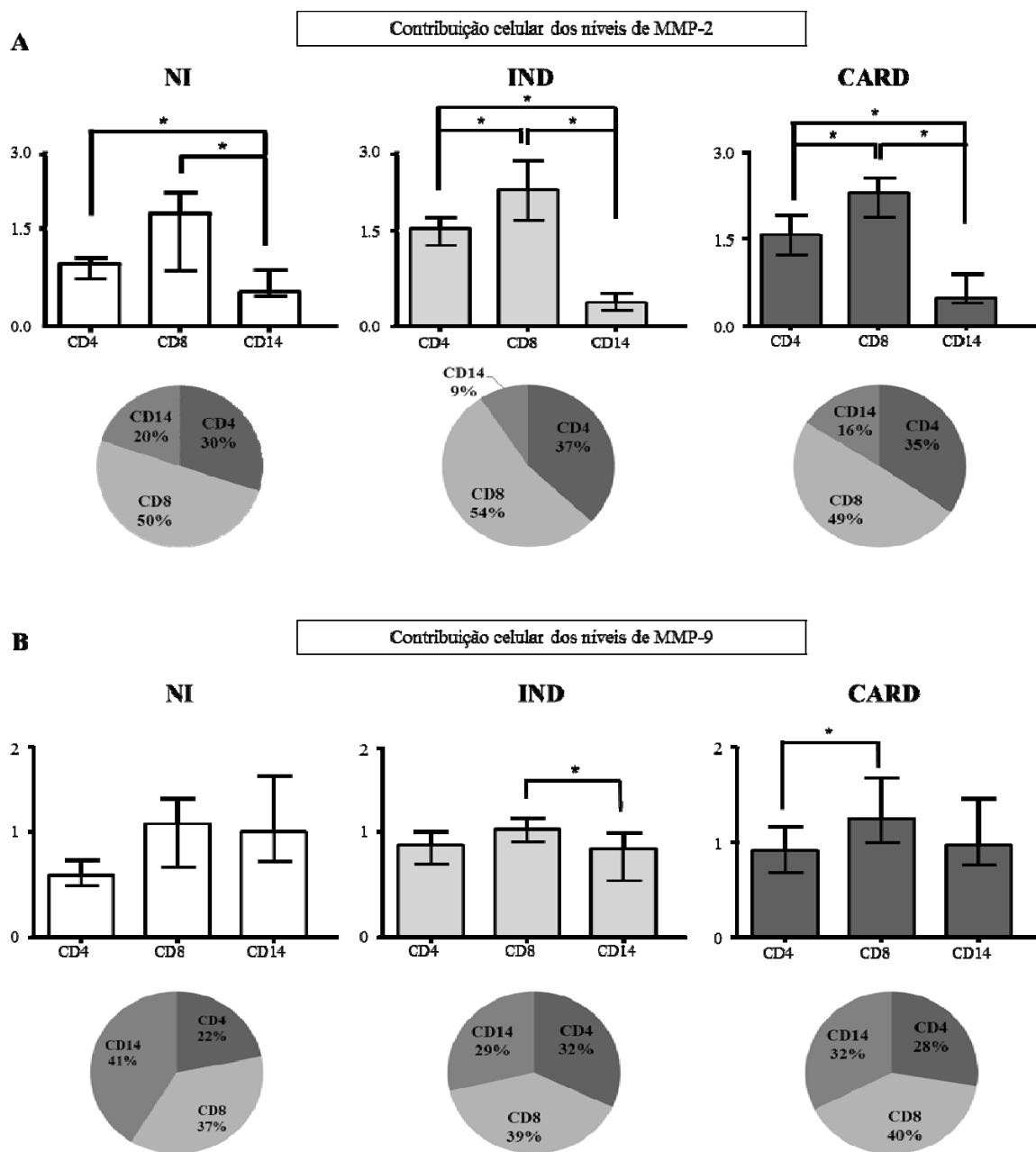


FIGURA 18 – Avaliação da produção de MMP-2 e MMP-9 por células mononucleares do sangue periférico e suas subpopulações.

A análise da principal fonte de MMP-2 (A) e MMP-9 (B) foi realizada a partir da seleção inicial das células mononucleares totais, seguida da avaliação da expressão de MMPs dentro das subpopulações. As subpopulações avaliadas foram monócitos, Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Os dados são expressos como mediana com intervalo interquartil. Os dados também são mostrados em gráficos de pizza que representam a proporção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e monócitos CD14⁺ dentro das células mononucleares produtoras de MMP-2 e MMP-9. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”.

4.4 Avaliação do efeito *in vitro* do soro de indivíduos não infectados e de pacientes portadores de diferentes graus de acometimento cardíaco da doença de Chagas sobre a expressão de proteínas de matriz do microtecido cardíaco, utilizando cultura tridimensional de cardiomiócitos de camundongo

As MMPs estão envolvidas no remodelamento cardíaco a partir da degradação da matriz extracelular (Geurts et al., 2011; Manello & Medda, 2012). Após avaliação do soro e do sangue periférico, em relação às MMPs e seus inibidores, nosso próximo objetivo foi avaliar a expressão de proteínas de matriz na presença do soro de indivíduos não infectados e de pacientes portadores da doença de Chagas, utilizando cultura tridimensional (3D) de cardiomiócitos de camundongos como descrito em materiais e métodos.

O desenvolvimento do modelo de cultivo primário de células musculares cardíacas vem contribuindo para um maior entendimento da patogênese da doença de Chagas (Meirelles et al., 1986; Garzoni et al., 2004). Agregados celulares do tipo esferóide têm sido empregados nos últimos anos para a produção de microtecidos *in vitro*. Neste sistema as células (cardiomiócitos) e a MEC organizam-se em 3D como ocorre no tecido cardíaco *in vitro*. As interações célula-célula e célula-MEC em um sistema 3D são essenciais para mimetizar a resposta observada nos tecidos *in vivo* (Garzoni et al., 2008).

Primeiramente, foi feita a análise da contração dos esferóides após 2 e 72 horas de cultura, com objetivo de detectar diferenças entre os estímulos com soro de indivíduos NI e soro de pacientes portadores da doença de Chagas. Após 2 horas, os esferóides estimulados com soro de pacientes CARD iniciaram redução na contração, porém as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas (Figura 19A). Quando avaliados após 72 horas, os esferóides estimulados com soro de pacientes portadores da doença de Chagas, tanto IND quanto CARD, apresentaram redução significativa nas contrações, em relação aos esferóides estimulados com soro de indivíduos NI (Figura 19B).

O efeito do soro de indivíduos não infectados e de pacientes portadores da doença de Chagas sobre a expressão de proteínas da matriz do microtecido cardíaco também foi avaliado. Em relação à expressão das proteínas de matriz, a análise dos resultados mostrou um aumento significativo da expressão de colágeno tipo I pelas células na presença de soro de pacientes IND e CARD em relação às células na presença de soro de indivíduos NI (Figura 20A). A expressão de fibronectina também foi significativamente maior na cultura com soro de pacientes IND em relação à cultura com soro de indivíduos NI, não sendo observadas diferenças em relação ao grupo CARD (Figura 20B). A expressão de laminina não apresentou

diferenças estatísticas significativas na presença de soro de pacientes portadores da doença de Chagas e de indivíduos NI (Figuras 20C).

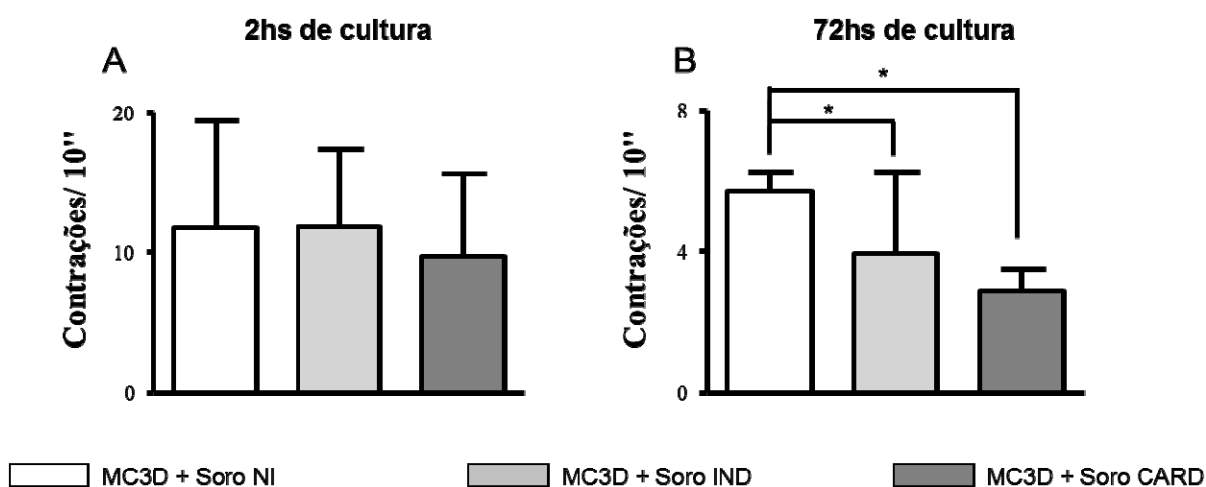


FIGURA 19 – Análise da contração de esferóides estimulados com soro

A partir da observação dos esferóides em microscópio óptico, a contração dos esferóides foi calculada, considerando 10 esferóides em cada poço da placa de 24 poços, sendo no total 4 poços para cada estímulo. As contrações para cada esferóide foram contabilizadas no tempo de 10 segundos. A- Gráfico representativo das contrações dos esferóides após 2hs de cultura com soro. B- Gráfico representativo das contrações dos esferóides após 72hs de cultura com soro. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”. *MC3D – Microtecido cardíaco em cultura 3D*

Os resultados revelaram ainda aumento significativo na expressão da MMP-2 por esferóides estimulados com soro de pacientes IND em relação aos esferóides estimulados com soro de indivíduos NI (Figura 20D). Por outro lado, a expressão da MMP-9 não apresentou diferentes estatísticas entre as culturas avaliadas (Figura 20E). A expressão dos inibidores das MMPs também foi avaliada e os resultados mostraram uma maior expressão de TIMP-1 pelas células estimuladas com soro de pacientes CARD em relação à cultura estimulada com soro de indivíduos NI (Figura 20F). O mesmo aconteceu para a expressão de TIMP-4. Além disso, a expressão de TIMP-4 foi maior na cultura estimulada com soro de indivíduos NI quando comparada as cultura estimuladas com soro de pacientes CARD e indivíduos NI (Figura 20G).

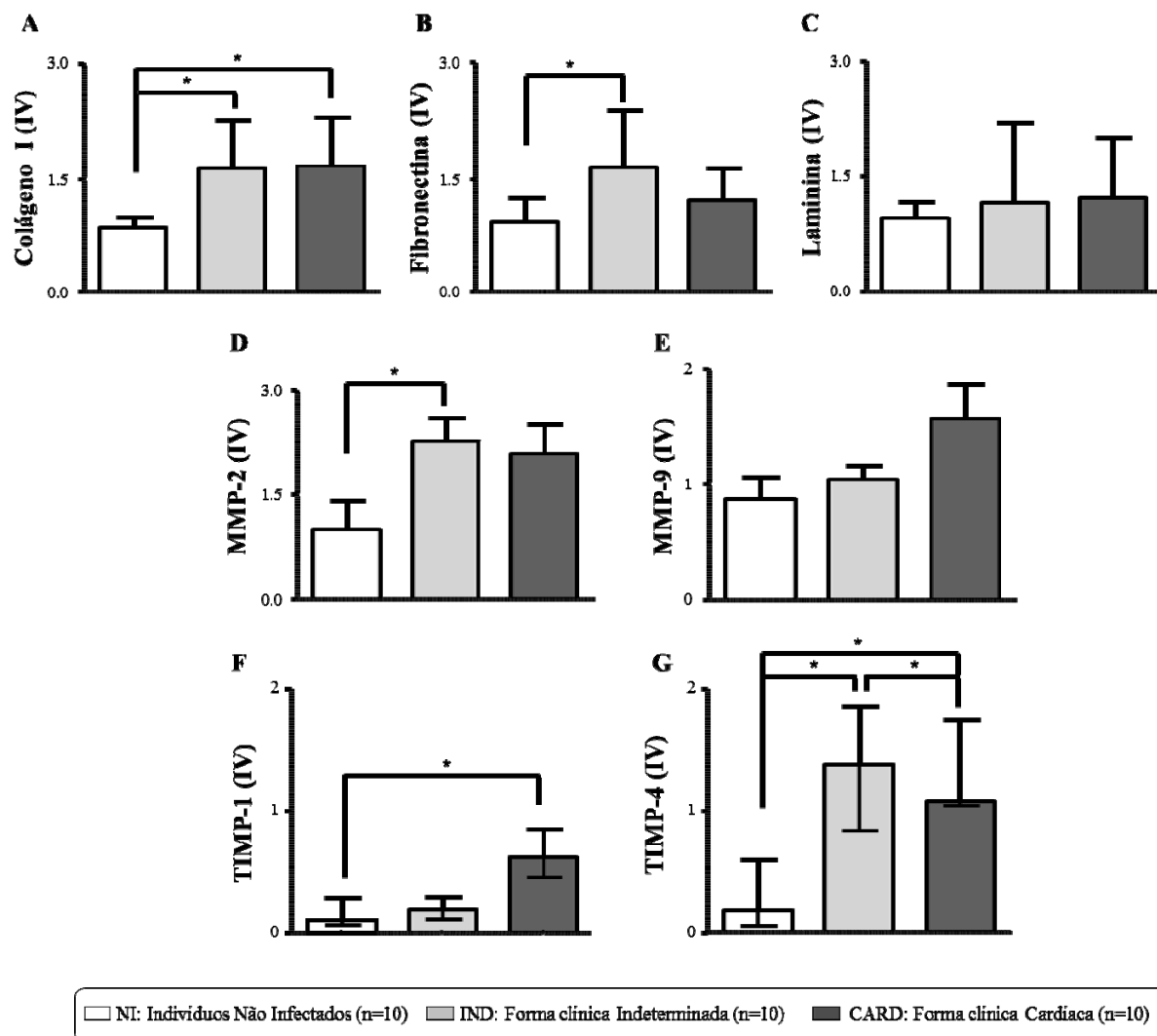


FIGURA 20 – Análise da expressão de proteínas de matriz em microtecido cardíaco

As proteínas de matriz foram avaliadas a partir de proteínas extraídas de microtecido cardíaco na presença de soro de indivíduos NI (n=10) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=10) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. A análise da expressão de colágeno tipo I (A), fibronectina (B), laminina (C), MMP-2 (D), MMP-9 (E), TIMP-1 (F) e TIMP-4 (G) foi realizada pelo índice de variação (IV) da expressão das proteínas em relação ao grupo controle. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”. *MC3D – Microtecido cardíaco em cultura 3D*

Correlacionando os dados da expressão das proteínas de matriz com os dados da expressão de MMPs, observamos que a expressão de MMP-2 possui correlação negativa e significativa com a expressão de laminina em todos os grupos estudados (Figura 21A),

enquanto que a expressão de MMP-9 apresentou correlação positiva, em relação à expressão de laminina em todos os grupos. No entanto, a expressão foi significativa apenas no grupo IND (Figura 21B). Em relação à fibronectina, a expressão de MMP-2 mostrou correlação positiva no grupo NI e correlação negativa nos grupos IND e CARD, sendo esta última estatisticamente significativa (Figura 21C). A expressão de MMP-9 no grupo NI não se correlacionou com a expressão de fibronectina, entretanto, nos grupos IND e CARD essa correlação foi positiva, sendo significativa apenas no grupo CARD (Figura 21D). As análises entre Colágeno e MMPs e TIMPs e MMPs também foram feitas, mas não apresentaram correlação e, por essa razão, não são mostradas.

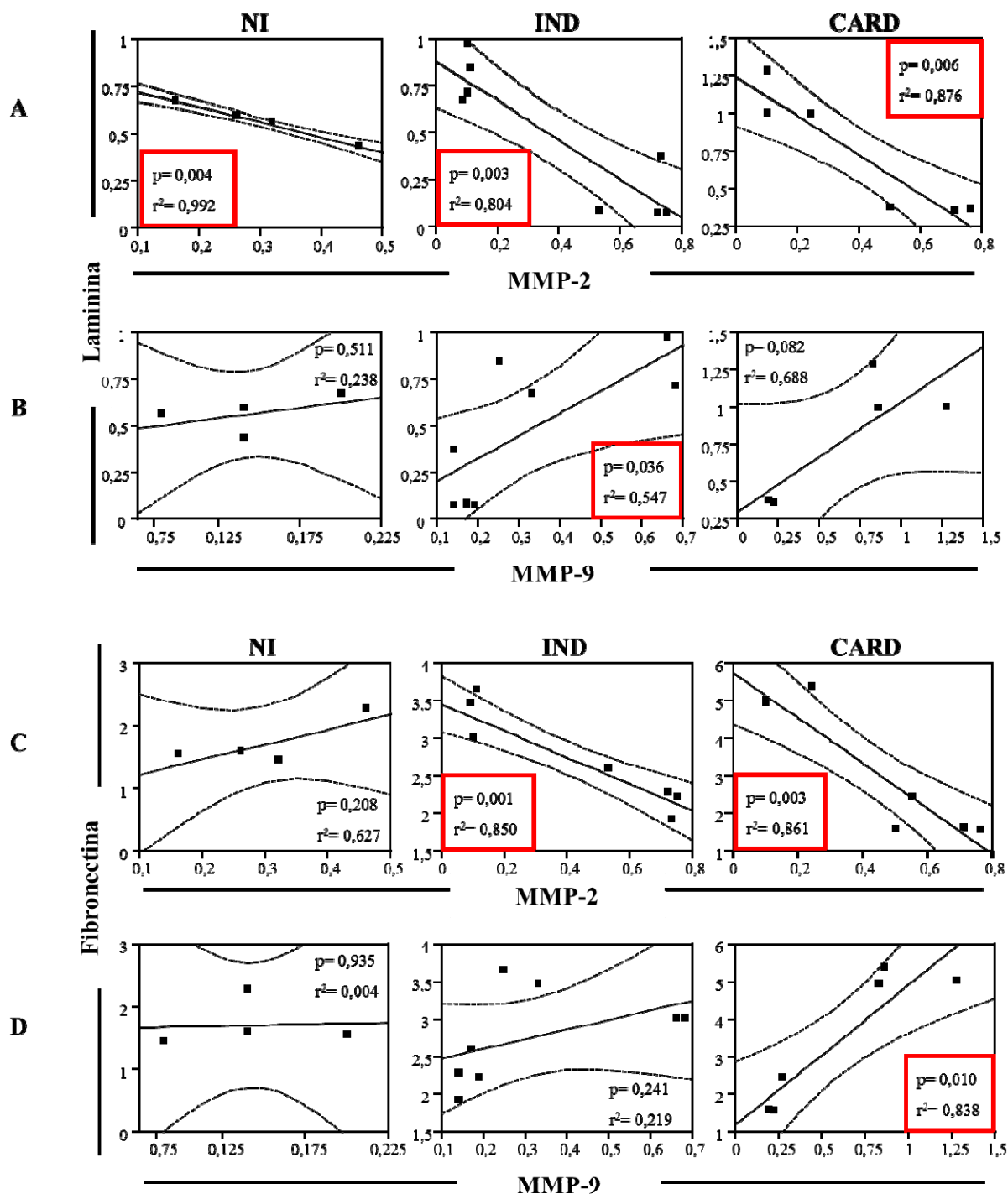


FIGURA 21 – Correlação entre a expressão de MMP-2 e -9 e a expressão de laminina e fibronectina

A análise de correlação foi feita como descrito na metodologia. As correlações foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (destacado pelo quadrado vermelho). A expressão das proteínas foi avaliada em esferóides na presença de soro de indivíduos NI ($n=10$), de pacientes portadores da forma clínica indeterminada (IND, $n=10$) e cardíaca (CARD, $n=10$) da doença de Chagas. A e B- Correlação da expressão de MMP-2 e MMP-9 com a laminina. B e C- Correlação da expressão de MMP-2 e MMP-9 com a fibronectina.

A Figura 22 traz um esquema com o resumo dos dados estatisticamente significativos encontrados a partir das correlações mostradas acima. Podemos observar claramente que a MMP-2 apresenta correlação negativa com fibronectina e laminina, nos grupos IND e CARD, enquanto que a MMP-9 se correlaciona positivamente com essas proteínas.

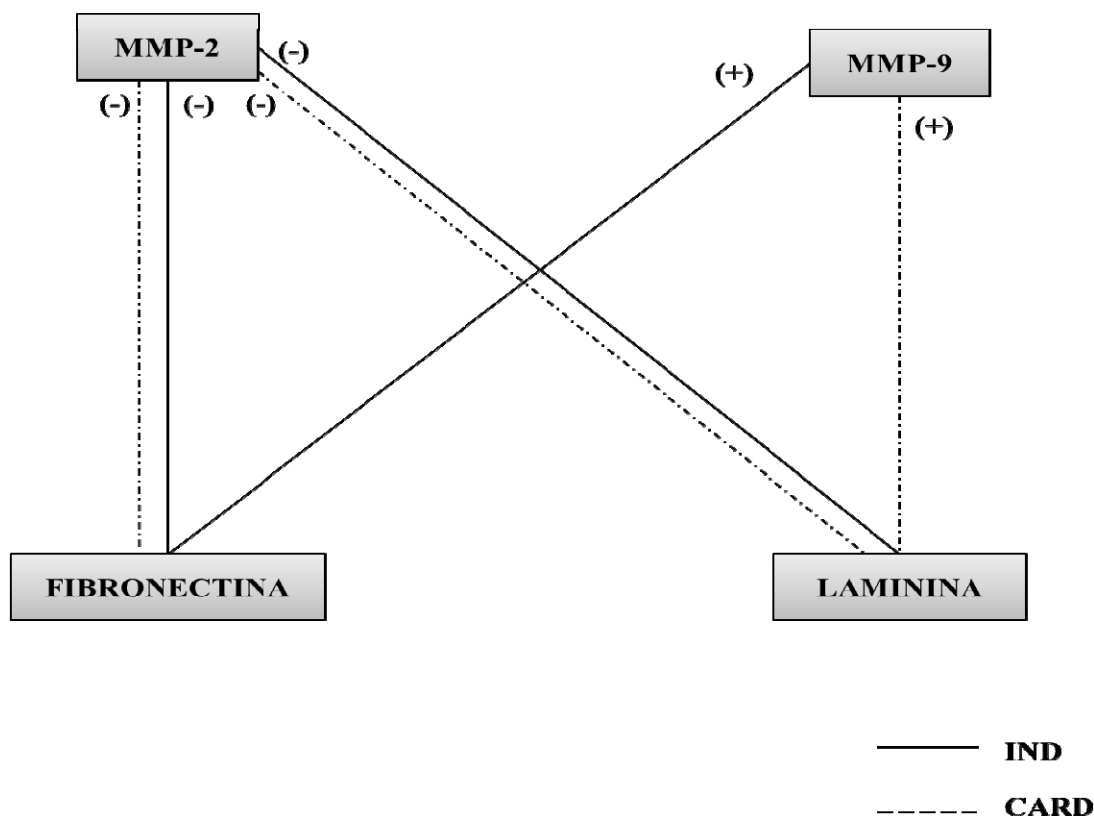


FIGURA 22 – Esquema representativo dos principais resultados obtidos a partir da análise de correlação entre a expressão de proteínas de matriz e as MMPs 2 e 9

Esse esquema reúne as principais correlações estatisticamente significativas entre a expressão de proteínas de matriz e as MMPs 2 e 9. O objetivo foi resumir o perfil encontrado para pacientes portadores da doença de Chagas. A linha contínua representa as correlações encontradas a partir de amostras de soro de pacientes portadores da forma clínica indeterminada (IND) e a linha pontilhada representa as correlações encontradas a partir de amostras de soro de pacientes portadores da forma clínica cardíaca (CARD). A correlação positiva está representada pelo símbolo (+) e a correlação negativa está representada pelo símbolo (-).

