

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Morfologia

**Análise da expressão das metaloproteinases 2 e 9 e do perfil de
citocinas produzidas em neutrófilos e monócitos de pacientes
portadores da doença de Chagas**

Nayara Ingrid de Medeiros

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

Nayara Ingrid de Medeiros

Análise da expressão das metaloproteinases 2 e 9 e do perfil de citocinas produzidas em neutrófilos e monócitos de pacientes portadores da doença de Chagas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana de Assis Silva Gomes
Estanislau

Co-orientadora: Dr^a. Rafaelle Christine Gomes Fares
Gusmão

Belo Horizonte

Fevereiro/2015



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

NAYARA INGRID DE MEDEIROS

165/2015
entrada
1º/2013
2013669946

Às **quatorze horas** do dia **20 de fevereiro de 2015**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA METALOPROTEINASE 2 E 9 E DO PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDAS EM NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA DE CHAGAS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau	UFMG	<i>Aprovada</i>
Dra. Lirlândia Pires de Sousa	UFMG	<i>Aprovada</i>
Dra. Ana Thereza Chaves	UFMG	<i>APROVADA</i>

Pelas indicações, a candidata foi considerada: *Aprovada*

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2015.**

Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau *Juliana Estanislau*

Dra. Lirlândia Pires de Sousa *Lirlândia Pires de Sousa*

Dra. Ana Thereza Chaves *Ana Thereza Chaves*

Quidina Guatimosim

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Profa. Cristina Guatimosim Fonseca
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB / UFMG

COLABORADORES

Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Morfologia

Prof^a. Dr^a. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Prof^a. Dr^a. Walderez Ornelas Dutra

Me. Rafael Teixeira de Mattos

Eliza Pereira Franco

Universidade Federal de Minas Gerais – Faculdade de Medicina

Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

Dr^a. Ana Thereza Chaves Lages

Me. Giovane Rodrigo de Sousa

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira

U. S. Food and Drug Administration

Dr^a. Rafaelle Christine Gomes Fares Gusmão

RECURSOS FÍSICOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia das Interações Celulares – LABIC, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular – LICM, do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG.

RECURSOS FINANCEIROS

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ-04129-10, PPM-00501-13).
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (403592/2008-9, 474796/2012-4, PQ 308219/2012-0, 404151/2012-4).
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - PAPES (407692/2012-6).

Ao meu amado mestre e tio José Gomes que infelizmente não pode acompanhar esta trajetória até o final. A lembrança de seus ensinamentos e de sua persistência tornaram-me mais forte pela busca do título que eu carinhosamente lhe dei, certa que você foi digno dele durante sua luta. Saudade eterna!

AGRADECIMENTOS

É impossível não notar a presença de Deus em cada detalhe que me trouxe até aqui. A Ele toda minha gratidão, confiança e amor sempre serão dedicados.

À Dr^a. Juliana, por todo cuidado e disposição, por me direcionar e compreender. Obrigada por compartilhar meu pranto e minha alegria, por acreditar em mim, me incentivar e inspirar, igualmente pelos conselhos e ensinamentos que a torna mais que minha orientadora. Seu apoio foi muito além deste trabalho e sua importância em minha vida ultrapassa a ciência.

À Dr^a. Rafaelle todo meu carinho e admiração. Agradeço por acreditar tanto em mim, por ser grande influência em minha vida, base da minha formação científica, pela amizade, confiança, pelo estímulo que tanto me encorajou, pela paciência e atenção, especialmente, pelo exemplo de caráter e profissionalismo que tanto me inspira.

Ao Dr. Rodrigo por abrir as portas do laboratório para que eu pudesse me encantar pela ciência, por sua colaboração em minha formação profissional, por seu apoio, confiança e incentivo, além do grande exemplo de conduta ética.

Ao Dr. Manoel Otávio por me proporcionar a convivência com os pacientes portadores da doença de Chagas, por seus ensinamentos clínicos, pela confiança e estímulo. Sua dedicação e amor por seu trabalho foram motivadores.