4.5 Avaliação da ocorrência de polimorfismo de nucleotídeo único em genes codificadores de membros da família das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e de seu inibidor (TIMP-1)

A partir dos resultados encontrados acima e tendo em vista que a patologia da doença de Chagas pode ser decorrente de fatores genéticos do paciente, nosso próximo passo foi identificar a ocorrência de polimorfismo em genes codificadores das MMP-2 e -9 e do TIMP-1 e avaliar se essas alterações estão associadas a mudanças nos níveis dessas moléculas.

Os tipos mais comuns de polimorfismos são: segmentos repetidos *in tandem* (nucleotídeos de mini e microsátélites), deleções/ inserções/ duplicações de segmentos pequenos ou grandes e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (Chorley et al., 2008). Os SNPs são sítios no genoma onde a sequência de DNA de uma porcentagem de indivíduos da população difere por uma única base (De Nardini, 2009).

A presença do polimorfismo em um determinado gene pode ou não acarretar em alterações funcionais. A maioria dos polimorfismos é encontrada nas regiões não codificadoras dos genes (introns), mas que podem influenciar no padrão de expressão da molécula por constituir regiões de interação com fatores de transcrição. Já os polimorfismos presentes nos éxons e na região promotora afetam diretamente esses padrões. Há cerca de 10 milhões de polimorfismos de nucleotídeo único no genoma humano sendo que cada um poderia representar a chave para entender riscos envolvendo doenças (Bradbury et al., 2004).

Todos os polimorfismos estudados neste trabalho foram avaliados em 146 indivíduos, sendo 52 indivíduos não infectados e 94 pacientes portadores da doença de Chagas, sendo 47 portadores da forma clínica indeterminada e 47 portadores da forma clínica cardíaca, como mostrado na Figura 1.

Inicialmente foi realizada a avaliação das frequências dos genótipos esperada versus observada através do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, que verifica se a variação genética de uma determinada população está preservada. A verificação do equilíbrio de um loco pode ser realizada pela contagem das frequências genotípicas (Ridley, 2006). Primeiro calculam-se as frequências gênicas e em seguida verificam-se as frequências de homozigotos. Se a frequência de homozigotos observada se igualar ao quadrado de suas frequências gênicas, a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Se as frequências não se igualam, a população não está em equilíbrio (Ridley, 2006).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg mostra se as frequências gênicas se mantêm constantes ao longo das gerações, fundamentando-se na hipótese de que na ausência de fatores

evolutivos atuando sobre uma população, as frequências gênicas permaneceriam inalteradas e as proporções genóticas atingiriam um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo (Ridley, 2006).

Considerando-se um nível de significância de 5% e grau de liberdade igual a 1, os valores de X^2 inferiores a 3,84 indicam que a população está em equilíbrio. Os resultados desta análise estão mostrados na tabela 4.

Tabela 4 – Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos estudados

Polimorfismo	X^2	Valor de p
MMP-2 (-1575 G/A)	3,7339	0,0533
MMP-2 (-1306 C/T)	121,334	0,0000
MMP-2 (-735 C/T)	1,1178	0,2904
MMP-9 (-1562 C/T)	69,0804	0,0000
TIMP-1 (+372 C/T)	50,6718	0,0000

De acordo com os dados obtidos, apenas os polimorfismos MMP-2 (-1575 A/G) e MMP-2 (-735 C/T) encontram-se em equilíbrio.

4.5.1 Avaliação do perfil genotípico e alélico

4.5.1.1 Polimorfismo G/A na posição -1575 do gene MMP-2

A genotipagem do polimorfismo no gene MMP-2 (-1575 G/A) nos diferentes grupos de estudo está apresentada na Tabela 5. A comparação entre os três genótipos nos diferentes grupos não apresentou resultados estatisticamente significativos. Em relação à frequência alélica, é possível observar que o alelo ancestral G é mais frequente no grupo NI em relação ao grupo CARD ($p=0,0005$). Entretanto, não foram encontradas diferenças da frequência alélica entre as formas clínicas da doença de Chagas. A análise comparativa da presença (A+) ou ausência (A-) do alelo polimórfico não mostrou diferenças significativas entre os grupos estudados.

Tabela 5 - Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo G/A na posição -1575 do gene MMP-2

	NI	IND	CARD
	n(%)	n(%)	n(%)
GENÓTIPOS			
GG	30 (58%)	20 (43%)	11 (23%)
AG	16 (31%)	19 (40%)	23 (49%)
AA	6 (12%)	8 (17%)	13 (28%)
ALELOS			
G	76 (73%)	59 (63%)	45 (48%)
A	28 (27%)	35 (37%)	49 (52%)
PRESENÇA/ AUSÊNCIA			
G+ (AG/GG)	47 (90%)	39 (83%)	34 (72%)
G- (AA)	5 (10%)	8 (17%)	13 (28%)

4.5.1.2 Polimorfismo C/T na posição -1306 do gene MMP-2

A genotipagem do polimorfismo no gene MMP-2 (-1306 C/T) nos diferentes grupos de estudo está apresentada na Tabela 6. A comparação entre os três genótipos nos diferentes grupos não apresentou resultados estatisticamente significativos. Em relação à frequência alélica foi possível observar que o alelo polimórfico T é mais frequente no grupo CARD em relação ao grupo IND ($p=0,0124$). A análise da presença (T+) /ausência (T-) do alelo polimórfico não mostrou diferenças significativas entre os grupos estudados.

Tabela 6 - Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição -1306 do gene MMP-2

	NI	IND	CARD
	n(%)	n(%)	n(%)
GENÓTIPOS			
CC	45 (87%)	38 (81%)	33 (70%)
TT	6 (12%)	8 (17%)	12 (26%)
CT	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)
ALELOS			
C	91 (87%)	77 (82%)	68 (72%)
T	13 (13%)	17 (18%)	26 (28%)
PRESENÇA/ AUSÊNCIA			
T+ (CT/TT)	7 (13%)	9 (19%)	14 (30%)
T- (CC)	45 (87%)	38 (81%)	33 (67%)

4.5.1.3 Polimorfismo C/T na posição -735 do gene MMP-2

A genotipagem do polimorfismo no gene MMP-2 (-735 C/T) nos diferentes grupos de estudo está apresentada na Tabela 7. A comparação entre os três genótipos e da frequência alélica nos diferentes grupos não revelou resultados estatisticamente significativos. É possível observar que, de maneira geral, o alelo polimórfico T é menos frequente em relação ao alelo C, porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados.

Tabela 7 - Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição -735 do gene MMP-2

	NI	IND	CARD
	n(%)	n(%)	n(%)
GENÓTIPOS			
CC	44 (85%)	39 (83%)	34 (72%)
TT	1 (2%)	0 (0%)	2 (4%)
CT	7 (13%)	8 (17%)	11 (23%)
ALELOS			
C	95 (91%)	86 (91%)	79 (84%)
T	9 (9%)	8 (9%)	15 (16%)
PRESENÇA/ AUSÊNCIA			
T+ (CT/TT)	8 (17%)	8 (17%)	13 (28%)
T- (CC)	44 (85%)	39 (83%)	34 (72%)

4.5.1.4 Polimorfismo C/T na posição -1562 do gene MMP-9

A genotipagem do polimorfismo no gene MMP-9 (-1562 C/T) nos diferentes grupos de estudo está apresentada na Tabela 8. A análise do polimorfismo mostrou frequências genotípicas bem distintas entre os grupos estudados, sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI e CARD ($p=0,029$) e entre os grupos IND e CARD ($p=0,032$). Os valores das frequências genotípicas revelaram que o genótipo CT é mais predominante no grupo CARD, onde apenas 6% das amostras desse grupo apresentaram genótipo TT. Já os grupos NI e IND apresentaram percentuais maiores do genótipo TT, 27% e 21%, respectivamente. As frequências alélicas não foram estatisticamente diferentes entre os grupos estudados. O genótipo CC não foi encontrado nas amostras estudadas, isto é, o alelo polimórfico T está presente em 100% das amostras e, por essa razão, não foi possível efetuar a análise estatística em relação à presença ou ausência do alelo T.

Tabela 8 - Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição -1562 do gene MMP-9

	NI	IND	CARD
	n(%)	n(%)	n(%)
GENÓTIPOS			
CC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
TT	14 (27%)	10 (21%)	3 (6%)
CT	38 (73%)	37 (79%)	44 (94%)
ALELOS			
C	38 (36%)	37 (39%)	44 (47%)
T	66 (64%)	57 (61%)	50 (53%)
PRESENÇA/ AUSÊNCIA			
T+ (CT/TT)	52 (100%)	47 (100%)	47 (100%)
T- (CC)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

4.5.1.5 Polimorfismo C/T na posição +372 do gene TIMP-1

A genotipagem do polimorfismo no gene TIMP-1 (+372 C/T) nos diferentes grupos de estudo estão apresentadas nas Tabelas 9, 10 e 11. O gene TIMP-1 é localizado no cromossomo X e, por essa razão, a análise foi feita agrupando os pacientes por gênero. Vale ressaltar que apenas os indivíduos do sexo feminino apresentam genótipos heterozigotos para esse gene, logo, para pacientes do gênero masculino a única análise realizada foi em relação à presença ou ausência do alelo polimórfico T. A Tabela 9 mostra os dados das análises de frequência fenotípica e alélica dos pacientes do sexo feminino, a Tabela 10 traz os dados dos pacientes do sexo masculino e a Tabela 11 mostra os dados de presença ou ausência, dos indivíduos quando agrupados.

Entre os pacientes do sexo feminino, não foram encontradas diferenças estatísticas nas frequências genotípicas e alélicas avaliadas (Tabela 9). No grupo de pacientes do sexo masculino a diferença encontrada foi entre os grupos NI e CARD ($p=0,010$), em relação à presença ou ausência do alelo polimórfico T, apontando maior frequência do alelo polimórfico T no grupo NI. Entre os demais grupos nenhuma diferença estatística foi observada (Tabela 10).

A análise do polimorfismo em ambos os gêneros mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos IND e CARD em relação à presença do alelo polimórfico T. A presença do alelo T foi significativamente maior no grupo CARD quando comparado ao grupo IND ($p=0,006$; $OR=3,314$), mostrando, ainda, que pacientes que apresentam o alelo T tem 3 vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca da doença de Chagas (Tabela 11).

Tabela 9 - Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição +372 do gene TIMP-1 de pacientes do sexo feminino

	NI n(%)	IND n(%)	CARD n(%)
GENÓTIPOS			
CC	12 (33%)	9 (31%)	12 (48%)
TT	18 (50%)	17 (59%)	11 (44%)
CT	6 (17%)	3 (10%)	2 (8%)
ALELOS			
C	30 (42%)	21 (36%)	26 (52%)
T	42 (58%)	37 (64%)	24 (48%)
PRESENÇA/ AUSÊNCIA			
T+ (CT/TT)	24 (67%)	20 (69%)	13 (52%)
T- (CC)	12 (33%)	9 (31%)	12 (48%)

Tabela 10 - Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição +372 do gene TIMP-1 de pacientes do sexo masculino

	NI n(%)	IND n(%)	CARD n(%)
PRESENÇA/ AUSÊNCIA			
T+ (CT)	12 (92%)	9 (90%)	5 (83%)
T- (CC)	1 (8%)	1 (10%)	1 (17%)

Tabela 11 - Avaliação do perfil genotípico e alélico do polimorfismo C/T na posição +372 do gene TIMP-1 em pacientes dos gêneros feminino e masculino

	NI n(%)	IND n(%)	CARD n(%)
PRESENÇA/ AUSÊNCIA			
T+ (CT/TT)	32 (62%)	22 (47%)	35 (74%)
T- (CC)	20 (38%)	25 (53%)	12 (26%)

4.5.2- Análise entre os níveis séricos de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 e a distribuição dos genótipos e alelos dos respectivos genes.

Para verificar se os dados genotípicos podem influenciar os níveis séricos das MMPs 2 e 9 e do TIMP-1 analisamos essas variáveis em relação aos genótipos e alelos apresentados pelos indivíduos estudados. Com essa análise, pode-se verificar também se a presença ou ausência do alelo polimórfico pode influenciar os níveis séricos das MMPs 2 e 9 e do TIMP-1 nos indivíduos estudados.

4.5.2.1-Análise dos níveis séricos da MMP-2 de indivíduos NI e portadores da doença de Chagas de acordo com as frequências genotípicas referentes aos polimorfismos -1575 G/A; -1306 C/T e -735 C/T.

O alelo ancestral (G) referente ao polimorfismo -1575 G/A da MMP-2 tem sido associado à maior produção da MMP-2 e, portanto, a presença do alelo polimórfico (A) leva a redução dos níveis de MMP-2 (Hua et al., 2009; Mossbock et al., 2010). A análise dos níveis séricos de MMP-2 em relação a frequência genotípica não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os níveis séricos da MMP-2 para os genótipos homocigotos GG e AA. Por outro lado, indivíduos NI que possuem o genótipo heterocigoto GA apresentam menores níveis séricos de MMP-2 em relação aos pacientes CARD portadores do mesmo genótipo ($p=0,0378$) (Figura 23).

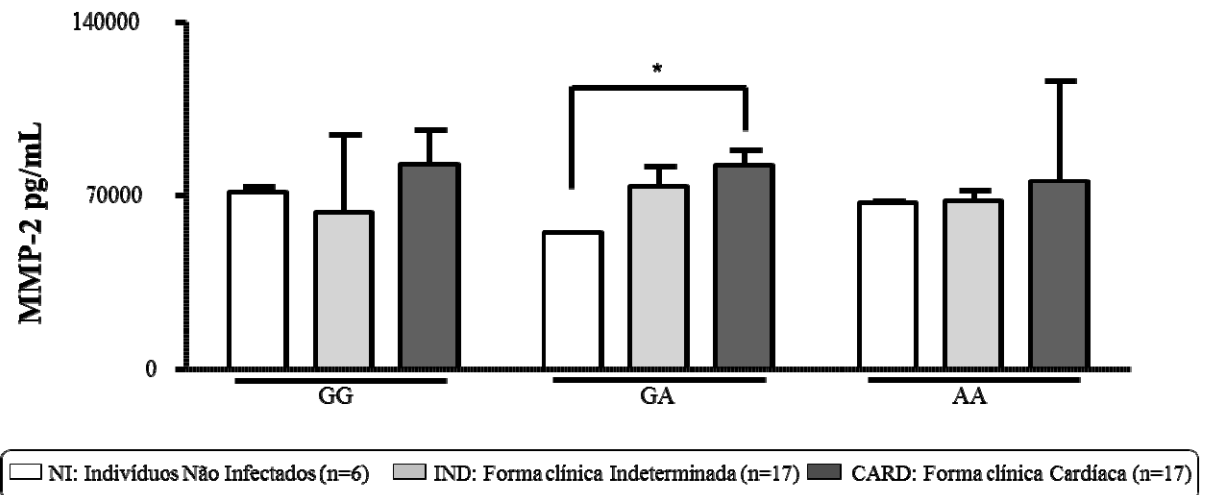


FIGURA 23 – Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com as frequências genóticas referentes ao polimorfismo -1575 A/G.

Os níveis séricos da MMP-2 e o polimorfismo foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como mediana com intervalo interquartil. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”.

Dados da literatura demonstram que a presença do alelo polimórfico T, referente ao polimorfismo -1306 C/T da MMP-2, está associada à redução da transcrição de MMP-2 (Beeghly-Fadiel et al., 2009; Mossbock et al., 2010). Nossos resultados mostram que indivíduos portadores do genótipo homocigoto CC da forma clínica CARD apresentam maiores níveis séricos de MMP-2 quando comparado aos indivíduos NI portadores do mesmo genótipo ($p=0,007$). É importante salientar que o genótipo heterocigoto CT não foi detectado em amostras de indivíduos NI e de pacientes IND usadas para dosar os níveis séricos da MMP-2, e, por essa razão, não foi possível realizar a análise estatística para esse genótipo. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas nos níveis séricos da MMP-2 para o genótipo TT (Figura 24).

Com relação ao polimorfismo -735 C/T, relatos da literatura demonstram que a presença do alelo polimórfico T está associada à menor produção da MMP-2 (Beeghly-Fadiel et al., 2009; Hua et al., 2009). Em nossas análises não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis séricos de MMP-2 para o genótipo homocigoto CC. Em

contrapartida, pacientes CARD que possuem o genótipo heterozigoto CT apresentam maiores níveis séricos de MMP-2 em relação aos pacientes IND portadores do mesmo genótipo ($p=0,0238$). O genótipo homozigoto TT não foi detectado em amostras de indivíduos NI e de pacientes IND usadas para dosar os níveis séricos da MMP-2, e, por essa razão, não foi possível realizar a análise estatística para esse genótipo (Figura 25).

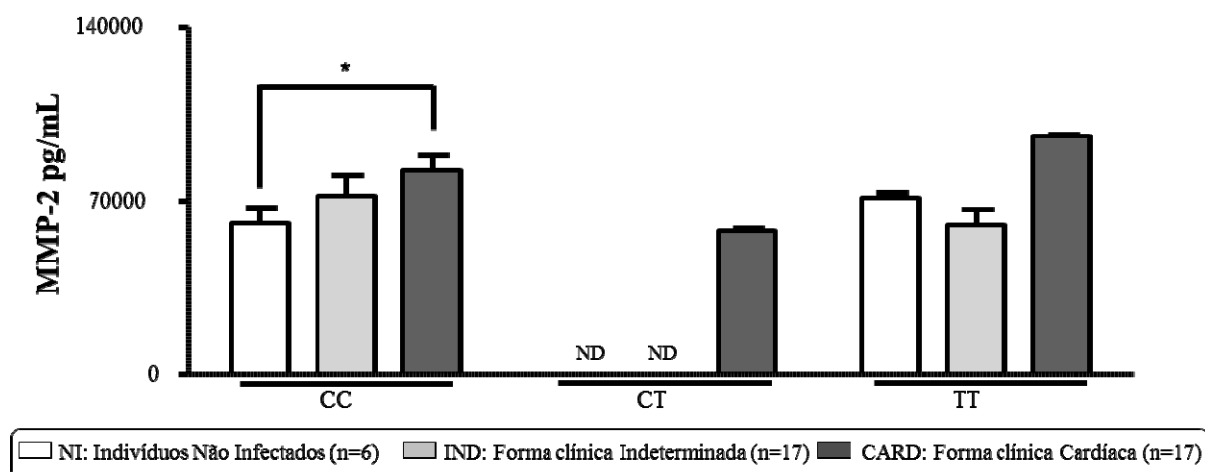


FIGURA 24 – Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com as frequências genóticas referentes ao polimorfismo -1306 C/T.

Os níveis séricos da MMP-2 e o polimorfismo foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como mediana com intervalo interquartil. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”. A sigla ND significa frequência genotípica não detectada.

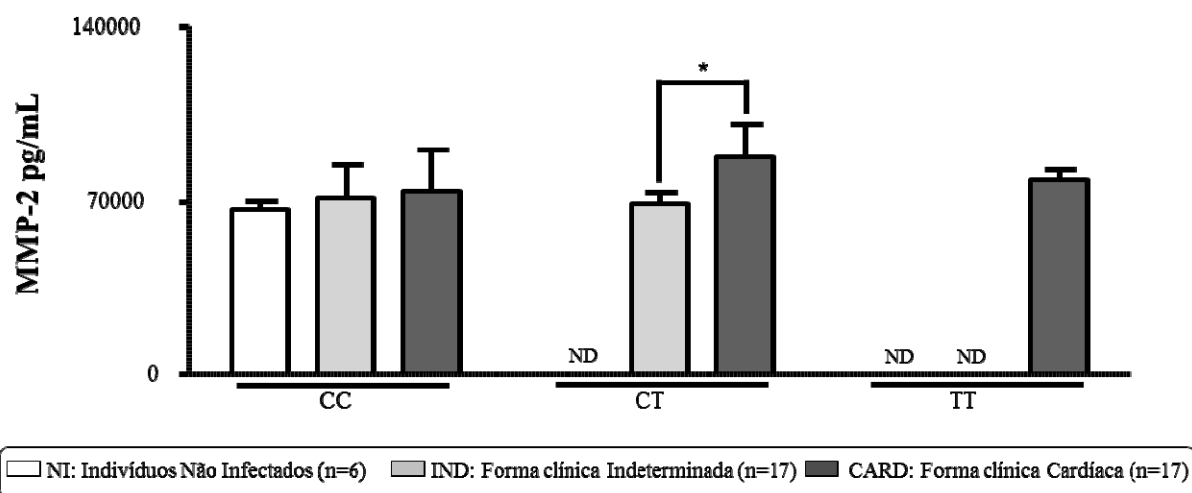


FIGURA 25 – Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com as frequências genotípicas referentes ao polimorfismo -735 C/T.

Os níveis séricos da MMP-2 e o polimorfismo foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como mediana com intervalo interquartil. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”. A sigla ND significa frequência genotípica não detectada.

4.5.2.2-Análise dos níveis séricos da MMP-9 de indivíduos NI e portadores da doença de Chagas de acordo com as frequências genotípicas referentes ao polimorfismo -1562 C/T.

O alelo polimórfico T referente ao polimorfismo -1562 C/T da MMP-9 está associado ao aumento da expressão da enzima (Ye, 2006; Blankenberg et al., 2003). Como já mostrado em análises anteriores, o genótipo homocigoto CC não foi encontrado na análise do polimorfismo da MMP-9. Para os outros genótipos, a análise dos dados mostrou que pacientes IND e pacientes CARD que possuem o genótipo homocigoto CC apresentam maiores níveis séricos de MMP-9 quando comparados com os indivíduos NI portadores do mesmo genótipo ($p=0,0047$ e $p=0,0152$, respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis séricos de MMP-9 para o genótipo homocigoto TT. Além disso, o genótipo homocigoto TT não foi detectado em amostras de indivíduos CARD utilizadas para dosar os níveis séricos da MMP-9 (Figura 26).

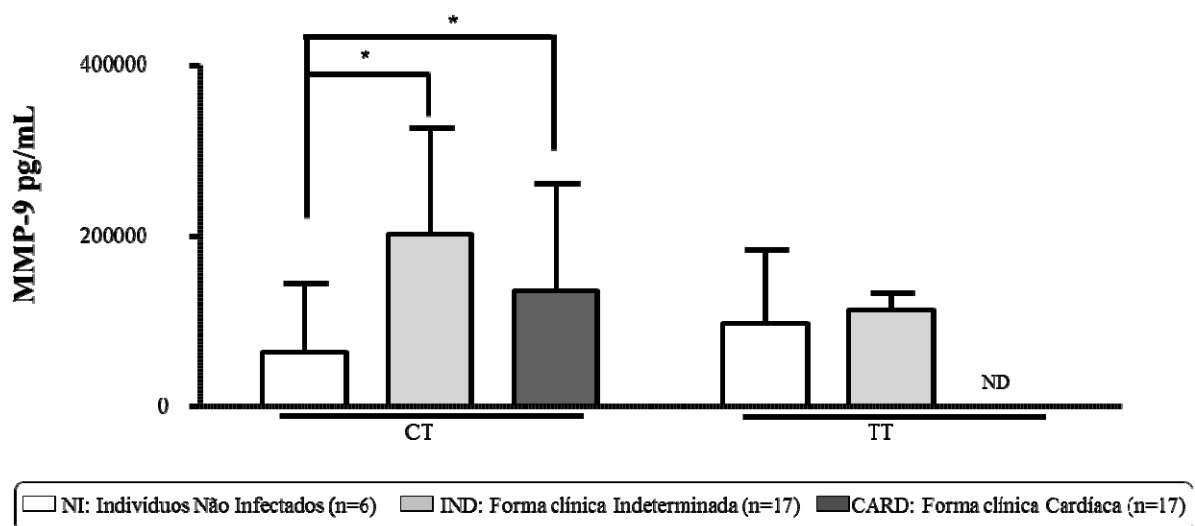


FIGURA 26 – Análise dos níveis séricos da MMP-9 de acordo com as frequências genotípicas referentes ao polimorfismo -1562 C/T.

Os níveis séricos da MMP-9 e o polimorfismo foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como mediana com intervalo interquartil. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”. A sigla ND significa frequência genotípica não detectada.

4.5.2.3-Análise dos níveis séricos da TIMP-1 de indivíduos NI e portadores da doença de Chagas de acordo com as frequências genotípicas referentes ao polimorfismo +372 C/T.

Após análise dos dados não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis séricos de TIMP-1 e os genótipos CC, CT e TT, em todos os grupos estudados (Figura 27).

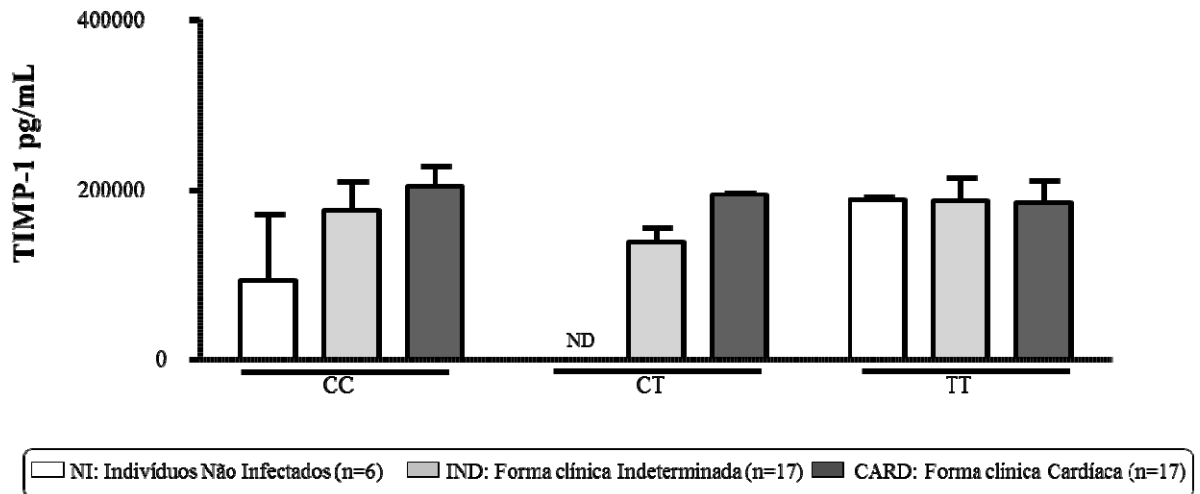


FIGURA 27 – Análise dos níveis séricos da TIMP-1 de acordo com as frequências genóticas referentes ao polimorfismo +372 C/T.

Os níveis séricos do TIMP-1 e o polimorfismo foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como mediana com intervalo interquartil. A sigla ND significa frequência genotípica não detectada.

4.5.3- Análise entre os níveis séricos de MMP-2 e TIMP-1 e a presença ou ausência do alelo polimórfico.

4.5.3.1-Análise dos níveis séricos da MMP-2 de indivíduos NI e portadores da doença de Chagas de acordo com a presença ou ausência dos alelos polimórficos referentes aos polimorfismos -1575 G/A; -1306 C/T e -735 C/T.

Para o polimorfismo -1575 G/A, os resultados demonstraram que os pacientes CARD que possuem o alelo polimórfico A+ apresentam maiores níveis séricos de MMP-2 quando comparados com indivíduos NI portadores do mesmo alelo ($p=0,0102$) (Figura 28).

Os resultados relacionados à presença/ausência do alelo polimórfico para o polimorfismo -1306 C/T não mostraram diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos de MMP-2 entre os grupos que apresentam o alelo polimórfico T+. A diferença estatística significativa foi encontrada apenas na ausência do alelo polimórfico, como também demonstrado nas análises de frequência genotípica (Figura 29).

Para o polimorfismo -735 C/T, os resultados demonstraram que os pacientes CARD que possuem o alelo polimórfico T+ apresentam maiores níveis séricos de MMP-2 quando comparados com pacientes IND portadores do mesmo alelo ($p=0,0121$) (Figura 30).

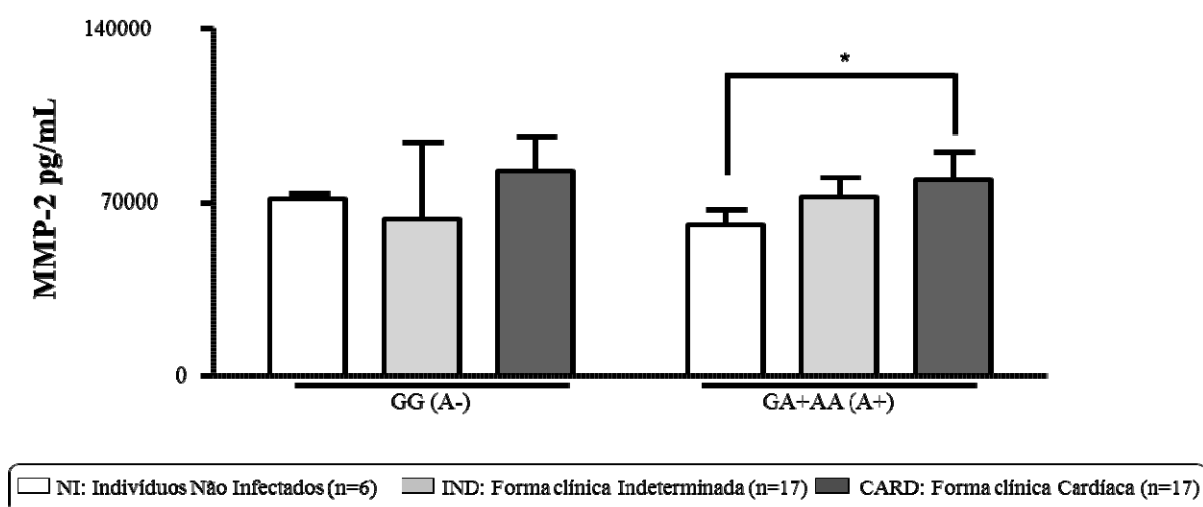


FIGURA 28 - Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com a presença (GA+AA) ou ausência (GG) do alelo polimórfico -1575 A.

Os níveis séricos da MMP-2 e o polimorfismo foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como mediana com intervalo interquartil. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”.

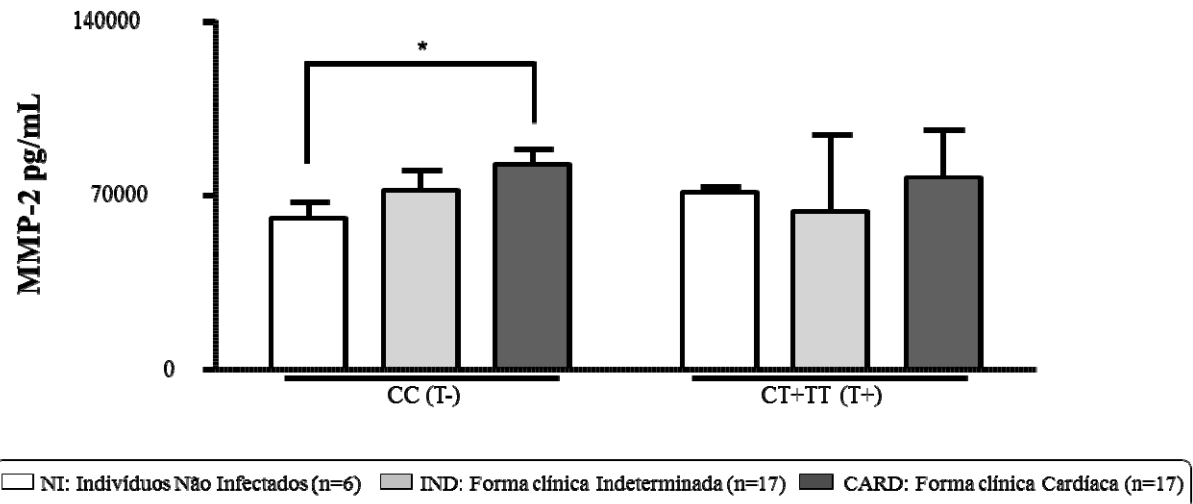


FIGURA 29 - Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com a presença (CT+TT) ou ausência (CC) do alelo polimórfico -1306 T.

Os níveis séricos da MMP-2 e o polimorfismo foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como mediana com intervalo interquartil. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”.

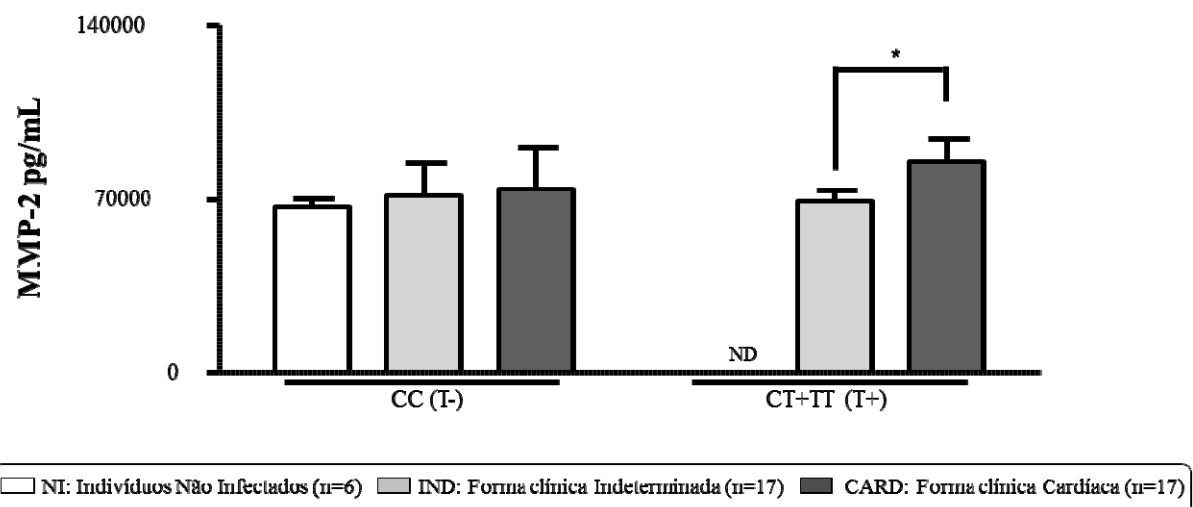


FIGURA 30 - Análise dos níveis séricos da MMP-2 de acordo com a presença (CT+TT) ou ausência (CC) do alelo polimórfico -735 T.

Os níveis séricos da MMP-2 e o polimorfismo foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como mediana com intervalo interquartil. As diferenças estatísticas estão representadas por linhas conectoras e pelo símbolo “*”. A sigla ND significa presença alélica não detectada.

4.5.3.2-Análise dos níveis séricos de TIMP-1 de indivíduos NI e portadores da doença de Chagas de acordo com a presença ou ausência dos alelos polimórficos referentes aos polimorfismos +372 C/T.

A análise do polimorfismo +372 C/T não mostrou diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos de MMP-2 em relação a presença ou ausência do alelo polimórfico T (Figura 31).

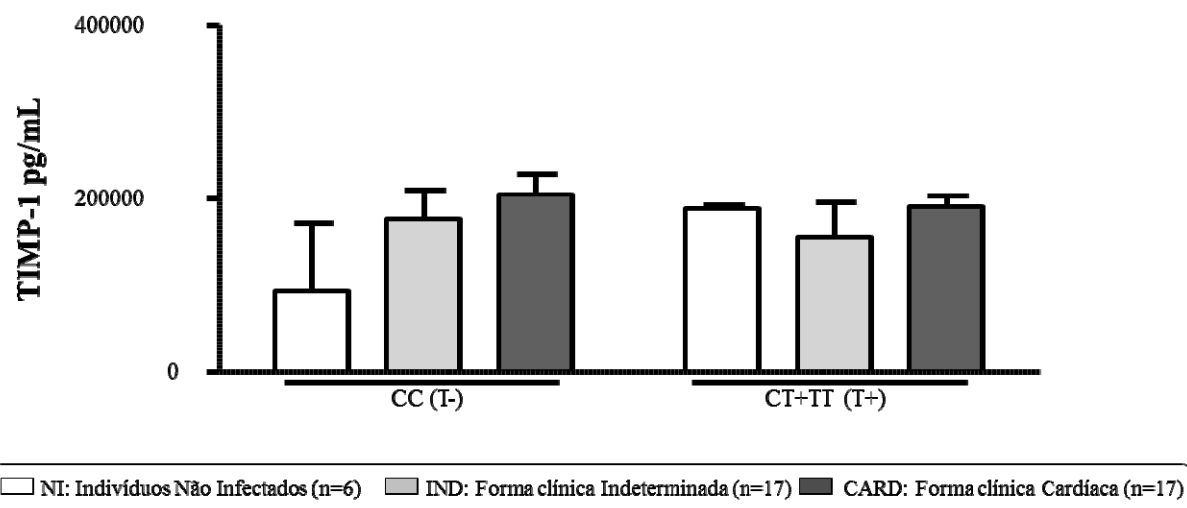


FIGURA 31 - Análise dos níveis séricos da TIMP-1 de acordo com a presença (CT+TT) ou ausência (CC) do alelo polimórfico +732 T.

Os níveis séricos do TIMP-1 e o polimorfismo foram avaliados em amostras de indivíduos NI (barra branca) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, barra cinza claro) e cardíaca (CARD, barra cinza escuro) da doença de Chagas, como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como mediana com intervalo interquartil.

Todos os resultados acima mostrados, referentes ao estudo de polimorfismo, estão demonstrados na Tabela 12. Nessa tabela são mostrados os genótipos e alelos que apresentaram maior frequência em cada grupo estudado, bem como, os grupos que apresentaram diferença significativa na análise dos níveis séricos.

Tabela 12 – Resumo dos resultados da avaliação da ocorrência de polimorfismos em genes da MMP-2, MMP-9 e do TIMP-1.

	Frequência genotípica*			Impacto nos níveis Séricos	Frequência alélica*			Impacto nos níveis Séricos
	NI	IND	CARD		NI	IND	CARD	
MMP-2								
-1575	GG	GG	GA	GA: CARD>NI	G	G	A	A+: CARD>NI
-1306	CC	CC	CC	CC: CARD>NI	C	C	C	T-: CARD>NI
-735	CC	CC	CC	CT: CARD>IND	C	C	C	T+: CARD> NI
MMP-9								
-1562	CT	CT	CT	CT: IND e CARD>NI	T	T	T	-
TIMP-1**								
+372	TT	TT	CC	-	T	T	C	-

*Genótipos e alelos que apresentaram maior frequência em cada grupo estudado.

**Os resultados mostrados para TIMP-1 são referentes à análise do sexo feminino.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O controle da transmissão da doença de Chagas resultou em queda acentuada da incidência de novos casos nos últimos anos. No entanto, a doença de Chagas ainda é uma enfermidade crônica grave, portanto, um problema significativo de saúde pública com elevado impacto sócio-econômico sendo, atualmente, considerada problema global (Schmunis & Yadon, 2010). Ainda existe a ocorrência de novos casos decorrentes de transmissão vetorial, em áreas isoladas, e de transmissão oral (Silveira & Dias, 2011). Os casos crônicos remanescentes ainda continuam a ser problema grave e de grande interesse médico-científico devido à destacada heterogeneidade clínica.

O grande questionamento nos âmbitos clínico e científico é o porquê alguns pacientes permanecem durante toda a vida sem manifestações clínicas decorrentes da doença de Chagas, enquanto outros são acometidos com uma forma grave, com grande comprometimento da função cardíaca e/ou digestiva. A doença de Chagas tem grande variabilidade em relação às manifestações clínicas, mesmo entre os pacientes portadores da forma clínica cardíaca (Menezes et al., 2011). Apesar da classificação da forma cardíaca em diferentes estágios ajudar a distinguir pacientes com pior prognóstico, a morte súbita e outros eventos clínicos graves ainda ocorrem em pacientes no estágio inicial do acometimento cardíaco (Andrade et al., 2011). Assim, um dos principais desafios no estudo dos mecanismos fisiopatológicos da doença de Chagas é a identificação de potenciais fatores de risco, ou biomarcadores, para a ocorrência de manifestações clínicas (morte súbita, falência cardíaca, arritmia maligna) ou para a progressão da doença entre pacientes que ainda apresentam a forma indeterminada ou estão no estágio inicial da forma cardíaca (Rocha et al., 2003, 2007; Menezes et al., 2011). Na tentativa de responder a esse questionamento e na busca de biomarcadores de prognóstico, o estudo da patogênese da fibrose cardíaca advinda da infecção pelo *T. cruzi* tem sido alvo de estudos intensos (Lannes-Vieira et al., 2011; Araújo-Jorge et al., 2008; Gutierrez et al., 2008).

Apesar das diferentes etiologias e manifestações clínicas, a maioria das doenças fibróticas apresentam constante produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas, que estimulam a deposição de componentes da MEC desencadeando progressivamente o remodelamento tecidual (Wynn, 2008). No contexto do coração, o remodelamento cardíaco promove alteração na conformação das células e da matriz extracelular no coração, resultando em mudanças moleculares, celulares e intersticiais miocárdicas. Dessa forma, o miocárdio apresenta variações no tamanho, forma e na fração de

ejeção (Cohn et al., 2000; Mendes et al., 2010). Essas características são encontradas na cardiomiopatia chagásica e estão diretamente relacionadas à falência cardíaca (Rocha et al., 2009).

Fatores celulares e extracelulares estão envolvidos no processo de remodelamento, e a ação combinada desses fatores promovem mudanças na estrutura e na função do miocárdio (Brower et al., 2006; Deschamps & Spinale, 2006). O presente trabalho traz o estudo dos fatores extracelulares, MMPs e seus inibidores TIMPs. As MMP-2 e MMP-9 desempenham função fisiológica importante de degradação de componentes da MEC do coração, nos processos envolvendo a síntese e deposição de colágeno e no remodelamento do tecido conjuntivo (Li et al., 2000; Vanhoutte et al., 2006; Kupai et al., 2010; Polyakova et al., 2010). Atualmente, existe grande número de estudos sobre as metaloproteinases nas doenças cardíacas, mas, pela primeira vez, avaliamos o envolvimento dessas enzimas no contexto do acometimento cardíaco da doença de Chagas em humanos.

O primeiro passo foi avaliar o perfil sérico das MMPs 2 e 9 e dos TIMPs 1 e 2. Nossos resultados utilizando milliplex mostraram que tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 são produzidas em maior quantidade por pacientes portadores da forma clínica CARD (Figura 9). Entretanto, os resultados da zimografia não mostraram diferenças nos níveis de MMP-2 (Figura 12). Além disso, a MMP-2 não foi detectada no grupo NI, o que pode sugerir que, nesse grupo, a MMP-2 pode estar complexada com o TIMP ou degradada, não apresentando potencial de atividade proteolítica. Por outro lado, a dosagem por zimografia também mostrou que apenas os níveis de MMP-9 estavam aumentados em pacientes CARD, quando comparados a pacientes IND (Figura 12), mostrando que, nos pacientes CARD, a MMP-9 tem maior potencial de atividade enzimática.

Corroborando com esse achado, estudos clínicos demonstraram que níveis aumentados de MMP-9 circulante estão associados com o remodelamento do ventrículo esquerdo após o infarto agudo do miocárdio (Matsunaga et al., 2005; Kelly et al., 2007). Níveis plasmáticos da MMP-9 também foram associados à disfunção cardíaca e ao aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo, indicando a participação da MMP-9 plasmática no remodelamento ventricular (Sundström et al., 2004). Recentemente, Fontana e colaboradores (2012), mostraram que a concentração dessas enzimas no sangue pode estar associada ao prognóstico e a complicações cardiovasculares da hipertensão, apresentando-se como indicador útil no acompanhamento clínico do paciente. Dini e colaboradores (2010) observaram que pacientes com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo apresentaram níveis elevados de MMP-9 sérica, sendo ainda superiores aos níveis de BNP (Peptídeo Natriurético tipo B, marcador

utilizado para diagnóstico de doenças cardiovasculares) em determinar sobrevida e ocorrência de eventos cardíacos. Altos níveis de MMP-2 e MMP-9 também foram associados a maturação do colágeno na falência cardíaca, demonstrando importante papel dessas enzimas na fibrose através de mudanças na configuração, ativação e deposição de colágeno (Polyakova et al., 2010). Em estudo experimental com coelhos, também foi demonstrado que a MMP-9 está mais ativa em miocárdio hipertrofiado em comparação a corações saudáveis e essa maior atividade estaria relacionada à inibição da angiogênese, promovendo, assim a hipertrofia ventricular (Nikolova et al., 2012). Gutierrez e colaboradores (2008) também observaram maior atividade de MMP-2 e MMP-9 em amostras de tecido cardíaco de camundongos infectados com *T. cruzi*. Portanto, em conjunto com esses dados, nossos resultados sugerem uma relação da MMP-9 com o remodelamento cardíaco e, conseqüentemente, participação dessa protease na cardiomiopatia chagásica.

Nossos resultados também mostraram que a MMP-9 é mais produzida que a MMP-2 (Figuras 9 e 12). Li e colaboradores (2000) descreveram que a MMP-2 é expressa em baixos níveis por muitas células, quando comparada aos níveis de expressão da MMP-9. A análise de correlação, a partir dos dados de multiplex, revelou correlação negativa entre as duas enzimas apenas no grupo IND (Figura 9), indicando que quando a MMP-9 está aumentada a MMP-2 está diminuída, e vice-versa. No entanto, a correlação a partir dos dados de zimografia foi positiva entre os níveis séricos das duas MMPs, nos grupos IND e CARD (Figura 12). Mesmo com correlação positiva, os níveis de MMP-9, ao contrário do grupo IND, se sobressaíram nos pacientes CARD, sugerindo que nos pacientes IND existe maior equilíbrio em relação aos níveis das duas MMPs.

Os principais inibidores endógenos das MMPs são os TIMPs (Lambert et al., 2004; Kupai et al., 2010). Os TIMPs se ligam às MMPs através da proporção molar estequiométrica 1:1, formando um sistema importante para o controle da atividade endógena das MMPs *in vivo* (Spinale et al., 2000). Diante disso, nosso próximo objetivo foi dosar os níveis séricos dos principais TIMPs envolvidos na inibição das MMPs (TIMP-1 e TIMP-2). Os níveis séricos de TIMP-1 não foram diferentes entre os grupos, enquanto, que os níveis de TIMP-2 são maiores nos pacientes CARD (Figura 10). Alguns autores já demonstraram que os TIMPs estão consideravelmente aumentados em pacientes portadores de cardiopatias distintas (Thomas et al., 1998; Ahmed et al., 2006). Thomas e colaboradores, 1998, constataram aumento significativo na expressão do TIMP-1 e do TIMP-2 no miocárdio de pacientes portadores de cardiopatia dilatada grave. Ahmed e colaboradores (2006) descreveram aumento significativo do TIMP-1 no plasma de pacientes com insuficiência cardíaca crônica e

hipertrofia do VE, em contrapartida, observaram leve aumento do TIMP-2, independente da presença da hipertrofia do VE. A comparação dos níveis séricos dos TIMPs ainda não está descrita na literatura, mas nossos resultados, a partir da análise de razão entre os TIMPs, mostraram que os níveis de TIMP-1 são maiores em relação aos níveis de TIMP-2 (Figura 10). Além disso, as análises de correlação mostram que TIMP-1 e TIMP-2 apresentam correlação positiva em todos os grupos estudados (Figura 10). Assim, quando os níveis séricos de TIMP-1 estão aumentados os níveis de TIMP-2 também aumentam, possivelmente como mecanismo de controle da atividade das MMPs 2 e 9 produzidas.