Ao amigo e companheiro Rafael pelos momentos descontraídos, pelas longas conversas, conselhos, pelo carinho que sempre teve comigo, por me ensinar a ter mais resiliência e por ser o melhor cúmplice e confidente. Estar contigo nesta jornada me fez mais segura e feliz.

À Eliza, aluna de iniciação científica, pela oportunidade de ensinar e aprender. Agradeço pela companhia agradável, por todos os sorrisos que me proporcionou nos momentos mais árduos, pela assistência, apoio, amizade e por seus inesquecíveis lemas.

Às amigas Lu Lisboa e Izabella agradeço por me mostrarem as alternativas, pela força na fase mais difícil, pelos conselhos e pelo apoio quando era um abraço e orações o que eu precisava.

À Soberana Rainha dos Ancilostomídeos, Livia, que foi uma das preciosidades que encontrei na pós-graduação. Agradeço pela disponibilidade em ajudar, pelos conselhos, dicas de moda e de biologia molecular e, especialmente, pelo carinho, amizade e momentos divertidos.

Às amigas e companheiras da PNE. À Querol pela sinceridade, confidências, apoio com os experimentos, sem esquecer dos brigadeiros e tortas que trouxeram alívio nos dias mais padecidos. À Amêndoa, por cuidar de mim e da Pretinha, pela disponibilidade, conselhos, hospedagem e apoio. À Bia, companheira desde nossa IC, agradeço pela sinceridade, amizade tão especial e pela ajuda durante a escrita deste trabalho. À Dani pelas coreografias e cantorias que tanto me alegraram. E à Ritona, com seu tom de voz manso, pela amizade, carinho e doces de leite.

À Tat Keesen pelos valiosos conselhos, pela preciosa companhia e por todas as aventuras compartilhadas.

Aos amigos que fiz no laboratório de biologia das interações celulares pelos momentos especiais que amenizaram esta trajetória e por todas as teorias que aprendi. Sobretudo, por compartilharem as inseguranças, chocolates e experiências dessa vida.

Aos amigos do laboratório de imunologia do CPqRR Jaque, Cadu, Clari, Roberta, Bozzi, Ester, Jacque Fiuza, Talita, Emerson, Anna, Jorge, Vitor, Dirly, Camila, Juliana e Stella pela convivência, mesmo que menos frequente, mas sempre agradável e divertida.

A melhor turma da Biologia Celular de todos os tempos (2013/1) por transformarem a gincana louca da pós-graduação em momentos alegres, risadas indelicadas e seminários divertidos.

Aos meus pais, meu alicerce, agradeço por me apoiarem incondicionalmente. Essa conquista não pode ser somente minha, pois tudo que me trouxe até aqui advém do amor, da confiança, do trabalho, dos valores e exemplos que recebi dentro de casa. Serei eternamente grata por tudo que me ensinaram e me emocionarei todas as vezes que me lembrar do orgulho que sinto por vocês.

As minhas confidentes e irmãs do coração Tássia, Mayara, Waleska e Fernanda que mesmo à distância são fundamentais em minha vida. Sou grata pela cumplicidade, por serem o colo que me conforta, o ouvido que me compreende e o conselho que eu preciso. Agradeço também pelas orações, pela torcida, pelas broncas e por serem a certeza de que eu nunca lutarei só.

Às melhores amigas Rayssa, Dyeice e Verônica pela torcida, incentivo, conselhos, apoio, por vibrarem com minhas vitórias e por amenizarem os momentos difíceis. Obrigada por me entenderem sempre e por não permitirem que eu desanimasse diante das surpresas da vida.

À vovó e aos meus queridos tios e primos que sempre foram uma motivação extra, pelo carinho e por tantos momentos em que me senti amada e importante, e que me fizeram buscar meus objetivos sem que eu me esquecesse do amor e das razões que movem meus sonhos.

Por fim, meu agradecimento atemporal a todos que contribuíram de alguma forma para minha formação científica. Muito obrigada!