A especificidade dos TIMPs ainda não está totalmente esclarecida, mas alguns autores citam a preferência de ligação do TIMP-1 à MMP-9 e do TIMP-2 à MMP-2 (Brew & Nagase, 2010; Moore et al., 2011). Para entender essa relação, realizamos análises de correlação entre as MMPs e seus inibidores. Nossos resultados mostraram correlação positiva entre TIMP-1 e MMP-2, e correlação negativa entre TIMP-1 e MMP-9 (Figura 11), mostrando que possivelmente a especificidade do TIMP-1 seja pela MMP-9. A correlação do TIMP-2 com a MMP-2 foi positiva em todos os grupos estudados, enquanto que a correlação entre TIMP-2 e MMP-9 foi negativa apenas no grupo IND (Figura 11). Apesar de TIMP-2 ser descrito como inibidor, essa molécula também participa da ativação da MMP-2 (Mannello & Medda, 2012; Moore et al., 2011). Isso poderia explicar a correlação positiva e significativa encontrada entre MMP-2 e TIMP-2 nos grupos avaliados.

Analisando conjuntamente esses primeiros resultados, podemos observar que apesar de serem produzidos e apresentarem correlação negativa com a MMP-9, os níveis de TIMP-1 parecem não ser suficientes para regular a MMP-9 no grupo CARD. Enquanto que os níveis de TIMP-2, significativamente maiores no grupo CARD, poderiam controlar eficientemente a MMP-2. Esses dados juntamente com os dados acima descritos sugerem possível atuação diferente entre MMP-2 e MMP-9 na patogênese da doença de Chagas. Já foi descrito que a MMP-2 pode estar localizada no núcleo de células cardíacas, onde essa proteína teria papel protetor ao impedir a apoptose dessas células. Até o momento, não foram identificadas funções protetoras para MMP-9 (Mannello & Medda, 2012). Além disso, o aumento da MMP-9 associado à redução da MMP-2 foi relacionado a hipertrofia do ventrículo esquerdo em pacientes com hipertensão (Ahmed et al., 2006). Estudo conduzido em modelo experimental, também mostrou papéis opostos das MMPs 2 e 9 na progressão da artrite. Enquanto MMP-2 apresentou papel supressor, MMP-9 foi associada ao desenvolvimento da doença inflamatória (Itoh et al., 2002).

Citocinas e quimiocinas, tais como TGF- β , IL-6, IL-1 β , IL-8 são apontadas como potenciais indutores da transcrição das MMP e podem estar envolvidas na ativação das MMPs (Kadri et al., 2000; Lambert et al., 2004; Deschamps & Spinale, 2006; Lockwood et al., 2008). Para investigar o envolvimento entre citocinas e as MMPs 2 e 9, foram realizadas análises de correlação entre os níveis séricos de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 e os níveis séricos das MMPs. Nossos dados mostram que IL-6 apresenta correlação com os níveis séricos de MMP-2 e MMP-9 dosados por Milliplex, sendo essa correlação negativa e positiva, respectivamente (Figura 13). A IL-6 tem sido amplamente estudada nas doenças cardiovasculares e tem sido associada à intensificação da inflamação no miocárdio, favorecendo a disfunção cardíaca (Bielecka-Dabrowa et al., 2013; Stanciu et al., 2013; Kortekaas et al., 2012). Stanciu e colaboradores, 2013, mostraram que após tratamento da insuficiência cardíaca os níveis de IL-6 reduziram, chegando a níveis igualitários aos de indivíduos saudáveis. Em conjunto com nossos dados, podemos sugerir envolvimento MMP-9 com a inflamação, ao passo que para MMP-2 essa afirmação ainda não foi observada.

Em relação aos níveis séricos das MMPs dosados por zimografia, a IL-10 é a citocina com maior destaque no grupo IND e a IL-1 β no grupo CARD. A IL-10 apresentou correlação positiva com as MMPs 2 e 9 apenas no grupo IND (Figura 14). Já foi demonstrado que pacientes IND apresentam maiores níveis de IL-10, diferentemente dos pacientes CARD (Gomes et al., 2003; 2005) e isso, possivelmente, poderia estar favorecendo essa correlação positiva com as MMPs no grupo IND. Além disso, a correlação positiva entre IL-10 e as MMPs pode sugerir produção da IL-10 para controle das MMPs produzidas. A IL-10 é uma citocina com papel imunossupressor que regula a resposta inflamatória crônica (Moore et al., 2001). Além desse importante papel, a IL-10 tem sido apontada como inibidora da fibrose (Wynn, 2008). Em estudo experimental utilizando drogas indutoras de fibrose, o tratamento com IL-10 reduziu a fibrose no fígado (Thompson et al., 1998). Estudando o processo de cicatrização, Shi e colaboradores (2013), mostraram que fibroblastos humanos cultivados com IL-10 apresentaram melhor cicatrização e menor deposição de colágeno, mostrando papel importante da IL-10 na inibição da deposição excessiva de componentes da matriz extracelular (Shi et al., 2013). No contexto cardíaco, um estudo comparando camundongos selvagens e camundongos Knockout para IL-10 mostrou que, na ausência de IL-10, os processos de disfunção ventricular, hipertrofia e fibrose foram intensificados. Todavia, com a administração sistêmica de IL-10 recombinante, a função do ventrículo esquerdo melhorou acentuadamente e o remodelamento cardíaco foi inibido (Verma et al., 2012). Nosso grupo

tem demonstrado que na doença de Chagas, pacientes cardíacos (CARD) desenvolvem forte resposta contra antígenos do *T. cruzi*, com secreção de altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10, sendo que esta resposta está associada ao desenvolvimento da patologia cardíaca (Gomes et al., 2003; de Araújo et al., 2007). Outros dados da literatura mostram que a baixa expressão de IL-10 está associada com o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica (Costa et al., 2009).

A IL-1 β apresentou correlação negativa com as MMPs no grupo IND, enquanto que no grupo CARD essa correlação foi positiva (Figura 14), mostrando que o perfil inflamatório do paciente pode influenciar no potencial de atividade proteolítica das MMPs. Cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi* desencadeiam resposta imune inflamatória caracterizada pela produção de IL-1 β e TNF- α e associada a hipertrofia dessas células (Aoki et al., 2012). Além disso, essas citocinas podem clivar e ativar MMP-2 e MMP-9, intensificando o processo de remodelamento cardíaco (Aoki et al., 2012; Parks et al., 2004). De fato, já foi demonstrado que a IL-1 β reduz a contratilidade das células cardíacas de maneira dose-dependente e contribui para apoptose dos cardiomiócitos com conseqüente hipertrofia (Rutschow et al., 2006). O aumento da IL-1 β também pode ser devido à ação dos inflamassomos cuja ativação promove dano no miocárdio, favorecendo o infiltrado inflamatório no coração e, conseqüentemente, a fibrose e a disfunção cardíaca (Kawaguchi et al., 2011). Portanto, em adição aos resultados já discutidos, podemos verificar que o papel das MMPs 2 e 9 são significativamente distintos, sendo a MMP-9 associada à inflamação.

As MMPs são altamente induzíveis, respondendo a muitos fatores, incluindo estiramento mecânico, hormônios, transformações celulares, fatores de crescimento e citocinas (Nagase et al., 1999; D'Armiento et al., 2002). A maioria desses fatores está presente no miocárdio, particularmente durante a progressão da insuficiência cardíaca. Assim, as MMPs podem responder a estímulos do ambiente, de maneira rápida e sustentada, para reorganizar a estrutura e o conteúdo da MEC do tecido (Fedak et al., 2005). A expressão das MMPs é constitutiva na maioria das células, mas foi em neutrófilos que a MMP-9 foi primeiramente identificada (Sopata & Dancewics, 1974) e, posteriormente, em monócitos e macrófagos (Mainardi et al., 1984). Células dendríticas e linfócitos também produzem MMP-2 e MMP-9 (Opdenakker et al., 2001c; Brunner et al., 2010; Edspar et al., 2011). Além das células do sistema imune, vários tipos celulares incluindo fibroblastos, células endoteliais e osteoblastos são capazes de produzir MMP-9 após estimulação. No entanto, quando

comparadas aos leucócitos, essas células são apontadas como baixos produtores (Opdenakker et al., 2001b).

A partir dessas informações, nosso próximo objetivo foi avaliar a fonte das MMPs 2 e 9 e a participação das células do sistema imune nesse processo. Avaliamos, então, os níveis intracitoplasmáticos das MMPs 2 e 9 em linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ e em monócitos CD14⁺. Os resultados mostraram que as células avaliadas são capazes de produzir tanto MMP-2 quanto MMP-9 (Figuras 16 e 17), corroborando com dados já publicados (Brunner et al., 2010; Edsparr et al., 2011; Clark et al., 2011). Além disso, os níveis de MMP-2 e MMP-9 foram maiores em células de pacientes portadores da doença de Chagas em relação aos indivíduos não infectados. O estímulo com antígenos de TRIPO aumentou ainda mais os níveis intracitoplasmáticos dessas enzimas nos monócitos CD14⁺ quando comparados à cultura controle (Figuras 16 e 17). Esses resultados podem indicar um envolvimento da doença na indução da produção das MMPs 2 e 9 e que, possivelmente, essa produção seja estímulo-dependente. Nosso grupo de pesquisa já mostrou em outros trabalhos a participação essencial de células do sistema imune, tais como monócitos (Gomes et al., 2012) e linfócitos (de Araújo et al., 2012; Keesen et al., 2012) no mecanismo de patogênese da doença de Chagas.

Após avaliação do perfil das MMPs no soro e análise do seu possível papel no desenvolvimento das formas clínicas da doença de Chagas, outra estratégia de análise foi verificar, dentro das células mononucleares, a principal fonte das MMPs 2 e 9. Os resultados mostraram que os linfócitos TCD8⁺ foram as células que mais contribuíram para a produção tanto de MMP-2 quanto de MMP-9 (Figura 18). É importante ressaltar que entre os grupos IND e CARD, em relação aos níveis intracitoplasmáticos de MMP-2 e MMP-9, foram encontradas diferenças apenas nas células CD8. A participação das MMPs na migração de células imunes já tem sido destacada (Gutierrez et al., 2008), podendo justificar a importância da produção dessas proteínas por linfócitos, especialmente, linfócitos TCD8⁺, que são as principais células encontradas no coração, no contexto da doença de Chagas (Reis et al., 1993). Estudos histopatológicos mostram que a principal característica da cardiomiopatia chagásica é a presença de infiltrado inflamatório composto por macrófagos (50%), linfócitos T (40%, com predominância dos linfócitos T CD8⁺ em relação aos linfócitos T CD4⁺), linfócitos B (menos de 10%) e raras células NK (Higuchi et al., 1993; Reis et al., 1993; Cunha-Neto et al., 2011). Entretanto, outras células da resposta imune, tais como neutrófilos (Opdenakker et al., 2001b), e muitos diferentes tipos celulares incluindo cardiomiócitos, fibroblastos e células endoteliais, são capazes de produzir e secretar MMP-2 e MMP-9

(Opdenakker et al., 2001b; Brunner et al., 2010), podendo contribuir para os níveis séricos das MMPs 2 e 9 dosados no presente trabalho.

Os resultados mostrados até aqui nos permitem inferir que o perfil de algumas proteínas no soro é distinto entre os pacientes portadores de diferentes formas clínicas da doença de Chagas. No entanto, tínhamos ainda como objetivo avaliar o impacto do soro de indivíduos não infectados e de pacientes com doença de Chagas no perfil de expressão de proteínas da MEC, incluindo as MMPs e seus inibidores. Para isso, utilizamos o sistema de cultura de cardiomiócitos *in vitro*. Os cardiomiócitos são células diretamente envolvidas no processo de remodelamento cardíaco (Spinale et al., 2007). Essas células são determinantes nos processos de contração ventricular, bem como da sua massa. Ao ser exposto a lesão, aguda ou crônica, há, frequentemente, diminuição de cardiomiócitos e os remanescentes tornam-se alongados e hipertrofiados, com o objetivo de manter o débito cardíaco, o que determina aumento da espessura da parede ventricular (Cohn et al., 2000).

A MEC cardíaca coordena a interação entre cardiomiócitos, fibroblastos e vasos sanguíneos, mantendo a integridade da arquitetura cardíaca. A MEC representa uma trama complexa de moléculas biologicamente ativas e altamente organizadas, dentre elas, colágeno I e III, fibronectina e laminina, que desempenham importante papel no remodelamento cardíaco (Spinale et al., 2007; Moore et al., 2011).

Para a análise da expressão de proteínas da MEC *in vitro* utilizamos a cultura 3D de cardiomiócitos. Apesar da cultura de monocamada bidimensional (2D) ser o método escolhido na maioria dos trabalhos que avaliam a interação entre *T. cruzi* e cardiomiócitos (Meirelles et al., 1999), esse sistema de cultivo não reproduz fielmente o remodelamento cardíaco causado pela fibrose e a hipertrofia observada *in vivo* durante a cardiomiopatia chagásica. Por outro lado, o cultivo 3D apresenta grande similaridade à situação *in vivo* em relação à morfologia tecidual, pois promove ambiente sustentável para as interações celulares. Assim, o cultivo 3D permite avaliações relacionadas à expressão gênica, proliferação, diferenciação e indução de apoptose (Garzoni et al., 2004, 2008).

Nossos resultados mostraram que na presença de soro de pacientes portadores da doença de Chagas a expressão do colágeno foi maior (Figura 20), o que sugere a existência de componentes no soro desses pacientes, tanto IND quanto CARD, capazes de induzir maior deposição de colágeno. Entretanto, no caso dos pacientes IND é possível que exista um mecanismo de controle para essa deposição, não demonstrado nestas culturas, capazes de controlar a evolução da forma clínica, uma vez que não apresentam acometimento cardíaco. O colágeno desempenha papel essencial na manutenção da forma, tamanho e função ventricular.

A degradação do colágeno no miocárdio resulta em dilatação do ventrículo, enquanto que o aumento da concentração intersticial do colágeno provoca enrijecimento do colágeno e disfunção diastólica ventricular (Brower et al., 2006).

A análise de fibronectina e MMP-2 revelou que na presença de soro de pacientes IND os esferóides apresentam maior expressão dessas proteínas (Figura 20). Mostrando mais uma vez, que é possível observar a existência de componentes no soro de pacientes IND que poderiam induzir maior expressão dessas proteínas. É interessante ressaltar que a fibronectina é uma glicoproteína que desempenha diversas funções, principalmente, na adesão e migração celular e, por isso, é essencial para a manutenção da integridade tecidual (White et al., 2008). Assim, podemos sugerir que o aumento da expressão de fibronectina bem como, o aumento da MMP-2, podem ser fatores ligados à proteção, uma vez que observamos que essa enzima parece estar relacionada a funções anti-inflamatórias.

Apesar de observarmos aumento na expressão de MMP-9 em esferóides na presença de soro de pacientes CARD, estes resultados não foram estatisticamente significativos. A expressão da laminina também não foi diferente entre os grupos avaliados. A laminina é uma proteína abundante na membrana basal e essencial para a diferenciação e manutenção celular (Carmignac & Durbeej, 2012).

Os TIMPs também apresentaram maior expressão após cultura com soro de pacientes portadores da doença de Chagas (Figura 20), o que pode indicar possível mecanismo de controle da expressão das MMPs. Apesar dos TIMPs serem expressos em uma variedade de células de diferentes órgãos, o TIMP-4 apresenta altos níveis de expressão no miocárdio humano, e assim, é também chamado de inibidor cardíaco das MMPs (Vanhoutte et al., 2006), o que pode explicar a maior expressão desse inibidor por cardiomiócitos, em relação ao TIMP-1.

Para verificar a relação entre a expressão das MMPs 2 e 9 e as outras proteínas de matriz, análises de correlação foram realizadas. Os resultados mostraram que a MMP-2 correlacionou-se negativamente e a MMP-9 positivamente com as proteínas laminina e fibronectina (Figura 21). Esses resultados corroboram com os anteriores, indicando possível diferença na atuação dessas MMPs. A correlação positiva da MMP-9 com as proteínas de matriz pode indicar, mais uma vez, a participação dessa endopeptidase na patologia cardíaca da doença de Chagas.

A digestão de proteínas da matriz pelas MMPs não necessariamente reduz a quantidade das mesmas. Pelo contrário, essa digestão libera fatores de crescimento e outras moléculas com potentes efeitos na síntese de matriz, aumentando ainda mais a síntese e a

deposição de proteínas na matriz extracelular (Li et al., 2000). As MMPs, como componentes da MEC, possuem papel importante na remodelação do tecido conjuntivo que ocorre em muitos processos fisiológicos normais. A expressão anormal destas proteinases pode contribuir com uma variedade de processos patológicos caracterizados pela degradação da MEC, incluindo manifestações cardíacas (Spinale et al., 2007).

O desenvolvimento de uma doença infecciosa resulta de uma complexa interação entre hospedeiro, microrganismo, e ambiente. Muitos fatores exercem influência na determinação da gravidade e da progressão da doença em indivíduos e na taxa de infecção na população, sendo a genética do hospedeiro um desses fatores. Diferentes genes têm sido pesquisados na tentativa de se encontrar associação entre um alelo e/ou um genótipo e a presença de cardiomiopatia (Fernández-Mestre et al., 2004; Zafra et al., 2007; Costa et al., 2009; Flórez et al., 2011; Vasconcelos et al., 2012; Nogueira et al., 2012; Pissetti et al., 2013). A cardiomiopatia chagásica é uma doença complexa e, como tal, além dos fatores ambientais, muitos genes podem conferir susceptibilidade ao indivíduo infectado pelo *T. cruzi* para desenvolver a forma cardíaca da doença. Doenças complexas são definidas como poligênicas (envolvendo mais que um gene), multifatoriais (dependendo da interação de mais de um gene e um ou mais fatores ambientais), oligogênicas (envolvendo mutações em vários genes diferentes de pequeno efeito), e o gene principal (um gene principal contribuindo com proporção significativa com os fatores genéticos) (Marquet et al., 1996).

Neste contexto, avaliar a ocorrência de polimorfismos nas sequências das MMPs 2 e 9 e dos TIMPs passa a ser um fator importante para o entendimento da patofisiologia da doença de Chagas. Neste estudo não houve distinção entre grupos étnicos de acordo com variações morfológicas como cor da pele por exemplo. De acordo com Parra e colaboradores, 2003, tal divisão não convém à população brasileira dada a grande miscigenação, o que proporciona uma ampla sobreposição de genótipos entre dois grupos étnicos distintos como “brancos” ou “negros”. Ainda segundo os mesmos autores, a população de Minas Gerais pode ser referida como uma boa representação da população brasileira. Os pacientes estudados são provenientes, em sua maioria, do interior de Minas Gerais sendo que os mesmos representam uma população pouco variável em relação ao fator naturalidade.

Inicialmente, avaliamos o princípio matemático de Hardy-Weinberg para os polimorfismos selecionados. O equilíbrio de Hardy-Weinberg verifica se não existem fatores evolutivos atuando sobre uma população. Se fatores evolutivos não estiverem presentes, as frequências gênicas permanecem inalteradas e as proporções genotípicas atingem um equilíbrio estável, mostrando relação constante entre si ao longo do tempo. Neste estudo,

verificou-se que para os cinco polimorfismos estudados, apenas os polimorfismos MMP-2 (-1575 A/G) e MMP-2 (-735 C/T) encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4). O Equilíbrio de Hardy-Weinberg pressupõe que a população de estudo seja grande. Além disso, o cálculo do equilíbrio pode ser influenciado pela prevalência de determinado genótipo na população, se essa frequência for baixa, o genótipo menos prevalente pode não ser encontrado nos indivíduos estudados. Ou seja, se uma população estiver em equilíbrio, a frequência máxima de heterozigotos é de 50% e isso ocorre quando os dois alelos tem a mesma frequência. Se os heterozigotos estão acima de 50%, a população não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Ridley, 2006). Essas questões podem justificar a ausência de equilíbrio encontrada para os outros três polimorfismos.

No presente estudo não houve diferenças significativas entre os portadores da doença de Chagas e o grupo controle no que diz respeito à distribuição dos genótipos dos polimorfismos referentes à MMP-2 (Tabelas 5, 6 e 7). Em todos os polimorfismos estudados para a MMP-2, a presença do alelo polimórfico reduz a transcrição proteica da MMP-2 e, conseqüentemente, há menor produção da proteína (Hua et al., 2009; Mossbock et al., 2010; Beeghly-Fadiel et al., 2009). Além disso, os pacientes do grupo IND apresentaram frequência maior do genótipo homozigoto para o gene ancestral em relação ao grupo CARD, indicando o favorecimento da produção de MMP-2 no grupo IND. Esses dados, juntamente com dados anteriores da expressão de MMP-2, nos leva ao questionamento da real participação da MMP-2 na indução da fibrose cardíaca, como indutora ou reguladora do processo. Entretanto, a análise funcional mostrou diferenças estatisticamente significativas apenas nos níveis séricos da MMP-2 entre grupos de pacientes com o mesmo genótipo. Não foram observadas diferenças entre os diferentes genótipos, bem como, entre presença e ausência do alelo polimórfico e, por isso, nossos dados não permitem associação desse polimorfismo com o desenvolvimento das formas clínicas da doença de Chagas.

Para MMP-9, o polimorfismo estudado (-1562 C/T) mostrou que pacientes CARD apresentam maior frequência do genótipo CT em relação aos pacientes IND (Tabela 8). O alelo polimórfico T está associado ao aumento da expressão da MMP-9 (Ye, 2006; Blankenberg et al., 2003). Entretanto, pelo fato de não ter sido encontrado o genótipo homozigoto CC, não foi possível realizar o cálculo de Odds-Ratio (OR) que prediz o risco de desenvolver a doença. Portanto, nossos dados não permitiram associação da ocorrência desse polimorfismo com a manifestação cardíaca da doença de Chagas. Além disso, assim como para a MMP-2, não foram observadas diferenças na produção de MMP-9 entre os diferentes genótipos, bem como, entre presença e ausência do alelo polimórfico. Esse mesmo

polimorfismo foi estudado por outros pesquisadores utilizando um grupo de 584 pacientes com infarto do miocárdio e 645 indivíduos saudáveis, e mesmo com um número amostral significativo, os autores não encontraram diferença entre as frequências genótípicas (Zhang et al., 1999). Entretanto, nesse mesmo trabalho eles observaram que pacientes que apresentavam uma ou duas cópias do alelo T, possuíam outras disfunções relacionadas ao sistema cardiovascular, mostrando que essa alteração genética (-1562 C/T) influencia a atividade promotora do gene da MMP-9 de maneira alelo-específica (Zhang et al., 1999).

Haberbosch & Gardemann também estudaram o polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 como fator de risco para o infarto do miocárdio. Os autores também não encontraram diferenças significativas no grupo de estudo e, por isso, o polimorfismo não foi associado ao risco de infarto. Entretanto, eles observaram que os pacientes com genótipo homocigoto TT apresentaram níveis elevados de outros biomarcadores para doença cardíaca, como apolipoproteína B, proteína responsável pelo transporte de colesterol (Haberbosch & Gardemann, 2005).

O polimorfismo +372 C/T no TIMP-1 foi analisado com separação dos gêneros, sendo encontrada diferença significativa na frequência genótipo entre os homens do grupo NI e do grupo CARD. Em relação a presença ou ausência do alelo polimórfico em ambos os gêneros, observamos que a presença do alelo T foi significativamente maior no grupo CARD quando comparado ao grupo IND (Tabelas 9, 10 e 11), com um OR de 3,14. Isso significa que pacientes que apresentam o alelo T tem 3 vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca da doença de Chagas. Como já descrito na introdução, os TIMPs possuem outras atividades biológicas independentes da inibição de MMPs, como, por exemplo, promoção da proliferação celular e atividade pró apoptótica (Nagase et al., 2006; Brew & Nagase, 2010). Além disso, TIMP-1 pode estimular o crescimento de fibroblastos *in vitro* (Vanhoutte et al., 2006). Existem poucos estudos de polimorfismo genético do cromossomo X associado ao TIMP-1 e sua associação com doenças, mas sabe-se que esse polimorfismo localizado no éxon V no TIMP-1 está na terceira posição do códon e não leva a mudanças no aminoácido (Hinterseher et al., 2007 Kumar et al., 2011;). De fato, a análise funcional não mostrou diferenças significativas entre os níveis séricos de TIMP-1 e a frequência genotípica, bem como, entre presença ou ausência do alelo polimórfico. O polimorfismo para TIMP-2 não foi estudado, pois ainda não existe na literatura a descrição de um polimorfismo validado em doenças cardíacas.

Diferenças entre casos e controles na prevalência de uma doença podem sugerir o papel de fatores genéticos na doença, mas necessitam de grande número de amostras (Segal &

Hill, 2003). A ausência no predomínio de determinado genótipo nos grupos de pacientes portadores da doença de Chagas pode indicar que os polimorfismos estudados não atuem na patogênese da disfunção ventricular causada pela doença de Chagas ou que seu papel foi suplantado por outro processo que atue de forma preponderante, como parece ser o caso da atividade inflamatória no desenvolvimento da insuficiência cardíaca na infecção pelo *T. cruzi* (Higuchi et al., 1993). Ainda é preciso considerar que a susceptibilidade genética a infecções raramente segue um simples padrão de herança mendeliana, exceto em raros casos familiares em que os defeitos ocorrem em um único gene (Segal & Hill, 2003).

Mais estudos se fazem necessários para apontar os polimorfismos que estariam diretamente relacionados ao acometimento cardíaco da doença de Chagas, principalmente se considerarmos que as metaloproteinases e seus inibidores podem ser regulados após a transcrição. Assim, outros fatores não genéticos podem ser mais atuantes da modulação da atividade dessas proteínas. Cabe ressaltar ainda que alterações epigenéticas, que alteram a funcionalidade de um gene sem alterar a estrutura primária do DNA (Feil & Fraga, 2012), também podem estar presentes.

Nossos resultados mostraram que a atuação da MMP-9 parece ser um dos fatores importantes do desenvolvimento do processo patológico da fibrose cardíaca na doença de Chagas. Além disso, o envolvimento das MMPs 2 e 9 parece ser diferencial entre as formas clínicas da doença de Chagas, como ilustrado na Figura 32. Acreditamos que quando existe um predomínio da MMP-9, a inflamação e o remodelamento cardíaco são intensificados, favorecendo o desenvolvimento da forma cardíaca. Quando os níveis de MMP-2 são predominantes, a inflamação e o remodelamento cardíaco são menos intensos e os pacientes permanecem na fase indeterminada. Ressaltamos ainda, a partir dos nossos resultados, que os níveis dessas MMPs parecem não ser influenciados pela genética do hospedeiro.

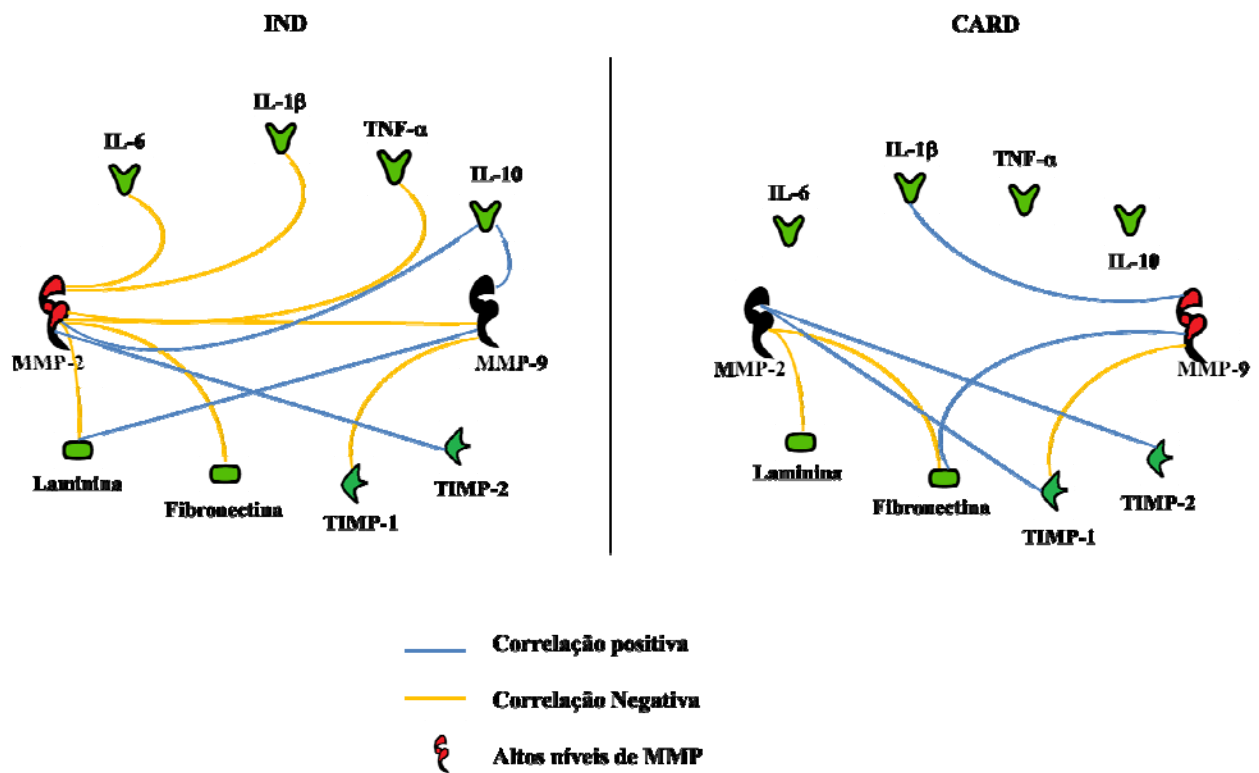


Figura 32 – Esquema representativo dos principais resultados encontrados

CONCLUSÃO

Podemos concluir que pacientes portadores da forma clínica CARD possuem alteração no sistema de degradação da matriz com níveis aumentados da MMP-9, além de aumento do potencial de atividade proteolítica dessa enzima, o que intensifica a inflamação no ambiente cardíaco e contribui para a patogênese da cardiomiopatia chagásica.

Nossos dados são inovadores e representam um avanço no conhecimento dos mecanismos envolvidos no estabelecimento e manutenção da patologia cardíaca da doença de Chagas.

ANEXO I

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 ARE DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN PATIENTS WITH INDETERMINATE AND CARDIAC CLINICAL FORMS OF CHAGAS DISEASE

Running Title: Metalloproteinases 2 and 9 in Chagas disease

Rafaelle Christine Gomes Fares¹; Juliana de Assis Silva Gomes²; Luciana Ribeiro Garzoni³; Mariana Caldas Waghabi⁴; Roberto Magalhães Saraiva⁵; Nayara Ingrid de Medeiros¹; Roberta Oliveira Prado¹; Luiz Henrique Conde Sangenis⁵; Mayara da Costa Chambela⁵; Fernanda Fortes de Araújo¹, Andréa Teixeira-Carvalho¹, Marcos Paulo Damásio²; Vanessa Azevedo Valente²; Karine Silvestre Ferreira²; Giovane Rodrigo de Sousa⁶; Manoel Otávio da Costa Rocha⁶; Rodrigo Correa-Oliveira^{1,7#}.

(1) Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ, Belo Horizonte/MG, Brasil; (2) Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte/MG, Brasil; (3) Laboratório de Ultra-estrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, Brasil; (4) Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, Brasil; (5) Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, Brasil; (6) Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, UFMG, Belo Horizonte/MG; Brasil; (7) Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais INCT-DT.

Institution at which the work was performed: Avenida Augusto de Lima, 1.715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, 30.190-002, Brasil.

A conflict of interest statement: The authors have declared that no competing interests exist.

#Corresponding author contact information: Rodrigo Correa Oliveira, Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz-BH. Avenida Augusto de Lima, 1.715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, 30.190-002, Brasil. e-mail: correa@cpqrr.fiocruz.br. Phone/Fax: (31) 3349-7701/ (31) 3295-3115.

ABSTRACT

Dilated chronic cardiomyopathy (DCC) from Chagas disease is associated with myocardial remodeling and interstitial fibrosis, resulting in extracellular matrix (ECM) changes. In this study, we characterized for the first time, the serum MMPs 2 and 9 levels, as well as their main cell sources in peripheral blood mononuclear cells from patients presenting the indeterminate (IND) or cardiac (CARD) clinical forms of Chagas disease. Our results showed that serum levels of MMP-9 are associated with the severity of Chagas disease. The analysis of MMPs production by T lymphocytes showed that CD8⁺ T cells are the main mononuclear leucocytes source of both MMP-2 and MMP-9 molecules. Using a new 3-dimensional model of fibrosis we observed that serum from patients with Chagas disease induced an increase in the extracellular matrix components in cardiac spheroids. Furthermore, MMP-2 and MMP-9 showed different correlation with matrix proteins and inflammatory cytokines in patients with Chagas disease. Our results suggest that MMP-2 and MMP-9 show distinct activities in Chagas disease pathogenesis. While MMP-9 seems to be involved with the inflammation and cardiac remodeling of Chagas disease, MMP-2 does not correlate with inflammatory molecules.

Key Words: Metalloproteinases, Chagas disease, Cardiomyopathy, Cardiac Remodeling, Fibrosis, Immune cells.

INTRODUCTION

Chagas disease, a neglected disease caused by *Trypanosoma cruzi*, remains a serious public health problem and affects about 10 million people in Latin America ⁽¹⁾. During the chronic phase, most patients remain in the asymptomatic clinical form (indeterminate) that can last all their life time. However, about 20 to 30% of the patients develop the cardiac form of the disease which can be complicated by cardiac arrhythmias, heart failure, stroke and sudden death ^(2,3). Chagas heart disease is characterized by an intense myocarditis of an inflammatory nature with a progressive fibrotic process affecting the myocardium of both ventricles which leads to myocardial remodeling, interstitial fibrosis and changes in the extracellular matrix (ECM) ^(4,5,6). The ECM remodeling is regulated by proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs) ⁽⁷⁾.

MMPs are important enzymes that participate in many physiological and pathological conditions by degrading ECM molecules (e.g. collagen, laminin, fibronectin) and by releasing cryptic epitopes from the ECM ⁽⁷⁻¹¹⁾. However, these enzymes have a spectrum of biological functions and also act on several biomolecules, including cytokines, hormones and chemokines ^(7,8).

Among the MMPs, MMP-2 and MMP-9 are well known for their involvement in the pathogenesis of a wide spectrum of cardiovascular disorders ^(9,10,12-14,24,25) and are able to degrade all components of the heart matrix contributing to the ECM remodeling that occurs with progressive ventricular dilatation ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

The participation of MMP-2 and MMP-9 has already been studied in experimental *T. cruzi* infection. Gutierrez et al., 2008 ⁽¹⁵⁾ showed in experimental *T. cruzi* infection that the inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreased inflammation and improved the prognosis of the infected animals. However, the involvement of MMPs in human Chagas disease has not been explored yet. In this study, we showed for the first time that MMP-2 and MMP-9 as well as

IL-1 β and TNF- α may be differentially involved in cardiac remodeling in patients at the indeterminate and cardiac forms of Chagas disease.

POPULATION, MATERIALS AND METHODS

Study Population

The patients with Chagas disease who agreed to participate in this study were identified and selected of the Referral Outpatient Center for Chagas Disease at the Clinical Hospital at the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil, and of Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC) at FIOCRUZ-RJ, Brazil. Patients who consented to participate in this study were enrolled in a prospective cohort study initiated 15 years ago as previously described ⁽¹⁶⁾. The patients were grouped as indeterminate (IND) and cardiac (CARD) patients as previously reported ^(5,6). The IND group included individuals ranging in age from 36 to 65 years old (average age 53 ± 17 years), with no significant alterations in their electrocardiograms, chest x-rays, echocardiograms, esophagograms and barium enemas. The CARD patients included individuals ranging in age from 35 to 69 years old (average age 52 ± 17 years). All patients of the CARD group presented dilated cardiomyopathy and heart failure and their left ventricle ejection fraction averaged $42\% \pm 14\%$). Healthy individuals, ranging in age from 30 to 49 years old (average age 39 ± 9 years), with normal physical examination, electrocardiogram and echocardiogram and negative serological tests for Chagas disease were included as a control group (NI).

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all individuals prior to their inclusion in the study. This study was carried out in full accordance with all International and Brazilian accepted guidelines and was approved by the Ethics Committee at Centro de Pesquisas René

Rachou- FIOCRUZ (15/2011 CEPISH-IRR), UFMG (ETIC 001/97) and IPEC (CAAE 0058.0.009.000-09).

Serum MMP-2 and MMP-9 measurement

Ten milliliters of peripheral blood were collected without anticoagulant for serum separation. MMP-2 and MMP-9 concentrations were determined using Milliplex Kit (Lifescience, BR) with Luminex™ xMAP technology. The assay was performed according to the manufacturer's instructions at the serum dilution of 1:20. Briefly, this methodology uses digital signal processing capable of classifying polystyrene beads (microspheres) dyed with distinct proportions of two fluorophores. A fluorescently Streptavidin-PE conjugate antibody is added for the identification of MMPs concentration by their mean fluorescence intensity (MFI). The results were expressed in ng/mL.

Gelatin zymography

MMP2 and MMP-9 were examined by gelatin zymography of serum samples. Forty micrograms of protein from serum were electrophoresed through a 12% polyacrylamide gel copolymerized with gelatin (1 mg/mL, type A from porcine skin; Sigma). After electrophoresis, the gels were washed with 2.5% Triton X-100 diluted in 50mM Tris pH 7.5 and incubated overnight at 37° C in 50mM Tris and 10mM CaCl₂ solution. Staining was performed using Coomassie Blue Brilliant (R-250, Bio-Rad), and the gels were destained using specific solution (250mL ethanol, 80mL acetic acid). Clear gelatinolytic bands on a uniform blue background were measured by densitometry with the image analyzer GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad). Band intensities were quantified using Quantity One software.

Flow cytometric analysis of peripheral blood

Whole blood was collected in Vacutainer tubes containing EDTA (Becton Dickinson, USA) and 100 µL samples were mixed in tubes with 2 µL of undiluted monoclonal antibodies

conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP) or allophycocyanin (APC) for the following molecules: CD14 (MΦP9), CD8 (HIT8a), CD8 (SK1), CD4 (RPA-T4) from BD Pharmingen USA. After adding the antibodies, the cells were incubated and washed after erythrocyte lysis. The cells were then permeabilized and incubated with monoclonal antibodies against MMP-2 (1A10) or MMP-9 (56129) (R&D Systems, USA) conjugated with PE or FITC, respectively. After incubation, the cells were fixed and phenotypic analyses performed by flow cytometry using a Becton Dickinson FACScalibur cytometer. The analyses were performed using FlowJo software (Treestar, USA) gating the cells on 7×10^4 cells according to their forward and side scatter properties. The specific gating strategies were used to select the lymphocyte and monocyte population as previously described⁽¹⁷⁾.

Detection of cytokines and chemokines levels in serum by Cytometric Bead Array (CBA)

Cytometric beads array (CBA) immunoassay kit (BD Biosciences, USA) was used for TNF- α and IL-1 β measurements as recommended by the manufacturer and previously described^(16,18). Data were acquired in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and the analyses were performed using BD CBA software (Becton Dickinson). The results were expressed as pg/mL.

Primary cardiac-cell cultures and Cardiac spheroids serum treatment

Swiss Webster mice were obtained from CECAL-FIOCRUZ. They were bred and manipulated according to approved recommendations of the FIOCRUZ Ethics Committee for Animal Use (CEUA-FIOCRUZ protocol 232/04). The hearts of 18-day-old mice embryos were subjected to enzymatic dissociation using 0.05% trypsin and 0.01% collagenase in PBS (pH 7.2) at 37°C, as previously described⁽¹⁹⁾. To allow formation of cardiac spheroids (3D microtissues), 25×10^3 cardiomyocytes were plated in agarose coated 96-U-well plastic plates as described before⁽²⁰⁾. After one week of culture, 3D microtissues were incubated in DMEM

containing 5% serum from patients with Chagas disease or non-infected individuals in 24-well plate. The cultures were maintained at 37°C, 5% of CO₂ for 72 hours.

Immunoblotting

The technique was performed as previously described ^(21,22). Briefly, after serum treatment, cardiac spheroids were washed, lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM ethylene glycol-bis-(b-amino-ethyl ether) N,N,N',N'-tetra-acetic acid, pH 8.0 and protease inhibitors cocktail (Sigma)], sonicated and the protein concentration measured using the RC-DC protein quantification kit (BioRad). Proteins in the lysates (10µg/lane) were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (12%), followed by transfer and incubation with specific antibodies. The antibodies used were anti-MMP-2 (1:1.000), anti-MMP-9 (1:1.000), anti-laminin (1:1.000), anti-fibronectin (1:5.000), anti-connexin43 (1:10.000), all from Sigma, and rabbit polyclonal anti-collagen type 1 (1:5.000) from Novatec. After incubation with a secondary goat anti-rabbit-HRP IgG and secondary goat anti-mouse-HRP IgG antibody (PIERCE Thermo Scientific), the membranes were washed and incubated with chemoluminescent kit Super Signal West Pro (Pierce Biotechnology), and exposed to X-Ray film. Films were scanned and protein quantification performed with Quantity One software. Western blot results were normalized by values of GAPDH for each sample in the same gel.

Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 software (San Diego, USA). The following nonparametric tests were performed: Mann-Whitney test, when comparing two groups, and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test post-hoc analysis, when comparing three groups or more. Correlation analyses were done using Pearson's correlation coefficient (JMP software, SAS). In all cases, significance was considered at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Serum levels of MMP-9 are associated with the severity of Chagas disease

Several studies have shown that extracellular matrix degradation by MMPs, specifically MMP-2 and MMP-9 are involved in the pathogenesis of a wide spectrum of cardiovascular disorders^(9,12-14,23,24). In order to investigate the involvement of these MMPs in Chagas disease, we measured the serum levels of MMP-2 and MMP-9 from patients with Chagas disease and non-infected individuals by milliplex assay and zymography. Milliplex is based on immunoreactivity and may also measure MMP-TIMP complex (indistinguishable from free MMP) and degradation products. On the other hand, zymography visualizes just enzyme forms, not MMP-TIMP complex, and this type of analysis might give the false impression that the samples contain activity^(25, 26). The results of milliplex assay showed that patients from the CARD group presented higher serum levels of MMP-2 when compared with IND ($p=0.006$) and NI ($p=0.002$) groups (Figure 1A). The MMP-9 serum levels from the CARD group were also higher than those from the NI group ($p=0.04$) (Figure 1A). Aiming to compare the MMP-9 and MMP-2 levels, we have calculated the relative index considering MMP-9/MMP-2 ratio. Although the serum MMP-9 levels were higher than MMP-2, the MMP-9/MMP-2 ratio did not show any significant differences between the groups (Figure 1A).

Gelatin zymography was carried out on serum from the same patients in order to confirm the above described results. MMP-2 levels were undetectable in serum samples from NI individuals and no statistical difference was observed between IND and CARD groups (Figure 1B). The results still showed that MMP-9 levels was higher in serum samples from CARD group when compared with IND group ($p=0.003$). Moreover, MMP-9 levels was lower in serum samples from IND group when compared with NI individuals ($p=0.002$) (Figure 1B). The MMP-9/MMP-2 level ratios were similar between IND and CARD groups

(Figure 1B). A correlation analysis between the Milliplex and zymography data was done, but significant correlations were not found (data not shown).

CD8⁺ T cells are the main mononuclear leukocyte source of MMP-2 and MMP-9 molecules

The increased levels of MMP-9 in serum samples from CARD patients, suggested a role of this MMP in the pathogenesis of cardiomyopathy. Some previous studies showed that monocytes/macrophages and lymphocytes are able to secrete MMPs^(27,28). Considering that monocytes/macrophages and lymphocytes are important during *T. cruzi* infection and play a major role in driving distinct patterns of the immune response in IND and CARD groups^(29,30), we investigated the frequencies and cellular sources of MMP-2 and MMP9 producing cells within the mononuclear leucocytes population. Our findings demonstrated that both CD4⁺ and CD8⁺ T cells from IND and CARD patients presented a higher intracellular expression of MMP-2 than CD4⁺ and CD8⁺ T cells from NI individuals ($p < 0.005$) (Figure 2A). On the other hand, only the CARD group showed a higher percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells co-expressing MMP-9 when compared with NI group ($p < 0.005$) (Figure 2B). However, no difference was observed in the MMP-2 or MMP-9 expressions by monocytes (CD14⁺ cells) in all groups (Figure 2A and B).

In order to identify the most relevant source of MMP-2 and MMP-9 within the mononuclear cell subsets, additional analysis was carried out in order to provide evidences regarding the number of MMP-2⁺ and MMP9⁺ mononuclear cells (Figure 3). Our results showed that in all groups CD8⁺ T cells are the main cell source for MMP-2 production when compared to the other cells evaluated (Figure 3A). Furthermore, in patients with Chagas disease the majority of MMP-9 production was also derived from CD8⁺ T cells (Figure 3B).

Serum from patients with Chagas disease induced an increase in the extracellular matrix components in cardiac spheroids

We performed three-dimensional cardiomyocyte-culture experiments to test whether the serum from patients with Chagas disease is capable to induce the expression of extracellular matrix proteins by cardiomyocytes. Our results showed a higher expression of collagen type I when spheroids were incubated in contact with serum from IND and CARD groups than with serum from NI group ($p=0.003/p=0.001$, respectively) (Figure 4). The fibronectin and MMP-2 expression were higher in spheroids stimulated with serum from IND group when compared with serum from the NI group ($p=0.01/p=0.03$, respectively) (Figure 4). On the other hand, laminin and MMP-9 expression were not different between the groups. However, we observed a tendency of higher expression of MMP-9 in spheroids in contact with serum from CARD patients (Figure 4).

MMP-2 and MMP-9 are correlated with the cardiac spheroid remodeling induced by serum of patients with Chagas disease

The MMPs are involved in the remodeling of the cardiac tissue by degrading ECM molecules^(7,31). In order to confirm if the presence of MMPs correlates with ECM proteins and a possible role of these molecules in the cardiac remodeling of Chagas disease, we performed a correlative analysis. A significant negative correlation was seen between MMP-2 expression and laminin expression in all groups (Figure 5A). However, a significant positive correlation was observed between MMP-9 expression and laminin expression in IND group (Figure 5A). Regarding fibronectin, a significant negative correlation was seen between MMP-2 expression and fibronectin expression in IND and CARD groups (Figure 5A). However, a significant positive correlation was observed between MMP-9 expression and fibronectin expression in CARD group (Figure 5A). There was no significant correlation between MMPs and collagen expression in the studied groups (data not shown).

MMP-9 seems to be involved with the inflammation and cardiac remodeling of Chagas disease, whereas MMP-2 does not correlate with inflammatory molecules.

Our next step was to analyze the correlation between TNF- α and IL-1 β serum levels and MMPs levels measured by zymography, since TNF- α and IL-1 β are the main cytokines involved in MMPs activation ^(10,32,33). A significant negative correlation was seen between MMP-2 levels and IL-1 β serum levels in IND group (Figure 5B). However, a positive correlation was observed between MMP-2 levels and IL-1 β serum levels in the CARD group (Figure 5B). A negative correlation was seen between MMP-9 levels and IL-1 β serum levels in IND group (Figure 5B). On the other hand, a significant positive correlation was observed between MMP-9 levels and IL-1 β serum levels in CARD group (Figure 5B). Regarding TNF- α levels, a significant negative correlation was seen between MMP-2 levels and TNF- α levels in IND group (Figure 5B). However, no significant correlation was observed either between MMP-2 levels and TNF- α levels in CARD group (Figure 5B) or between MMP-9 levels and TNF- α levels in both IND and CARD groups (Figure 5B).

Overall, our results suggest that MMP-2 and MMP-9 as well as IL-1 β and TNF- α may be differentially involved in cardiac remodeling in the IND and CARD groups, respectively.