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago (A Jangada de Pedra)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Aspectos éticos	30
4.2 População estudada	30
4.2.1 Critérios de inclusão	31
4.2.2 Critérios de exclusão	31
4.3 Preparo dos Antígenos derivados da forma tripomastigota (Tripo) do <i>T. cruzi</i>	32
4.4 Análise dos níveis intracitoplasmáticos das metaloproteinases e das citocinas em neutrófilos e monócitos de pacientes portadores da doença de Chagas por citometria de fluxo	33
4.4.1 <i>Ex vivo</i>	33
4.4.2 Após estímulo <i>in vitro</i> com antígenos do <i>T. cruzi</i>	34
4.5 Aquisição e estratégias de análises dos dados	35

4.6 Perfil de expressão de metaloproteinases e citocinas após estímulo <i>in vitro</i> com antígenos do <i>T. cruzi</i>	36
4.7 Detecção da MMP-2 e MMP-9 e do TIMP-1 e TIMP-2 em amostras de soro	37
4.8 Análise estatística	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Avaliação da expressão de MMP-2 e MMP-9 em neutrófilos	40
5.2 Avaliação da expressão de MMP-2 e MMP-9 em monócitos	42
5.3 Avaliação da expressão das citocinas em neutrófilos	44
5.4 Avaliação da expressão das citocinas em monócitos	45
5.5 Análise de correlação entre as MMP-2 e MMP-9 e as citocinas avaliadas após estímulo <i>in vitro</i> com antígenos do <i>T. cruzi</i>	47
5.6 Avaliação do perfil de expressão das MMPs -2 e -9 e de citocinas inflamatórias/regulatórias por neutrófilos e monócitos após estímulo <i>in vitro</i> com antígenos do <i>T. cruzi</i>	48
5.7 Avaliação da MMP-2 e MMP-9 e dos TIMP-1 e -2 em amostras de soro por Milliplex	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	65
8 ANEXOS	67
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	68
Anexo B – Carta de aprovação do comitê de ética do CPqRR	70
Anexo C – Carta de aprovação do comitê de ética da UFMG	71
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração sérica das MMPs e dos TIMPs	52
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de análises dos dados	36
Figura 2. Análise da expressão da MMP-2 e MMP-9 em neutrófilos	41
Figura 3. Razão entre a expressão de MMP-9/MMP-2 em neutrófilos	42
Figura 4. Análise da expressão de MMP-2 e MMP-9 em monócitos	43
Figura 5. Razão entre a expressão de MMP-9/MMP-2 em monócitos	44
Figura 6. Análise da expressão das citocinas em neutrófilos	45
Figura 7. Análise da expressão das citocinas em monócitos	46
Figura 8. Redes de correlações entre a expressão da MMP-2, MMP-9 e das citocinas em neutrófilos e monócitos após estímulo <i>in vitro</i> com antígenos do <i>T. cruzi</i>	48
Figura 9. Perfil longitudinal da expressão de MMPs e citocinas em neutrófilos após estímulo <i>in vitro</i> com antígenos do <i>T. cruzi</i>	49
Figura 10. Perfil longitudinal da expressão de MMPs e citocinas em monócitos após estímulo <i>in vitro</i> com antígenos do <i>T. cruzi</i>	50
Figura 11. Perfil de expressão de moléculas inflamatórias/regulatórias por neutrófilos e monócitos após estímulo <i>in vitro</i> com antígenos do <i>T. cruzi</i>	51
Figura 12. Redes de correlações entre concentrações séricas de MMPs e TIMPs ..	53

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA** – Albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)
- CARD** – Forma Clínica Cardíaca
- CDG** – Forma Clínica Cardiodigestiva
- CPqRR** – Centro de Pesquisas René Rachou
- CTR-DIP** – Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
- DIG** – Forma Clínica Digestiva
- ECG** - Eletrocardiograma
- EDTA** - Etilenodiaminotetracético
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- FITC** - Isotiocianato de fluoresceína
- FL** – Fluorescência
- FSC** - Tamanho Celular (*Forward Scatter*)
- HAS** – Hipertensão Arterial Sistêmica
- IL** - Interleucina
- IFN- γ** - Interferon gamma
- IMF** – Intensidade Média de Fluorescência
- IND** – Forma Clínica Indeterminada
- MEC** – Matriz Extracelular
- MFF** – Solução fixadora (*Macs Facs Fix*)
- RPMI** - *Roswell Park Memorial Institute Medium*
- MMPs** - Metaloproteinases
- NETs** – Armadilhas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps*)
- NI** – Não Infectados
- NO** – Óxido Nítrico
- PBMC** – Células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
- PBS** – Tampão Fosfato Salínico
- PBS-P** – Tampão Fosfato Salínico para Permeabilização
- PBS-W** – Tampão Fosfato Salínico para Lavagem
- PE** - Ficoeritrina
- PerCP** – Proteína piridina de clorofila (*Peridinin Chlorophyll Protein*)
- SA** - Estreptavidina