DISCUSSION

Chronic Chagas disease has a great variety of clinical presentations even within patients with the cardiac form. Although the classification of the cardiac form into stages helps to distinguish patients with worse prognosis ⁽³⁴⁾, sudden death and other major clinical events still occur among patients at initial stages of Chagas heart disease. Therefore, one of the most important goals of studying physiopathological mechanisms in Chagas disease is the identification of potential risk factors for the occurrence of major clinical events (sudden death, heart failure, malignant arrhythmias, stroke) or disease progression among patients still at the indeterminate form or at initial stages of the cardiac form^(5,6). Chagas heart disease is characterized by an intense and progressive fibrotic process ⁽⁴⁾ and the study of biomarkers

involved in the establishment and development of fibrosis is essential to identify such potential risk factors ⁽³⁵⁾.

In this study, we characterized for the first time the serum levels of MMPs 2 and 9, their potential proteolytic activity as well as their main sources within mononuclear cells in human Chagas disease. Although there are no reports about the putative role of MMPs in human Chagas disease, the involvement of MMPs in other cardiac diseases has been largely studied, particularly in cardiac matrix remodeling that occurs in heart failure and after acute myocardial infarction ^(12-14,36,37).

Our results showed that patients with Chagas heart disease complicated by heart failure present higher serum levels of MMP-9 (Figure 1). Moreover, experimental studies pointed out that MMP serum levels may be associated with cardiovascular complications of hypertension ⁽³⁹⁾. Polyakova et al., 2010 ⁽¹⁴⁾ showed that elevated expression of MMP-2 and MMP-9 is associated with collagen maturation in heart failure, demonstrating an important role of these enzymes in fibrosis through collagen configuration, activation and deposition. In experimental models of Chagas disease, high MMP-2 and 9 proteolytic activity had already been described, which suggested an important role for MMPs in *T. cruzi*-induced acute myocarditis ⁽¹⁵⁾. Here, we showed elevated levels of these enzymes in chronic Chagas disease. Furthermore, the ratio analysis showed that MMP-9 levels were higher than that of MMP-2 (Figure 1A), which is corroborated by others ⁽¹²⁾ who described that MMP-2 is produced at lower levels by several cells, when compared with MMP-9 levels.

Our group has previously showed the essential role of immune cells, such as monocytes ⁽⁴¹⁾ and lymphocytes ^(16,42) in Chagas disease pathogenesis. In the present study, we observed that CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and CD14⁺ monocytes are able to produce MMP-2 and MMP-9 (Figure 2), corroborating with published data ^(25,26,43). Moreover, MMP-9 production was higher in CD8⁺ T lymphocytes from CARD group. Furthermore, the analysis

of mononuclear cells contribution for MMP-2 and MMP-9 production showed that CD8⁺ T lymphocytes were the major mononuclear cell contributor for MMP-2 production in all groups (Figure 3A) and were also highlighted as cellular contributor for MMP-9 production in patients with Chagas disease (Figure 3B). The participation of MMPs in immune cells migration has been already demonstrated⁽¹⁵⁾, and their production by lymphocytes could be justified, especially because CD8⁺ T lymphocytes are the main inflammatory cell source in heart during Chagas disease⁽⁴⁴⁾. Other immune cells, such as neutrophils⁽²⁵⁾, and many different cell types including cardiomyocytes, fibroblasts, and endothelial cells^(25, 27) are able to produce and secrete MMP-2 and MMP-9. All of them are found in a myocarditis scenario and are able to contribute to the MMP-2 and MMP-9 serum levels measured in this paper and, more important, to the MMP-2 and MMP-9 active in the myocardium of the patients with Chagas disease.

In this paper, we used the three-dimensional (3D) cardiomyocyte-culture system, which is a new strategy for the study of Chagas disease pathogenesis that presents a great similarity to the *in vivo* studies⁽²⁰⁾, in order to verify the impact of serum from patients with Chagas disease over cardiac spheroids. The serum from IND and CARD groups induced an overexpression of matrix proteins (Figure 4), suggesting the existence of different soluble factors which could be able to influence the matrix proteins expression, since serum from IND group induced fibronectin and MMP-2 expression whereas serum from CARD group showed a tendency to induce MMP-9 expression. All matrix proteins are essential for the maintenance of ECM architecture, and an abnormal expression of them may contribute to pathological processes. The digestion process of matrix proteins by MMPs does not necessarily reduce the quantity of these proteins, but on the contrary, may release growth factors and other molecules capable of inducing the synthesis of additional matrix proteins, increasing the proteins deposition on ECM⁽¹²⁾. The correlation analysis showed that while MMP-2 had a

negative correlation with fibronectin and laminin, MMP-9 showed a positive correlation with both proteins (Figure 5A). These results led us to hypothesize that MMP-9 may act on the inflammatory process whereas MMP-2 would have an anti-inflammatory effect. MMP-2 has been localized to the nucleus of cardiac cells where the protein would play a protective role by avoiding apoptosis⁽³¹⁾. Furthermore, increased MMP-9 and decreased MMP-2 were associated with left ventricular hypertrophy in patients with hypertension⁽⁴⁰⁾. In an experimental arthritis model, MMP-2 and MMP-9 had opposite roles for the progression of arthritis. While MMP-2 had a suppressive role, MMP-9 was associated with the development of inflammatory joint disease⁽⁴⁸⁾.

Our data also showed a negative correlation between MMP-2 and IL-1 β and TNF- α cytokines, while MMP-9 showed a positive correlation with these inflammatory cytokines in patients with chronic Chagas disease (Figure 5B). *T. cruzi*-infected cardiomyocytes elicit a strong immune response, characterized by the production of IL-1 β and TNF- α , which is associated with the hypertrophic effect in these cells⁽⁴⁷⁾. Moreover, MMP-9 can cleave and activate these cytokines, and thus intensify the process of cardiac remodeling^(8,46,47).

Heart failure is characterized by activation of different cytokines and enzymes including MMPs which have been implicated in the left ventricular remodeling ubiquitous to different heart failure etiologies⁽⁴⁹⁾. Thus, the increased MMPs values described by us could be a consequence of the heart failure per se and not a specific change secondary to Chagas disease. However, we also found changes in MMPs expression in the group of patients with the indeterminate form against controls. These patients do not have heart dilation or failure what favors the hypothesis of a specific change in MMPs expression contributing to Chagas disease physiopathology.

Overall, the results of the present study indicate that there is a different involvement of MMP2 and MMP-9 in Chagas disease pathogenesis. We hypothesize that whenever there is a

predominance of MMP-9 levels, the cardiac remodeling is intensified and favors the development of the cardiac form of Chagas disease. On the contrary, when the MMP-2 levels predominate, the cardiac remodeling is less intense and the patient remains at the indeterminate phase of the Chagas disease. Those processes may be IL-1 β and TNF- α dependent. These data are innovative and represent an advance in the knowledge of the mechanisms involved in the establishment/maintenance of the Chagas heart disease pathology.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant 478846/2009-6), Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; grant APQ-02601-10), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT and the National Institute of Health USA.

The authors thank the staff at the Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, FIOCRUZ for the technical assistance. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health - PDTIS - FIOCRUZ for use of its facilities. RCO, MOCR, ATC and JASG thank CNPq for fellowships (PQ).

REFERENCES

1. World Health Organization, WHO. Fact sheet N°340, August 2012. Available at: <http://www.who.int>. Accessed 29 October 2012.
2. **Moncayo A & Silveira AC.** 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104(Suppl I):17-30.

3. **Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM.** 2009. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.* 51:524-539.
4. **Nunes MP, Colosimo EA, Reis RC, Barbosa MM, da Silva JL, Barbosa F, Botoni FA, Ribeiro AL, Rocha MO.** 2012. Different prognostic impact of the tissue Doppler-derived E/e⁼ ratio on mortality in Chagas cardiomyopathy patients with heart failure. *J Heart Lung Transplant.* 31:634–641.
5. **Rocha MO, Ribeiro AL, Teixeira MM.** 2003. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci.* 1(8):44-54.
6. **Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL.** 2007. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 5(4):727-743.
7. **Geurts N, Opdenakker G, Van den Steen PE.** 2011. Matrix Metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacology & Therapeutics.* 133(3):257-279.
8. **Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS.** 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4:617-629.
9. **Nagase H, Visse R, Murphy G.** 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardio Research.* 69:562-573.
10. **Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G.** 2007. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov.* Jun;6(6):480-98.
11. **Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P.** 2010. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 61:205-209.

12. **Li YY, McTiernan CF, Feldman, AM.** 2000. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovascular Research.* 46:214–224.
13. **Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans, S.** 2006. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window. *Cardiovascular Research.* 69:604-613.
14. **Polyakova V, Loeffler I, Hein S, Miyagawa S, Piotrowska I, Dammer S, Risteli J, Schaper J, Kostin S.** 2010. Fibrosis in endstage human heart failure: Severe changes in collagens metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int J Cardiol.* 151(1):18-33.
15. **Gutierrez FR, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, Santos JE, Torres-Dueñas D, Cunha FQ, Schulz R, Silva JS.** 2008. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis.* 197(10):1468-1476.
16. **de Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RC, Ferreira KS, Nunes MC, Keesen TS, Damasio MP, Teixeira-Carvalho A, Gomes JA.** 2012. Foxp3⁺CD25^(high) CD4⁺ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology.* 217(8):768-777.
17. **Gomes JA, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Correa-Oliveira R.** 2003. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a non-balanced Th1 specific immune response. *Infect Immun.* 71(3):1185-1193.
18. **Chen QJ, Lu L, Peng WH, Hu J, Yan XX, Wang LJ, Zhang Q, Zhang RY, Shen WF.** 2009. Polymorphisms of MMP-3 and TIMP-4 genes affect angiographic

- coronary plaque progression in non-diabetic and type 2 diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*. 405:97–103.
19. **Meirelles MN, de Araujo Jorge TC, Miranda CF, de Souza W, Barbosa HS.** 1986. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur J Cell Biol*. 41(2):198-206.
 20. **Garzoni LR, Adesse D, Soares MJ, Rossi MI, Borojevic R, de Meirelles Mde N.** 2008. Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J Infectious Disease*. 197(6):906-15.
 21. **Adesse D, Lisanti MP, Spray DC, Machado FS, Meirelles Mde N, Tanowitz HB, Garzoni LR.** 2010. *Trypanosoma cruzi* infection results in the reduced expression of caveolin-3 in the heart. *Cell Cycle*. 9(8):1639-1646.
 22. **de Oliveira FL, Araújo-Jorge TC, de Souza EM, de Oliveira GM, Degraive WM, Feige JJ, Bailly S, Waghbi MC.** 2012. Oral administration of GW788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(6):e1696.
 23. **Opdenakker G.** 2001. New insights in the regulation of leukocytosis and the role played by leukocytes in septic shock. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 63(6):531-538.
 24. **Gao CQ, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, Csont T, Wozniak M, Ferdinandy P, Schulz R.** 2003. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res*. 57(2):426-433.
 25. **Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J.** 2001. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol*. Oct;22(10):571-9.

26. **Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G.** 2013. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods.* Mar;10(3):211-20.
27. **Brunner S, Kima JO, Methe H.** 2010. Relation of Matrix Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Ratio in Peripheral Circulating CD14⁺ Monocytes to Progression of Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology;* 105(4):429-434.
28. **Edsparr K, Basse PH, Goldfarb RH, Albertsson P.** 2011. Matrix Metalloproteinases in Cytotoxic Lymphocytes Impact on Tumour Infiltration and Immunomodulation. *Cancer Microenvironment;* 4:351–360.
29. **Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, Correa-Oliveira R.** 2005. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun.* 73(12):7960-6.
30. **Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, Coelho JS, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO.** 2007. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun.* 75(4):1886-1894.
31. **Mannello F & Medda V.** 2012. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Progress in Hist and Cytoc.* 47:27-58.
32. **Lockwood CJ, Oner C, Uz YH, Kayisli UA, Huang SJ, Buchwalder LF, Murk W, Funai EF, Schatz F.** 2008. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells. *Biol Reprod.* 78(6):1064-1072.

33. **Deschamps AM & Spinale FG.** 2006. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res.* 69(3):666-676.
34. **Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, Bocchi EA, Almeida DR, Fragata Filho AA, Moreira Mda C, Xavier SS, Oliveira Junior WA, Dias JC.** 2011. Sociedade Brasileira de Cardiologia. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *ChagásicaArq Bras Cardiol.*;97(2 Suppl 3):1-48.
35. **Menezes C, Costa GC, Gollob KJ, Dutra WO.** 2011. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. *Drug Dev Res. Sep*;72(6):471-479.
36. **Schulz R.** 2007. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: Rationale and therapeutic approaches. *Rev Pharmacol Toxicol.* 47(1):211-242.
37. **Adair-Kirk TL & Senior RM.** 2008. Fragments of Extracellular Matrix as Mediators of Inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(7):1101-1110.
38. **Matsunaga T, Abe N, Kameda K, Hagii J, Fujita N, Onodera H, Kamata T, Ishizaka H, Hanada H, Osanai T, Okumura K.** 2005. Circulating level of gelatinase activity predicts ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology.* 105:203–208.
39. **Kelly D, Cockerill G, Ng LL, Thompson M, Khan S, Samani NJ, Squire IB.** 2007. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J.* 28(6):711-718.
40. **Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE.** 2012. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta.* 413(7-8):656-662.

41. **Gomes JA, Campi-Azevedo AC, Teixeira-Carvalho A, Silveira-Lemos D, Vitelli-Avelar D, Sathler-Avelar R, Peruhype-Magalhães V, Silvestre KF, Batista MA, Schachnik NC, Correa-Oliveira R, Eloi-Santos S, Martins-Filho OA.** 2012. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. *Immunobiology.* 217(10):1005-1016.
42. **Keesen TS, Gomes JA, Fares RC, de Araújo FF, Ferreira KS, Chaves AT, Rocha MO, Correa-Oliveira R.** 2012. Characterization of CD4⁽⁺⁾ Cytotoxic Lymphocytes and Apoptosis Markers Induced by *Trypanosoma cruzi* Infection. *Scand J Immunol.* 76(3):311-319.
43. **Clark RT, Nance JP, Noor S, Wilson EH.** 2011. T-cell production of matrix metalloproteinases and inhibition of parasite clearance by TIMP-1 during chronic *Toxoplasma* infection in the brain. *ASN Neuro.* 3:1-12.
44. **Reis DD; Jones EM; Chapadeiro E; Tostes S; Gazzinelli G; Colley DG, McCurley T.** 1993. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF-alpha and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 48(5):637-644.
45. **Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, McClure CD, Spinale FG, Zile MR.** 2006. Matrix Metalloproteinases/Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Relationship Between Changes in Proteolytic Determinants of Matrix Composition and Structural, Functional, and Clinical Manifestations of Hypertensive Heart Disease. *Circulation.* 113:2089-2096.
46. **Aoki MP, Carrera-Silva EA, Cuervo H, Fresno M, Gironès N, Gea S.** 2012. Nonimmune cells contribute to crosstalk between immune cells and inflammatory

- mediators in the innate response to *Trypanosoma cruzi* infection. Journal of Parasitology Research. Article ID 737324.
47. **Manque PA, Probst CM, Pereira MC, Rampazzo RC, Ozaki LS, Pavoni DP, Silva Neto DT, Carvalho MR, Xu P, Serrano MG, Alves JM, Meirelles Mde N, Goldenberg S, Krieger MA, Buck GA.** 2011. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. Infection and Immunity. 79 (5):1855-1862.
48. **Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R.** 2002. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. J Immunol. Sep 1;169(5):2643-7.
49. **Spinale FG, Janicki JS, Zile MR.** 2013. Membrane-associated matrix proteolysis and heart failure. Circ Res. Jan 4;112(1):195-208.

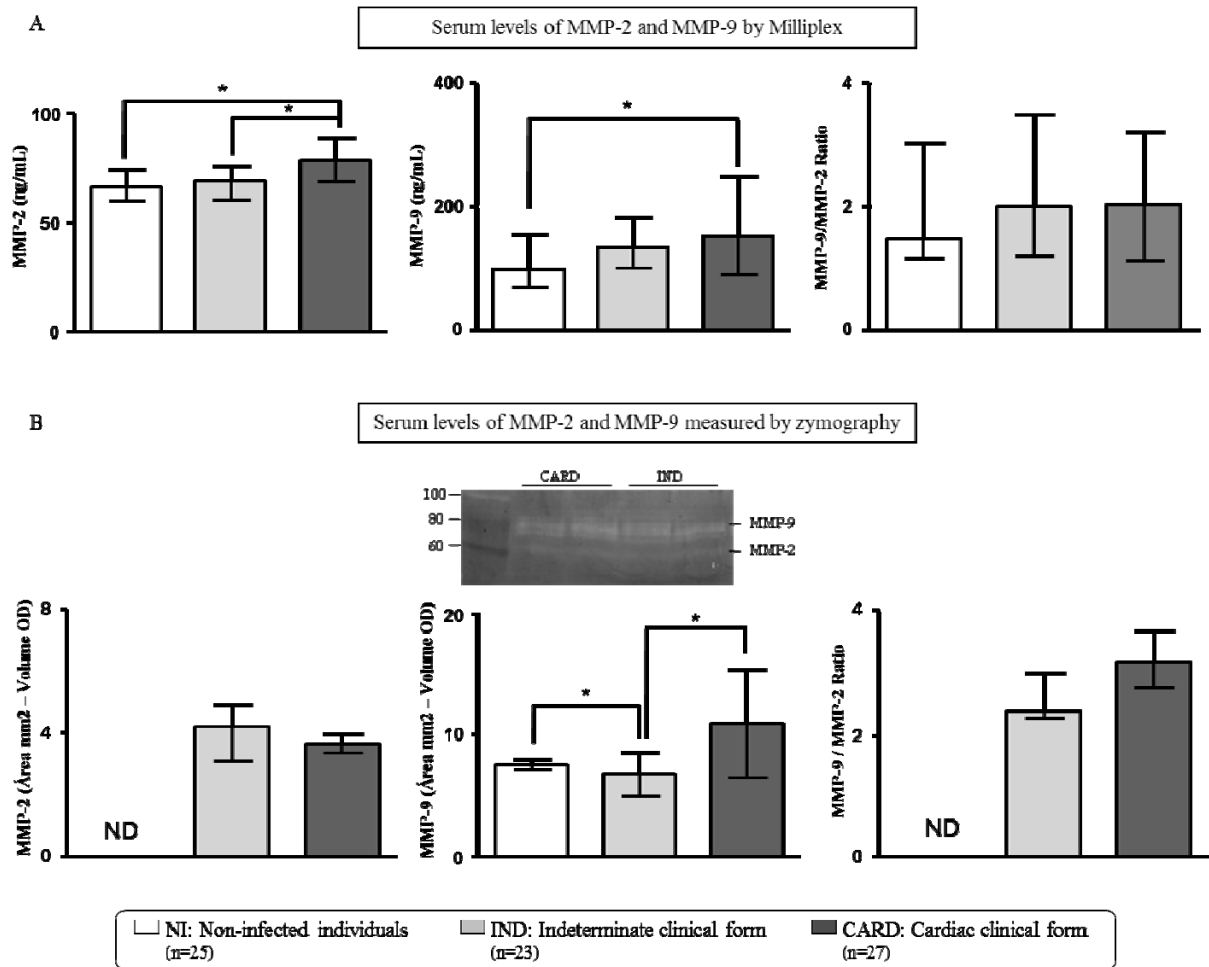


Figure 1 – Analysis of serum levels of MMP-2 and MMP-9.

The analysis of serum levels of MMP-2 and MMP-9 by milliplex assay (A) and by zymography (B) was performed as described in material and methods. The groups evaluated were: Indeterminate - IND (n=23, gray bars); Cardiac - CARD (n=27, dark gray bars) and non-infected individuals - NI (n=25, white bars). The serum levels data are expressed as median pg/mL of MMPs with interquartile range. The results of zymography were obtained by subtracting the values of the area (mm²) of the selected band, and the volume (OD), and are expressed as the median with interquartile range. The proteolytic band that indicates MMPs is represented in B. Significant differences (p<0.05) in the charts are identified by connecting lines and the symbol (*) for comparisons between the groups.

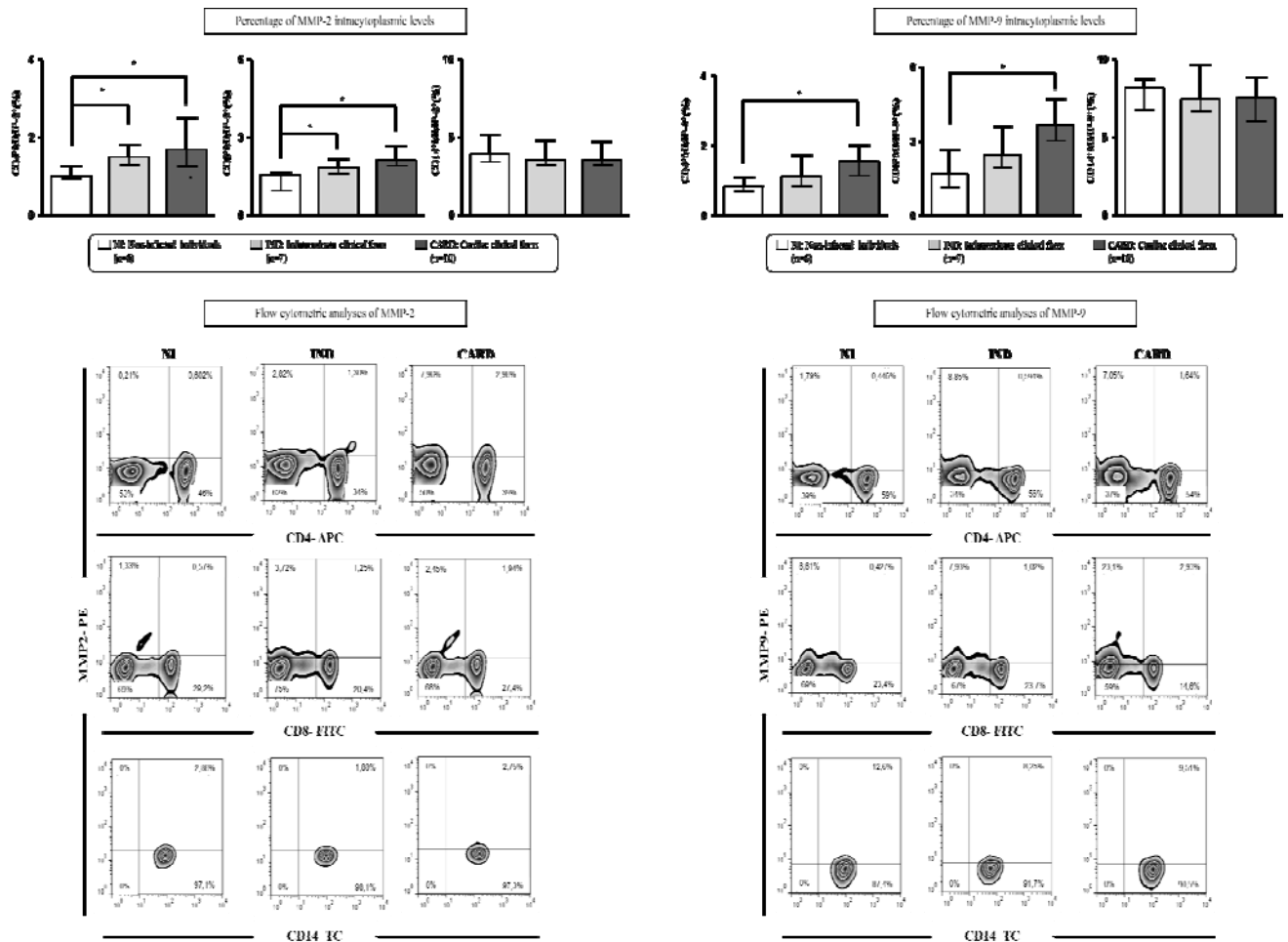


Figure 2 – Intracytoplasmic levels of MMP-2 and MMP-9 in lymphocytes and monocytes.