SSC – Granulosidade (*Side Scatter*)

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta (*Transforming Growth Factor beta*)

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinases (*Tissue inhibitor of metalloproteinase*)

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

Tripo – Formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

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

RESUMO

A doença de Chagas, causada pela infecção com *Trypanosoma cruzi*, representa um sério problema à saúde pública nos países da América Latina. Após a fase aguda, uma doença crônica é estabelecida e diferentes formas clínicas podem se desenvolver. A maioria dos acometidos não apresenta sintomas em decorrência à infecção e por isso são classificados com a forma clínica indeterminada (IND) da doença. Cerca de 30% dos pacientes apresentam alterações cardíacas de grau leve a grave, e são classificados com a forma clínica cardíaca (CARD). A cardiopatia chagásica é caracterizada por um remodelamento do miocárdio e por uma fibrose intersticial, resultando em mudanças na matriz extracelular (MEC). Os processos de degradação e síntese da MEC são controlados por enzimas proteolíticas, as metaloproteinases de matriz (MMPs) e por citocinas. Essas proteínas são produzidas por diferentes tipos celulares incluindo células do sistema imune inato. Diante disso, este estudo teve como objetivo analisar a expressão da MMP-2 e -9, e as citocinas IL-1 β , IL-10, TGF- β , TNF- α produzidas em neutrófilos e monócitos, bem como os níveis séricos das MMPs e seus inibidores, em pacientes portadores da doença de Chagas. Os resultados mostram que neutrófilos e monócitos de pacientes chagásicos apresentam maiores níveis de MMP-2 e MMP-9 antes e após o estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. As citocinas IL-1 β , TGF- β e TNF- α estão significativamente aumentadas em neutrófilos de pacientes infectados, enquanto a IL-10 está aumentada em neutrófilos do grupo IND, antes e após estímulo *in vitro in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Para os monócitos, observamos o aumento da expressão de TNF- α nos pacientes com doença de Chagas e o aumento da IL-10 no grupo IND antes e após estímulo *in vitro in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. A análise de correlação mostrou que a MMP-2 apresenta correlação positiva com IL-10 e negativa com IL-1 β . Por outro lado, a MMP-9 correlacionou-se positivamente com a IL-1 β . Os níveis séricos de MMP-2 e -9, bem como de seus inibidores (TIMPs), foram avaliados e os resultados mostraram um aumento de TIMP-2, MMP-2 e MMP-9 no soro do grupo CARD. Correlacionando os níveis séricos de TIMPs e MMPs, demonstramos correlação negativa da MMP-2 e MMP-9 com o TIMP-1 no grupo CARD. No grupo IND demonstramos uma correlação positiva entre os TIMPs e negativa entre as MMPs. Os elementos encontrados sugerem um comportamento semelhante entre neutrófilos e monócitos em relação a produção de MMP-2 e MMP-9, sugerindo que essas células podem ser uma importante via na indução de fibrose na doença de Chagas.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* infection, is a serious problem for public health in Latin America. The increase of migration of patients infected by *T. cruzi* in recent years allowed the disease to reach the non-endemic regions, thereby increasing worldwide concern for control measures. After the acute phase, the chronic disease is established and different clinical forms may develop. Most of patients present no symptoms due to infection and are classified as indeterminate clinical form (IND). In contrast, about 30% of patients present mild to severe cardiac abnormalities, ranked with cardiac clinical form (CARD). Chagas cardiomyopathy is characterized by a myocardial remodeling and interstitial fibrosis, resulting in changes of extracellular matrix (ECM). Proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs) and cytokines are able to control ECM degradation and synthesis processes. These proteins are produced by different cells, including innate immune cells. This study aimed to characterize the levels of MMP-2 and MMP-9, which are involved in cardiac remodeling, and the cytokines IL-1 β , IL-10, TGF- β , TNF- α in neutrophils and monocytes, as well the serum levels of MMPs and their inhibitors in patients with Chagas disease. The results showed that neutrophils and monocytes from chagasic patients have higher levels of MMP-9 and MMP-2 levels after *in vitro* stimulation with *T. cruzi* antigens. IL-1 β , TGF- β and TNF- α are significantly higher in neutrophils from CARD patients, while IL-10 is increased in neutrophils from IND patients. For monocytes, TNF- α showed a significant increase in infected patients before and after stimulation with *T. cruzi* antigens. MMP-2 presented positively correlated with IL-10 and negative correlation with IL-1 β . Moreover, MMP-9 was positively correlated with IL-1 β . Levels of MMPs 2 and 9, as well as their inhibitors (TIMPs), were also evaluated in serum samples. The results showed an increase in seric levels of TIMP-2, MMP-2 and MMP-9 in CARD group. We observed a negative correlation between MMP-2 and MMP-9 with TIMP-1 in the CARD group and a positive correlation between TIMPs and a negative correlation between MMPs, both in IND group. The results suggest the same behavior between neutrophils and monocytes concerning the production of MMP-2 and MMP-9 in the different clinical forms of the disease. It suggests that these innate cells may be involved in an important pathway of fibrosis induction in the chagasic cardiomyopathy context.

Entre os aspectos intrigantes relacionados à doença de Chagas, destaca-se a evolução clínica diferencial em indivíduos cronicamente infectados. Enquanto a grande maioria dos pacientes na fase crônica não apresenta sintomas ou sinais clínicos da doença, cerca de 30% dos pacientes desenvolve alterações cardíacas, caracterizadas por lesões teciduais de intensidade variável no coração e associadas à morbidade e mortalidade da doença.

A cardiopatia chagásica 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 e resultando em mudanças na matriz extracelular (MEC) (Brener, 1999; Rocha *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2012). Os mecanismos exatos que fundamentam o estabelecimento e manutenção da patologia cardíaca ainda são obscuros. Os processos de degradação e síntese da MEC são controlados por enzimas proteolíticas, conhecidas como metaloproteinases de matriz (MMPs) e por citocinas, das quais sobressaem IL-1 β , TGF- β e TNF- α . Dentre as MMPs, destacam-se as gelatinases MMP-2 e MMP-9 que já foram descritas por participarem de alterações cardíacas, incluindo as alterações da cardiopatia chagásica (Gutierrez *et al.*, 2008; Fares *et al.*, 2013). Além das MMPs, seus inibidores teciduais (TIMPs) também estão envolvidos na patogênese de algumas doenças, uma vez que um desequilíbrio entre a enzima e o inibidor origina processos patológicos envolvendo a deposição da MEC, o remodelamento tecidual e a inflamação.

As células da imunidade inata, especialmente os neutrófilos e monócitos, desempenham uma função importante na doença de Chagas por atuarem no controle da parasitemia durante a fase aguda. Na fase crônica, são importantes iniciadores e efetores da resposta imune adaptativa e ainda participam do processo inflamatório e do remodelamento cardíaco por meio da produção de citocinas e MMPs (Molina & Kierszenbaum, 1989; Kayama & Takeda, 2010; Luna-Gomes *et al.*, 2014).

Contudo, a resposta imune inata tem sido pouco explorada durante a fase crônica na doença de Chagas. Nesse contexto, o estudo das MMPs, das citocinas e das células da imunidade inata podem auxiliar a compreensão dos mecanismos ligados ao desenvolvimento das formas graves da doença de Chagas, além de apontar um possível marcador de prognóstico e assim permitir anteceder o dano cardíaco intrínseco à doença.