Ex vivo analysis of intracytoplasmic levels of MMP-2 (A) and MMP-9 (B). The groups evaluated were: Indeterminate - IND (n=7, gray bars); Cardiac - CARD (n=10, dark gray bars) and non-infected individuals - NI (n=6, white bars). Data are expressed as the median percentage of T lymphocytes and monocytes with interquartile range. Significant differences (p<0.05) in the charts are identified by connecting lines and the symbol (*) for comparisons between the groups.

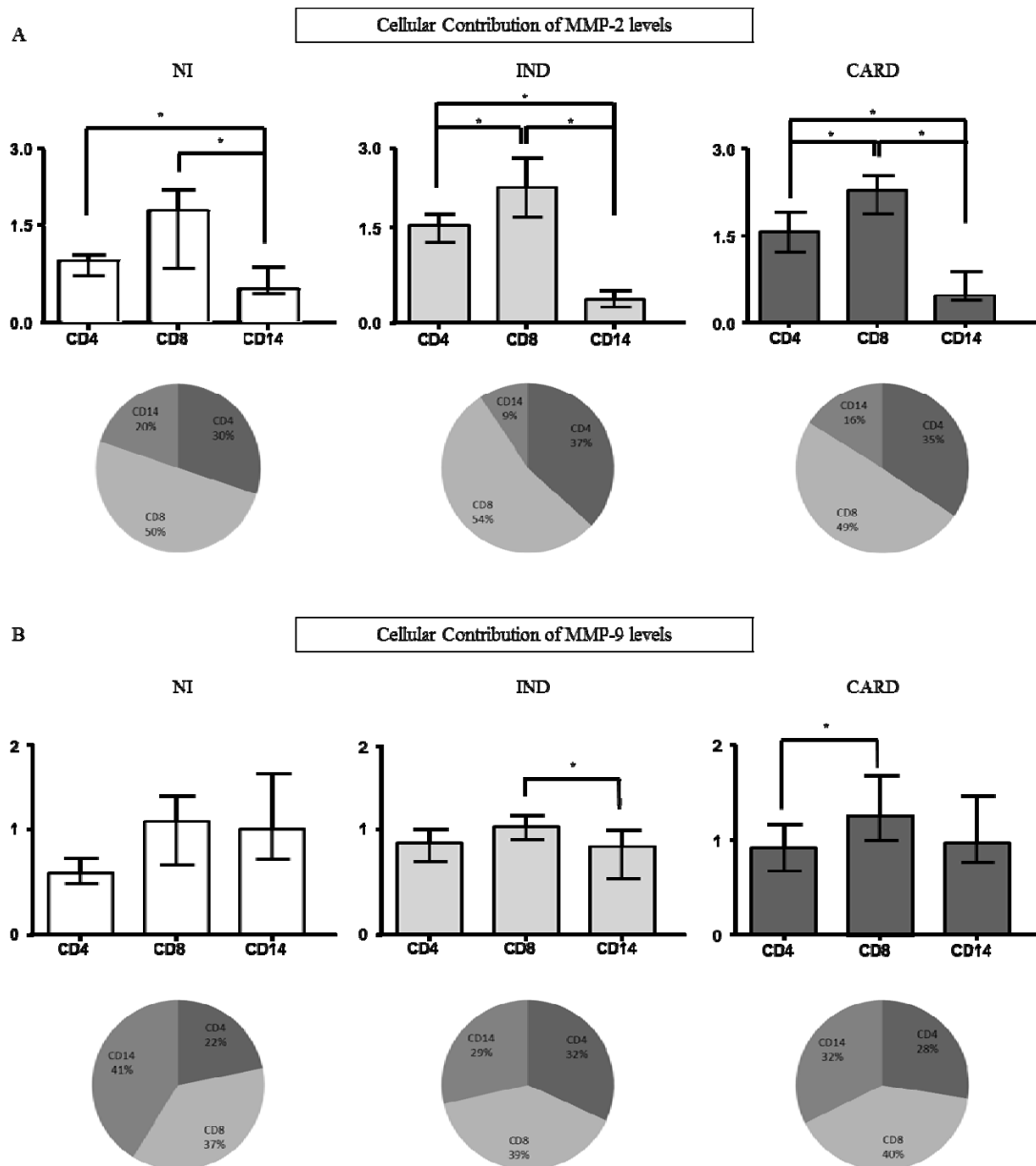


Figure 3 – Evaluation of MMP-2 and MMP-9-producing peripheral blood mononuclear cells and their subpopulations.

Analysis of the most relevant source of MMP-2 (A) and MMP-9 (B) within the mononuclear cell subsets. The cells evaluated were monocytes, CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes. Data are expressed as the median MMP-producing cells with interquartile range. The data also are showed by pie charts, which represents the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and CD14 monocytes within MMP2 and MMP9-producing mononuclear cells. Significant differences (p<0.05) in the charts are identified by connecting lines and the symbol (*) for comparisons between the groups.

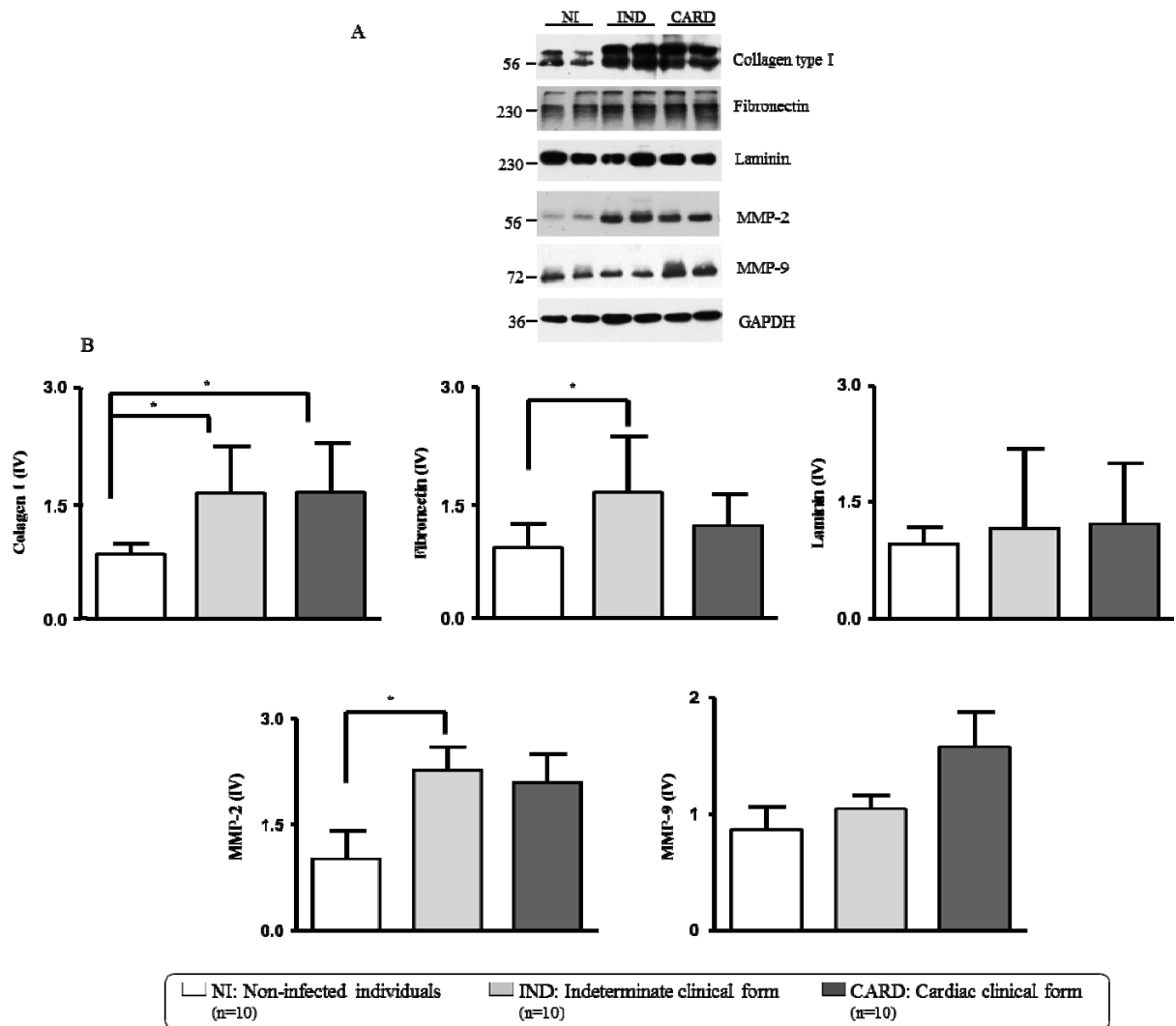


Figure 4 – Expression evaluation of matrix proteins expression in cardiac spheroids.

The bands that represent the expression of each matrix protein are showed in A. The matrix proteins (B) was evaluated from 3D microtissues incubated with serum from patients non-infected individuals - NI (n=10, white bars) and patients with Chagas disease, Indeterminate - IND (n=10, gray bars) and Cardiac - CARD (n=10, dark gray bars). Data are expressed as the mean of matrix protein expression \pm standard error. Significant differences ($p < 0.05$) in the charts are identified by connecting lines and the symbol (*) for comparisons between the groups.

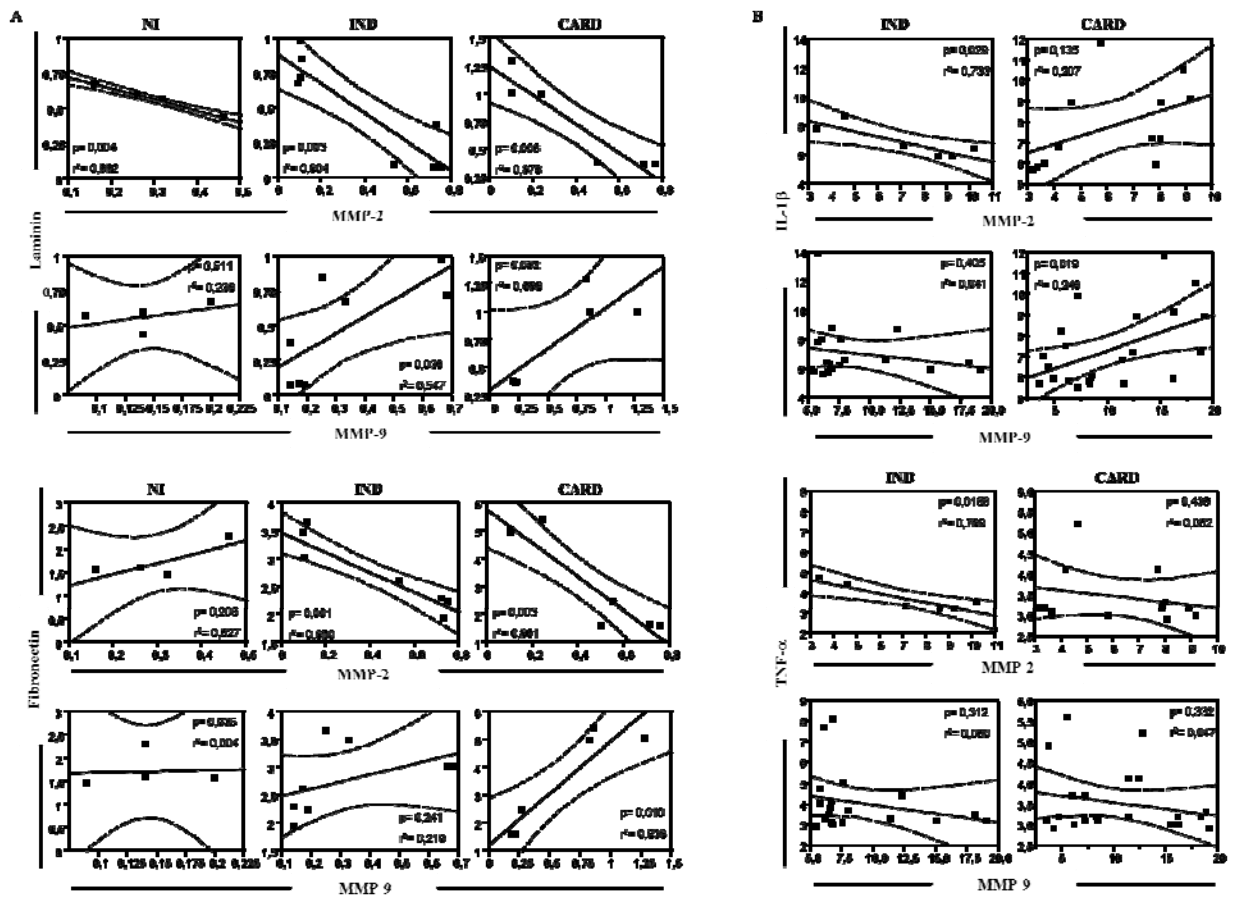


Figure 5 – Correlation analysis of MMP-2 and MMP-9 with matrix proteins and inflammatory cytokines.

Correlation analysis of MMP-2 and MMP-9 expression with laminin and fibronectin was done with data of cardiac spheroid culture (A). Correlation analysis MMP-2 and MMP-9 expression with IL-1β and TNF-α was done with data of serum (B). The Spearman correlation coefficient was used for correlation analysis and results were considered significant with a $p < 0.05$. Significant differences (p value) are indicated in each graph together with the r^2 value.

ANEXO II

CARTA DE ACEITE DO ARTIGO

Manuscript #	IAI00153-13R2
Title	MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 ARE DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN PATIENTS WITH INDETERMINATE AND CARDIAC CLINICAL FORMS OF CHAGAS DISEASE
Corresponding Author	Rodrigo Correa-Oliveira (René Rachou Research Center)
Date:	2013-03-26 13:00:58
Last Sent:	2013-03-26 13:00:58
Created By:	Redacted
From:	asmjournals@cfl.rr.com
To:	rafaelle@cpqrr.fiocruz.br
Subject:	IAI00153-13R2 Decision Letter
Email	<p>Dr. Rodrigo Correa-Oliveira René Rachou Research Center Laboratory of Cellular and Molecular Immunology Augusto de Lima, 1715. Belo Horizonte, Minas Gerais 30190-002 Brazil</p> <p>Re: IAI00153-13R2 (MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 ARE DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN PATIENTS WITH INDETERMINATE AND CARDIAC CLINICAL FORMS OF CHAGAS DISEASE)</p> <p>Dear Dr. Rodrigo Correa-Oliveira:</p> <p>I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted, and I am forwarding it to the ASM Journals Department for publication. For your reference, ASM Journals' address is given below. Before it can be scheduled for publication, your manuscript must be checked by the ASM production editor to ensure that all elements meet the technical requirements for publication. Diane Smith, the production editor for Infection and Immunity, will contact you if anything needs to be revised before copyediting and production can begin. Otherwise, you will be notified when your proofs are ready to be viewed.</p> <p>Corresponding authors who are active ASM members at the Contributing or Premium level are entitled to discounted page charges, reprint fees, and color figure fees. For 2013 issues, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$67 per printed page for the first eight pages and \$125 for each page in excess of eight for a corresponding author who is such an ASM member or \$135 per printed page for the first eight pages and \$250 for each page in excess of eight for a nonmember or Supporting member corresponding author. A corresponding author who is not a Contributing or Premium member may upgrade or join ASM to obtain the member rate. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals. For more details, including types of articles not charged, see the Instructions to Authors. Color charges for 2013 issues</p>

are \$170 per figure for a Contributing or Premium member corresponding author and \$375 per figure for a nonmember or Supporting member corresponding author. Please note that any figures you supplied in color will automatically be processed as color and you will be responsible for color costs.

To offset the costs associated with posting journal article supplemental material, ASM charges a flat fee for authors who wish to post supplemental material as an adjunct to their published article. The 2013 fee is \$190 for a Contributing or Premium member corresponding author or \$285 for a nonmember or Supporting member corresponding author, with a limit of 10 supplemental files per article. (Exceptions: Minireviews and Commentaries are exempt from this fee.)

ASM is also now offering authors the option of paying a fee to allow immediate open access to both the preliminary "Accepts" version and the final, typeset version of their articles. The 2013 fee is \$2,000 for a Contributing or Premium member corresponding author or \$3,000 for a nonmember or Supporting member corresponding author, which is in addition to current publication charges. The open access provided through NIH's PubMed Central repository is separate and will continue regardless; all primary research published in ASM journals is freely available through PubMed Central 6 months after publication. Please contact the ASM production editor immediately if you wish to pay the optional open access fee.

If you are interested in providing an illustration, related to this manuscript, for the cover of IAI, contact Dr. Beth McCormick at iai@umassmed.edu for details.

Note the following about publish ahead of print: For its primary-research journals, ASM posts online PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. This feature is called "IAI Accepts" and is accessible from the Journals website. The manuscripts are published online as soon as possible after acceptance, on a weekly basis, before the copyedited, typeset versions are published. They are posted "As Is" (i.e., as submitted by the authors at the modification stage), and corrections/changes are NOT accepted. Accordingly, there may be differences between the IAI Accepts version and the final, typeset version. The manuscripts remain listed on the IAI Accepts page until the final, typeset versions are posted, at which point they are removed from the IAI Accepts page. They are under subscription access control until 6 months after the typeset versions are posted, when access to all forms becomes free to everyone. Any supplemental material intended, and accepted, for publication is not posted until publication of the final, typeset article.

IMPORTANT NOTICE: Effective April 2008, the NIH initiated a policy requiring that all investigators funded by the NIH either submit or have submitted for them to the National Library of Medicine's PubMed Central an electronic version of their final peer-reviewed manuscripts upon acceptance for publication, to be made publicly available no later than 12 months after the official date of publication. Authors of ASM journal articles are automatically in compliance with this policy and need take no action themselves. For the past several years, the ASM has deposited in PubMed Central all publications from all ASM journals. Further, all primary ASM literature is made available to everyone, free, 6 months after publication through PubMed Central, HighWire, and international PubMed Central-like repositories. By having initiated these policies, the ASM is in full compliance with NIH policy.

Thank you for submitting your work to IAI.

Sincerely,
Joseph Urban
Editor, Infection and Immunity

Journals Department
American Society for Microbiology
1752 N St., NW
Washington, DC 20036
E-mail: dsmith@asmusa.org
Phone: 1-202-942-9288
Fax: 1-202-942-9355

ANEXO III

ABSTRACTS DOS ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO

BMC Infect Dis. 2012 Dec 27;12:380. doi: 10.1186/1471-2334-12-380.

Cytokine profile, proliferation and phosphorylation of ERK1/2 and Akt in circulating mononuclear cells from individuals during the chronic intestinal phase of Schistosomiasis mansoni infection.

Oliveira-Prado R, Caldas IR, Teixeira-Carvalho A, Andrade MV, *Fares RC*, Portugal LM, Gazzinelli A, Corrêa-Oliveira R, Cunha-Melo JR.

Abstract

BACKGROUND: The immune response to *Schistosoma mansoni* is characterized by a granulomatous reaction around the parasite eggs that are trapped in the host liver, and this reaction modulates the immune response during the chronic phase of the disease. The typical peripheral blood mononuclear cell (PBMC) response of patients during the chronic intestinal phase of infection is characterized by a decreased response to an *S. mansoni* soluble egg antigen. To obtain a greater understanding of *Schistosoma* infections, this study investigated the effects of the soluble egg antigen (SEA) and soluble adult worm antigen (SWAP) of *S. mansoni* on cellular proliferation, cytokine production, and ERK1/2 and Akt phosphorylation in PBMCs from infected (XTO) and egg-negative (NI) individuals living in the same endemic area. **METHODS:** The activation status was evaluated by cell immunophenotypic staining (cytometry). The cell proliferation assay was by CFSE method. Cytokine detection assay (Th1 and Th2) was by Cytometric Bead and Array phosphorylation status was by ELISA. **RESULTS:** The XTO, NI and BD (blood donor) individuals from an area not endemic for schistosomiasis were compared. The CD4(+) T lymphocyte proliferation rate was lower in the XTO group, but not the NI group, after SEA stimulation compared to the BD group. The CD8(+) T cell proliferation rate was lower in the XTO group in the unstimulated cultures and after both SEA and SWAP stimulation compared to the BD group. Cytokine analysis after either SEA or SWAP stimulation showed a balanced cytokine pattern in the XTO and NI groups. ERK1/2 and Akt phosphorylation were only marginally detected in all groups; however, a decrease in ERK 1/2 phosphorylation was observed in the SWAP-stimulated XTO group compared to both the NI and BD groups. **CONCLUSIONS:** The data indicate that SEA-stimulated CD4(+) T cells from infected patients have a lower proliferation rate than the

same cells from the NI group. Furthermore, we observed that SWAP stimulation influences ERK1/2 phosphorylation in the XTO group.

Immunobiology. 2012 Aug;217(8):768-77. doi: 10.1016/j.imbio.2012.04.008.

Epub 2012 May 9.

Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity.

de Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, *Fares RC*, Ferreira KS, Nunes MC, Keesen TS, Damasio MP, Teixeira-Carvalho A, Gomes JA.

Abstract

Immunoregulatory mechanisms are important to control the intense immune activity induced in Chagas disease. We evaluated the phenotypic profile and the mechanisms by which Treg cells function in patients with the indeterminate (IND) and cardiac (CARD) clinical forms of Chagas disease. The frequency of Foxp3(+)CD25(high) CD4(+)-T cells is augmented and correlated with the maintenance of a better cardiac function in IND. Treg cells from IND present suppressive activity, although the mechanism is not IL-10 or CTLA-4 dependent and are able to produce augmented levels of IL-17, IL-10 and granzyme B being its frequency correlated with percentage of Annexin V(+) CD4(+)-cells. In contrast, CARD presents higher frequency of IL-6(+), IFN-gamma(+), TNF-alpha(+) and CTLA-4(+) Treg-cells than IND. Thus, our data suggest that Treg cells have an important role in controlling the exacerbated immune response and morbidity in *Trypanosoma cruzi* infection, probably modulating the cytokine environment and/or killing effector cells.

Scand J Immunol. 2012 Sep;76(3):311-9. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02730.x.

Characterization of CD4⁺ cytotoxic lymphocytes and apoptosis markers induced by *Trypanosoma cruzi* infection.

Keesen TS, Gomes JA, *Fares RC*, de Araújo FF, Ferreira KS, Chaves AT, Rocha MO, Correa-Oliveira R.

Abstract

Although the pathophysiology of Chagas disease is not completely understood, it is widely accepted that involvement of the immune response is critical in determining the outcome of

the disease. In this context, CD4⁺ T cells may play an important role in generating different mechanisms of protection. In addition to effector and regulatory functions, CD4⁺ T cells may be also involved with lytic activities against the parasite and may have a relevant role on control of the infection. In this study, we have evaluated CD4⁺ T cells expressing cytotoxic and apoptosis markers in response to *Trypanosoma cruzi* infection in indeterminate (IND) and cardiac (CARD) patients with Chagas disease and non-infected individuals (NI). Our data demonstrated that: (1) CD4⁺ T cells presented higher ex vivo granzyme B expression in patients with Chagas disease compared with healthy individuals and that antigen induced a greater granzyme B expression in IND patients; (2) CD95L expression in CD4⁺ CD95⁺ T cells from IND patients is higher than in CARD and NI; (3) IND and CARD patients had an increased frequency of caspase-3 after in vitro stimulation and also expressed a high frequency of annexinV⁺ 7ADD⁺ within CD4⁺ T cells; (4) Lastly, a positive correlation was seen between cytotoxic molecules and CD45RO memory marker in CD4⁺ T cells and between caspase-3 and CD95L within CD4⁺ CD95⁺ T cells. These results suggest new insights into the functional competence of CD4⁺ T cells among the different clinical forms of Chagas disease, which will lead to a better understanding of their influence during immune responses against *T. cruzi*.

Hum Pathol. 2011 Feb;42(2):299-301. doi: 10.1016/j.humpath.2010.10.002.

Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease.

de Araújo FF, da Silveira AB, Correa-Oliveira R, Chaves AT, Adad SJ, Fiuza JA, *Fares RC*, Ferreira KS, Fujiwara RT, Silva Gomes JA.

PLoS Negl Trop Dis. 2009 Sep 9;3(9):e512. doi: 10.1371/journal.pntd.0000512.

Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease.

Fiuza JA, Fujiwara RT, Gomes JA, Rocha MO, Chaves AT, de Araújo FF, *Fares RC*, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Cançado GG, Correa-Oliveira R.

Abstract

BACKGROUND: Chronic Chagas disease presents several different clinical manifestations ranging from asymptomatic to severe cardiac and/or digestive clinical forms. Several studies have demonstrated that immunoregulatory mechanisms are important processes for the control of the intense immune activity observed in the chronic phase. T cells play a critical role in parasite specific and non-specific immune response elicited by the host against *Trypanosoma cruzi*. Specifically, memory T cells, which are basically classified as central and effector memory cells, might have a distinct migratory activity, role and function during the human Chagas disease. **METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS:** Based on the hypothesis that the disease severity in humans is correlated to the quality of immune responses against *T. cruzi*, we evaluated the memory profile of peripheral CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes as well as its cytokine secretion before and after in vitro antigenic stimulation. We evaluated cellular response from non-infected individuals (NI), patients with indeterminate (IND) or cardiac (CARD) clinical forms of Chagas disease. The expression of CD45RA, CD45RO and CCR7 surface molecules was determined on CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes; the pattern of intracellular cytokines (IFN-gamma, IL-10) synthesized by naive and memory cells was determined by flow cytometry. Our results revealed that IND and CARD patients have relatively lower percentages of naive (CD45RA(high)) CD4(+) and CD8(+) T cells. However, statistical analysis of ex-vivo profiles of CD4(+) T cells showed that IND have lower percentage of CD45RA(high) in relation to non-infected individuals, but not in relation to CARD. Elevated percentages of memory (CD45RO(high)) CD4(+) T cells were also demonstrated in infected individuals, although statistically significant differences were only observed between IND and NI groups. Furthermore, when we analyzed the profile of secreted cytokines, we observed that CARD patients presented a significantly higher percentage of CD8(+)CD45RA(high) IFN-gamma-producing cells in control cultures and after antigen pulsing with soluble epimastigote antigens. **CONCLUSIONS:** Based on a correlation between the frequency of IFN-gamma producing CD8+ T cells in the T cell memory compartment and the chronic chagasic myocarditis, we propose that memory T cells can be involved in the induction of the development of the severe clinical forms of the Chagas disease by mechanisms modulated by IFN-gamma. Furthermore, we showed that individuals from IND group presented more T(CM) CD4(+) T cells, which may induce a regulatory mechanism to protect the host against the exacerbated inflammatory response elicited by the infection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abilleira S, Bevan S, Markus HS. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. *J Med Genet.* 43:897–901, 2006.

Acosta AM & Santos-Buch CA Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation.* 71:1255-1261, 1985.

Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, McClure CD, Spinale FG, Zile MR. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation,* v.113, n.17, p.2089-2096, 2006.

Al-Sabbagh A, Garcia CA, Diaz-Bardales BM, Zaccarias C, Sakurada JK & Santos LM. Evidence for cross-reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein in experimental Chagas disease. *Exp. parasitol.* 89:304-311, 1998.

Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. *R J of Morphol and Embriol.* 48(4):323–334, 2007.

Andrade ZA. *Patologia da Doença de Chagas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p-201.

Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, Bocchi EA, Almeida DR, Fragata Filho AA, Moreira Mda C, Xavier SS, Oliveira Junior WA, Dias JC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *ChagásicaArq Bras Cardiol.*;97(2 Suppl 3):1-48, 2011.

Anez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara P & Ramirez JL. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am. j. trop. med. hyg.* 60:726-735,1999.

Aoki MP, Carrera-Silva EA, Cuervo H, Fresno M, Gironès N, Gea S. Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Parasitol Res.* 2012:737324, 2012.

- Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Soeiro Mde N, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of Trypanosoma cruzi infection and consequent Chagasic myocardopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19(5-6):405-13, 2008.
- Bahremand F, Vaisi-Raygani A, Kiani A, Rahimi Z, Tavilani H, Navabi SJ, Shakiba E, Hassanzadeh N, Pourmotabbed T. Matrix metalloproteinase-2 functional promoter polymorphism G1575A is associated with elevated circulatory MMP-2 levels and increased risk of cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* May;21(6):616-24. 2012.
- Barbosa RL, Dias VL, Pereira KS, Schmidt FL, Franco RM, Guaraldo AM, Alves DP, Passos LA. Survival In Vitro and Virulence of Trypanosoma cruzi in Açai Pulp in Experimental Acute Chagas Disease. *J Food Prot.* 75(3):601-6. 2012.
- Barreto MP. *Epidemiologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979.
- Beeghly-Fadiel A, Lu W, Long J, Shu X, Zheng Y, Cai Q, Gao YT, Zheng W. Matrix Metalloproteinase-2 Polymorphisms and Breast Cancer Susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18(6): 1770–1776, 2009.
- Bielecka-Dabrowa A, von Haehling S, Aronow WS, Ahmed MI, Rysz J, Banach M. Heart failure biomarkers in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* pii: S0167-5273(13)00199-X. 2013
- Bittencourt AL. Congenital Chagas disease. *Am. j. dis. child.;* 130:97-103. 1976.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F. Plasma Concentrations and Genetic Variation of Matrix Metalloproteinase 9 and Prognosis of Patients With Cardiovascular Disease. *Circulation.* 107:1579-1585, 2003.
- Bradbury J. Ancient footsteps in our genes: evolution and human disease. Gene variants selected during evolution may underlie many common diseases *Lancet.* 20;363(9413):952-3, 2004.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. 2005; p.816.
- Brener Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82:205-213, 1987.

- Brew K & Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 1803(1): 55–71, 2010.
- Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 30: 604—610, 2006.
- Brunner S, Kima JO, Methe H. Relation of Matrix Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Ratio in Peripheral Circulating CD14+ Monocytes to Progression of Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology*. 2010.
- Caldeira A, Meirelles Mde N, de Castro SL, Docampo R, Oldfield E, Ubina JA. Selective in vitro effects on the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents*. Mar 23(3):273-85, 2004.
- Carmignac V & Durbeej M. Cell–matrix interactions in muscle disease. *J Pathol*. 226: 200–218, 2012.
- Chagas C. Nova espécie mórbida do homem produzida por um *Trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi*). *Nota prévia*. *Brás Med*. 1909; 23:161.
- Chorley BN. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. *Mutation Research*. 659: 147-157, 2008.
- Clark RT, Nance JP, Noor S, Wilson EH. T-cell production of matrix metalloproteinases and inhibition of parasite clearance by TIMP-1 during chronic *Toxoplasma* infection in the brain. *Asn Neuro* 3(1), 2011.
- Cohn, J. N., Ferrarri, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.35, n.3, p.569-82, 2000.
- Consenso brasileiro em doença de Chagas. Ministério da Saúde, Secretaria De Vigilância Em Saúde. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 38, n. sIII, 2005.
- Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, Dutra WO. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis*. 1;199(3):451-4, 2009.

- Costa J & Lorenzo M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines – Chagas disease vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104(Suppl. I):46-51, 2009.
- Coura JR. Chagas disease: What is known and what is needed – a background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102(Suppl. I):113-122, 2007.
- Coura JR & Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104(Suppl.I):31-40, 2009.
- Cunha-neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of cardiac myosin –specific epitope crossreactive to na immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:3541-3545, 1995.
- Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity.* 39(1):41-54, 2006.
- Cunha-Neto E, Teixeira PC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmun Rev.;* 10(3):163-5, 2011.
- De Araújo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, Correa-Oliveira R. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci.* 1;12:2797-806, 2007.
- De Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO et al. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology.* 217(8):768-77, 2012.
- De Nardini E. Genetic polymorphisms and immune responses. *Immunological Investigations.* 38: 198-202, 2009.
- Deschamps AM & Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res;* 69(3):666-76, 2006

Dias JCP. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22:147-156, 1989.

Dias JCP. *Epidemiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Dini FL, Buralli S, Bajraktari G, Elezi S, Duranti E, Metelli MR, Carpi A, Taddei S. Plasma matrix metalloproteinase-9 better predicts outcome than N-terminal protype-B natriuretic peptide in patients with systolic heart failure and a high prevalence of coronary artery disease. *Biomed Pharmacother.* 64(5):339-42, 2010.

Dutra WO & Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Disease.* 21:287-292, 2008.

D'Armiento J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *Trends Cardiovasc Med.* Apr;12(3):97-101, 2002.

Edsparr K, Basse PH, Goldfarb RH, Albertsson P. Matrix Metalloproteinases in Cytotoxic Lymphocytes Impact on Tumour Infiltration and Immunomodulation. *Cancer Microenvironment.* 4:351-360, 2011.

Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Skrtic M, Li RK. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part III). *Cardiovasc Pathol.* May-Jun;14(3):109-19, 2005.

Feil R & Fagra MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature reviews: Genetics.* 13:97-109, 2012.

Fernández-Mestre MT, Montagnani S, Layrisse Z. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease? *Hum Immunol.* 65(7):725-8, 2004.

Flórez O, Martín J, González CI. Interleukin 4, interleukin 4 receptor- α and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. *Parasite Immunol.* 33(9):506-11, 2011.

Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairena EC et al. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8⁺ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Scand. j. immunol.* 66(2-3):362-71, 2007.

Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta;* 413(7-8):656-662, 2012.

Gao CQ, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, Csont T, Wozniak M, Ferdinandy P, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res.* 57(2):426-33, 2003.

Garzoni LR, Caldera A, Meirelles Mde N, de Castro SL, Docampo R, Meints GA, Oldfield E, Urbina JA. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* Mar;23(3):273-85, 2004.

Garzoni LR, Adesse D, Soares MJ, Rossi MI, Borojevic R. de Meirelles Mde N. Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J Infected Dis.* Mar; 15; 197(6):906-15, 2008.

Geurts N, Opdenakker G, Van den Steen PE. Matrix Metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacology & Therapeutics*, 2011.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a non-balanced Th1 specific immune response. *Infect. immun.* 71(3):1185-1193, 2003.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, Correa-Oliveira R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun.* 73(12):7960-6, 2005.

Gomes JA, Campi-Azevedo AC, Teixeira-Carvalho A, Silveira-Lemos D, Vitelli-Avelar D, Sathler-Avelar R, Peruhype-Magalhães V, Silvestre KF, Batista MA, Schachnik NC, Correa-Oliveira R, Eloi-Santos S, Martins-Filho OA. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. *Immunobiology.* 217(10):1005-16, 2012.

Gutierrez FR, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, Santos JE, Torres-Dueñas D, Cunha FQ, Schulz R, Silva JS. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis.* 197(10):1468-76, 2008.

Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite immunol.* 31(11):673-85, 2009.

- Haberbosch W & Gardemann A. Gelatinase B C(-1562) T polymorphism in relation to ischaemic heart disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 65: 513–522, 2005.
- Higuchi ML, De Brito T, Reis MM, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. pathol.* 2:101-106, 1993.
- Higuchi ML, Reis MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am. j. trop. med. hyg.* 56:485-489, 1997.
- Higuchi ML, Benvenuti LA, Reis MM, Metzger M. Pathophysiology of the heart in chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc. res.* 60(1): 96-107, 2003.
- Hinterseher I, Krex D, Kuhlisch E, Schmidt KG, Pilarsky C, Schneiders W, Saeger HD, Bergert H. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) polymorphisms in a Caucasian population with abdominal aortic aneurysm. *World J Surg.* Nov;31(11):2248-54, 2007.
- Hua Y, Song L, Wu N, Xie G, Lu X, Fan X, Meng X, Gu D, Yang Y. Polymorphisms of MMP-2 gene are associated with systolic heart failure prognosis. *Clinica Chimica Acta.* 404: 119–123, 2009.
- Hu J, Steen PEV, Sang QXA, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature Reviews: Drug Discovery.* 6:481-498, 2007.
- Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol.* Sep 1;169(5):2643-7, 2002.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. j. trop. med. hyg.* 48 (3):348-357, 1993.
- Kadri Z, Petitfrère E, Boudot C, Freyssinier JM, Fichelson S, Mayeux P, Emonard H, Hornebeck W, Haye B, Billat C. Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ.* Nov;11(11):573-80, 2000.

- Kalil J & Cunha-Neto E. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol. today.* 12:396-399, 1996.
- Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, et al. Infammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*; 123:594-604, 2011.
- Keesen TS, Gomes JA, Fares RC, de Araújo FF, Ferreira KS, Chaves AT, Rocha MO, Correa-Oliveira R. Characterization of CD4⁺ cytotoxic lymphocytes and apoptosis markers induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol.* 76(3):311-9, 2012.
- Kelly D, Cockerill G, Ng LL, Thompson M, Khan S, Samani NJ, Squire IB. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J*; 28(6):711-718, 2007.
- Kierszenbaum F. Autoimmunity in Chagas' disease. *J. parasitol.* 72:201-211, 1986.
- Koeberle F & Nador E. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. *Rev. Paulista Med.* 47: 643-661, 1955.
- Kortekaas KA, Lindeman JH, Versteegh MI, van Beelen E, Kleemann R, Klautz RJ. Heart failure determines the myocardial inflammatory response to injury. *Eur J Heart Fail.* Nov 9, 2012.
- Kumar M, Bhadoria DP, Dutta K, Singh S, Gupta J, Kumar R, Chhillar AK, Yadav V, Singh B, Sharma GL. Combinatorial effect of TIMP-1 and α 1AT gene polymorphisms on development of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Biochem. Sep*;44(13):1067-73, 2011.
- Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 61;205-209, 2010.
- Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* Mar;49(3):187-98, 2004.
- Lannes-Vieira J, Pereira IR, Vinagre NF, Arnez LE. TNF- α and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. *Adv Exp Med Biol.* 691:221-30, 2011.

- Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Van Regenmortel MH, Levin MJ. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85:413-417, 1991.
- Li YY, McTiernan CF, Feldman, AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovascular Research*, 46; 214–224, 2000.
- Lockwood CJ, Oner C, Uz YH, Kayisli UA, Huang SJ, Buchwalder LF, Murk W, Funai EF, Schatz F. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells. *Biol Reprod.* 78(6):1064-72, 2008
- Macedo VO. Forma indeterminada da doença de Chagas. *J. Bras. med.* 38:34-40, 1980.
- Macedo VO. Forma indeterminada da doença de Chagas. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997.
- Mady C, Cardoso RH, Barretto AC, da Luz PL, Bellotti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. *Circulation.* 90(6):3098-102, 1994.
- Magalhães LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis.* Feb 15;207(4):661-5, 2013.
- Mainardi CL, Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM. Purification of a type V collagen-degrading metalloproteinase from rabbit alveolar macrophages. *Coll. Relat. Res.* 4, 479–492, 1984.
- Mannello F & Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Progress in Hist and Cytoc.* 47:27-58, 2012.
- Marquet S, Abel L, Hillaire D, Dessein H, Kalil J, Feingold J, Weissenbach J, Dessein AJ. Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nat Genet.*;14(2):181-4, 1996.
- Matsunaga T, Abe N, Kameda K, et al. Circulating level of gelatinase activity predicts ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*; 105:203–208, 2005.

- Meirelles MN, de Araujo Jorge TC, Miranda CF, de Souza W, Barbosa HS. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur J Cell Biol* Aug; 41 (2) 198-206, 1986.
- Meirelles MN, Pereira MC, Singer RH, Soeiro MN, Garzoni LR, Silva DT, Barbosa HS, Araujo-Jorge TC, Masuda MO, Capella MA, Lopes AG, Vermelho AB. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocytes: new contributions regarding a better understanding of this interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 Suppl 1:149-52, 1999.
- Mendes, O. C. Campos DH, Damatto RL, Sugizaki MM, Padovani CR, Okoshi K, Cicogna AC. Cardiac remodeling: serial analysis and indexes for early detection of ventricular dysfunction. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.94, n.1, p.59-66, 2010.
- Menezes C, Costa GC, Gollob KJ, Dutra WO. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. *Drug Dev Res*. Sep;72(6):471-479. 2011.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16(3), 1988.
- Mizon-Gerard F, Groote P, Lamblina N, Hermant X, Dallongeville J, Amouyela P, Bautersa C, Helbecque N. Prognostic impact of matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with heart failure according to the aetiology of left ventricular systolic dysfunction. *European Heart Journal*. 25: 688–693, 2004.
- Moncayo A & Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2009; 104(Suppl I): 17-30.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*.19:683–765, 2001.
- Moore L, Fan D, Basu R, Kandalam V, Kassiri Z. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure. *Heart Fail Rev*. Jun, 2011.
- Mossböck G, Weger M, Faschinger C, Zimmermann C, Schmut O, Renner W, El-Shabrawi Y. Role of functional single nucleotide polymorphisms of MMP1, MMP2, and MMP9 in open angle glaucomas. *Mol Vis*. 28;16:1764-70, 2010.

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* Jul 30;274(31):21491-4, 1999.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardio Research.* 69:562-573, 2006.

Nikolova A, Ablasser K, Wyler von Ballmoos MC, Poutias D, Kaza E, McGowan FX, Moses MA, Del Nido PJ, Friehs I. Endogenous angiogenesis inhibitors prevent adaptive capillary growth in left ventricular pressure overload hypertrophy. *Ann Thorac Surg;* 94(5):1509-17, 2012.

Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, Frade A, Donadi E, Dias F, Saba B, Wang HT, Fragata A, Sampaio M, Hirata MH, Buck P, Mady C, Bocchi EA, Stolf NA, Kalil J, Cunha-Neto E. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(10):e1867, 2012.

Nunes MC, Carmo AA, Rocha MO, Ribeiro AL. Mortality prediction in Chagas heart disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 10(9):1173-84, 2012.

Opdenakker G. New insights in the regulation of leukocytosis and the role played by leukocytes in septic shock. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 63(6):531-8, 2001a.

Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol.* Oct;22(10):571-9, 2001b.

Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* Jun;69(6):851-9, 2001c.

Palomino SA, Aiello VD, Higuchi ML. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann. trop. med. parasitol.* 94(6):571-579, 2000.

Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews.* Aug (4); 617-29, 2004.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7;100(1):177-82, 2003.

Pissetti CW, de Oliveira RF, Correia D, Nascentes GA, Llaguno MM, Rodrigues V Jr. Association between the lymphotoxin-alpha gene polymorphism and chagasic cardiopathy. *J Interferon Cytokine Res.* 33(3):130-5, 2013.

Polyakova V, Loeffler I, Hein S, Miyagawa S, Piotrowska I, Dammer S, Risteli J, Schaper J, Kostin, S. Fibrosis in endstage human heart failure: Severe changes in collagens metabolism and MMP/TIMP profiles, *Int J Cardiol*, 2010.

Rassi A Jr, Rassi A, Little WC. Chagas heart disease. *Clin. cardiol.* 23:883-889, 2000.

Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, Hasslocher-Moreno A, Sousa AS, Scanavacca MI. Development and validation of a risk score for predicting mortality in Chagas heart disease. *N. Engl. j. med.* 355:799-808, 2006.

Reis DD; Jones EM; Chapadeiro E; Tostes S; Gazzinelli G; Colley DG, McCurley T. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF-alpha and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Estados Unidos, v. 48, n. 5, p. 637-644, 1993.

Rezende JM. Forma digestiva da moléstia de Chagas. *Rev. goiana med.* 5:197, 1959.

Ribeiro-dos-Santos R, Mengel JO, Postol E, Soares RA, Ferreira-Fernandez E, Soares MB, Pontes-de-Carvalho LC. A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite immunol.* 23(2):93-101, 2001.

Ridley, 2006. *Evolução*. Porto Alegre, 3 ed., Artmed, 2006.

Rocha MOC, Ribeiro AL, Teixeira MM. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci.* 1(8):44-54, 2003.

Rocha MOC, Teixeira MM, Ribeiro AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 5(4):727-743, 2007.

Rocha, MOC; Nunes, MC P and Ribeiro, AL. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* vol.104, suppl.1, 2009.

Rutschow S, Li J, Schultheiss HP, Pauschinger M. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res.* 15;69(3):646-56, 2006.

- Rydlova M, Holubec Jr, Ludvikova M Jr, Kalfert D, Franekova J, Povysil C, Ludvikova M. Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. *Anticancer research*. 28:1389-1398, 2008.
- Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 104(suppl I):246-251, 2009.
- Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agente of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*. 31:547-557, 1991.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 115(1-2):14-21, 2010.
- Schulz, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: Rationale and therapeutic approaches. *Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.47, n.1, p.211-242, 2007.
- Segal S, Hill AV. Genetic susceptibility to infectious disease. *Trends Microbiol*. Sep;11(9):445-8. 2003.
- Shi JH, Guan H, Shi S, Cai WX, Bai XZ, Hu XL, Fang XB, Liu JQ, Tao K, Zhu XX, Tang CW, Hu DH. Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring. *Arch Dermatol Res*. 2013 Jan 16.
- Silveira, AC & Dias, JCP. The control of vectorial transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. vol.44, suppl.2, 2011.
- Soares MBP, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc*. 73:547-559, 2001.
- Sopata, I. and Dancewics, A.M. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 370, 510–523, 1974.
- Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res*. 46(2):225-38, 2000.

Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* Oct;87(4):1285-342, 2007.

Stanciu AE, Vatasescu RG, Stanciu MM, Iorgulescu C, Vasile AI, Dorobantu M. Cardiac resynchronization therapy in patients with chronic heart failure is associated with anti-inflammatory and anti-remodeling effects. *Clin Biochem.* 46(3):230-4, 2013.

Sundström J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, Siwik DA, Colucci WS, Sutherland P, Wilson PW, Vasani RS. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation.* Jun 15;109(23):2850-6, 2004.

Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog. cardiovasc. dis.* 51:524-539, 2009.

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends parasitol.* 18(6):262-265, 2002.

Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ 3rd, Spinale FG. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation*, v.97, n.17, p.1708-1715, 1998.

Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology.* 28(6):1597–1606, 1998.

Timonen P, Magga J, Risteli J, Punnonen K, Vanninen E, Turpeinen A, Tuomainen P, Kuusisto J, Vuolteenaho O, Peuhkurinen K. Cytokines, interstitial collagen and ventricular remodelling in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 14;124(3):293-300, 2008.

Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvao LM, Reis D, Pereira ME, Simpson AJ, Tostes S & Pena SD. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. j. pathol.* 149:2153-2159; 1996.

Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans, S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window. *Cardiovascular Research*, 69;604-613, 2006.

- Van Voorhis WC & Eisen H. Fl-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. exp. med.* 169:641-652, 1989.
- Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods.* Mar;10(3):211-20, 2013.
- Vasconcelos RH, Montenegro SM, Azevedo EA, Gomes YM, Morais CN. Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: an overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. *Cytokine.* 59(2):203-8, 2012.
- Verma SK, Krishnamurthy P, Barefield D, Singh N, Gupta R, Lambers E, Thal M, Mackie A, Hoxha E, Ramirez V, Qin G, Sadayappan S, Ghosh AK, Kishore R. Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor- κ B. *Circulation.* 126(4):418-29, 2012.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4⁺CD25^{high} T cells balancing activated CD8⁺ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Circulation.* 126(4):418-29, 2012.
- Wang J, Xu D, Wu X, Zhou C, Wang H, Guo Y, Cao K. Polymorphisms of matrix metalloproteinases in myocardial infarction: a meta-analysis. *Heart.* Oct;97(19):1542-6, 2011.
- White ES, Baralle FE, Muro AF. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol.* 216: 1–14, 2008.
- Wood JN, Hudson L, Jessel TM, Yamamoto M. A monoclonal antibody defining antigenic determinat on subpopulation of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature.* 296:34-38, 1982.
- World Health Organization, WHO. Fact sheet N°340, Agosto 2012. Disponível em: <http://www.who.int>.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* Jan;214(2):199-210, 2008.

Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovascular Research*. 69: 636 – 645, 2006.

Zafra G, Morillo C, Martín J, González A, González CI. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect*. 9(9):1049-52, 2007.

Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 13;99(14):1788-94. 1999