2.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão das metaloproteinases 2 e 9 e o perfil de citocinas produzidas em neutrófilos e monócitos, bem como os níveis séricos das metaloproteinases e seus inibidores, em pacientes portadores da doença de Chagas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão das metaloproteinases 2 e 9 e das citocinas IL-1 β , IL-10, TGF- β e TNF- α em neutrófilos e monócitos de pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas e de indivíduos não infectados no contexto *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;
- Avaliar a correlação da expressão das metaloproteinase 2 e 9 com a expressão das citocinas IL-1 β , IL-10, TGF- β e TNF- α , bem como entre as citocinas expressas por neutrófilos e monócitos de pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas e de indivíduos não infectados após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;
- Delinear o perfil dos pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas e de indivíduos não infectados através da expressão das metaloproteinases 2 e 9 e das citocinas IL-1 β , IL-10, TGF- β e TNF- α em neutrófilos e monócitos após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;
- Avaliar os níveis séricos das metaloproteinases -2 e -9 e dos seus inibidores teciduais -1 e -2 em pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas e de indivíduos não infectados;
- Avaliar a correlação entre os níveis séricos das metaloproteinases 2 e 9 e dos seus inibidores teciduais -1 e -2 nos grupos de pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas e de indivíduos não infectados.

Há pouco mais de um século, o médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas descreveu um protozoário flagelado, o *Trypanosoma cruzi*, e também seus principais hospedeiros, o modo de transmissão e os sinais clínicos da doença, desencadeados pela infecção que recebeu seu nome: doença de Chagas (Chagas, 1909). A descoberta de Chagas representa uma das maiores conquistas médicas do Brasil.

A doença de Chagas é uma das 13 doenças mais negligenciadas do mundo (Hotez *et al.* 2007) e acomete cerca de 8 milhões de pessoas, a maioria delas na América Latina (WHO, 2014). No Brasil, a doença de Chagas é a quarta causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias (Andreollo & Malafaia, 2009). A doença também representa uma ameaça emergente a países não endêmicos, devido ao aumento da migração populacional e do número de casos importados para América do Norte, Europa, Ásia e Oceania (Schmunis & Yadon, 2010).

A principal forma de transmissão da doença ao homem ocorre através do contato do hospedeiro vertebrado com as formas infectantes do *T. cruzi*, presentes nas fezes e/ou urina de insetos Triatomíneos, conhecidos como barbeiros, que são excretadas durante o repasto sanguíneo (Barretto, 1979; Kirchhoff, 2011). Os insetos são infectados a partir da ingestão das formas tripomastigotas sanguíneas do hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo. Em seu intestino as tripomastigotas sofrem transformações biológicas, tornando-se formas replicativas (epimastigotas), que se reproduzem por divisão binária e evoluem para tripomastigotas metacíclicas. 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. Após intensa multiplicação ocorre o rompimento da célula e a liberação dessas formas evolutivas na corrente sanguínea, provocando a disseminação da infecção (Dias, 2000).

Em 2006, o Brasil recebeu da Organização Pan-Americana de Saúde a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*. É importante salientar que essa certificação não significa o controle efetivo da doença no país, uma vez que representa a interrupção da transmissão pelo principal vetor domiciliado, o *T. infestans*, e não sua completa erradicação (Ferreira & Silva, 2006). Outro aspecto considerável é a adaptação de outras espécies silvestres de Triatomíneos, como *Rhodnius neglectus* e *R. pictipes*, às condições domiciliares, principalmente nas regiões Norte/Nordeste do país (Silveira & Dias, 2011).

Outras formas de transmissão já foram descritas, entre elas as transmissões por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, congênita, por acidentes laboratoriais e ingestão de alimentos contaminados com as formas tripomastigotas (Bittencourt, 1976; Brener, 1987; Dias, 1989; Brasil, 2005). Atualmente, no Brasil, há registros da ocorrência de surtos da doença de Chagas aguda, principalmente na região da Amazônia Legal, devido ao consumo de açaí contaminado com insetos infectados, triturados junto com a polpa do fruto (Nóbrega *et al.*, 2009).

A doença de Chagas pode ser classificada evolutivamente em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda acontece logo após a infecção, podendo ser assintomática ou apresentar sinais febris que persistem entre quatro a oito semanas. Nesta fase há uma parasitemia considerável devido à multiplicação do parasito no interior das células do hospedeiro. Entretanto, o desenvolvimento da resposta imune contribui para a redução da parasitemia, levando o indivíduo para um estado aparentemente saudável, iniciando a fase crônica que dura por toda a vida do indivíduo infectado (Coura, 2009; Moncayo & Silveira, 2009).

A fase crônica pode ser classificada em quatro formas clínicas de acordo com as alterações apresentadas pelo indivíduo: indeterminada (IND), digestiva (DIG), cardíaca (CARD) ou cardiodigestiva (CDG). A forma IND está presente na maioria dos pacientes, aproximadamente 60% (Macedo, 1980; Dias, 1989; Andrade *et al.*, 2011). Esses pacientes apresentam testes sorológicos e/ou parasitológicos positivos para o *T. cruzi* e exames clínicos eletrocardiográficos e radiológicos (silhueta cardíaca, esôfago e cólon) normais (Macedo, 1980; Dias, 1989; Moncayo & Silveira, 2009; Tanowitz *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2011). Os pacientes portadores da forma clínica IND podem permanecer sem manifestações clínicas graves atribuídas à persistência do parasito por toda a vida. Entretanto, cerca de 2 a 5% desses indivíduos irão desenvolver a forma CARD a cada ano, enquanto um menor percentual irá apresentar a forma DIG (Macedo, 1980; Dias, 1989).

A forma clínica DIG atinge 8% dos infectados no Brasil (Coura & Dias, 2009). Pacientes portadores dessa forma apresentam uma série de sintomas relacionados à obstrução do esôfago e do cólon. Estes órgãos exibem grande aumento do lúmen e hipertrofia da camada muscular, conhecido como megaesôfago e megacólon (Meneghelli, 1985; Matsuda *et al.*, 2009). Análises histológicas dos órgãos afetados têm demonstrado lesões inflamatórias do sistema nervoso entérico, com redução no número de neurônios (Rezende & Moreira, 2004). A forma CDG é a menos frequente, caracterizada por lesões compatíveis com as formas CARD e DIG simultaneamente (Barreto, 1979; Brener, 1987; Rezende & Moreira, 2004).

A forma clínica CARD é caracterizada por alterações eletrocardiográficas que variam de acordo com a extensão e localização das lesões cardíacas, alcançando cerca de 30% dos pacientes na fase crônica. A cardiopatia chagásica crônica é considerada a mais fibrosante dentre as miocardites conhecidas (Bogliolo, 1976), definida como uma miocardiopatia dilatada, com uma inflamação crônica de baixa intensidade, porém incessante, provocando um remodelamento cardíaco com destruição tissular progressiva e uma extensa fibrose no coração (Andrade *et al.*, 2011). O acúmulo progressivo de colágeno intersticial pode ser considerado o principal fator responsável pela piora progressiva da função contrátil do miocárdio que nela se observa (Tafari, 1985). Um aspecto importante na sua patogenia é a ativação crônica de fatores inflamatórios no miocárdio, que pode implicar em pior prognóstico desta doença em relação às cardiopatias de outras etiologias (Mocelin *et al.*, 2005). 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, caracterizando a cardiomiopatia chagásica (Mady *et al.*, 1994; Rocha *et al.*, 2003; 2007). A morte súbita constitui um dos fenômenos mais expressivos da história natural da cardiopatia chagásica crônica, acometendo indivíduos nas etapas mais produtivas de suas vidas e constitui a principal causa de óbito nesta enfermidade (Rocha *et al.*, 2007).

Os mecanismos envolvidos no estabelecimento/manutenção das diferentes formas clínicas da doença de Chagas são complexos e ainda foram esclarecidos. A resposta imune que se segue à infecção pelo *T. cruzi* representa um importante fator na determinação do destino da infecção, mobilizando múltiplos mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata e adquirida. A ativação do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o desenvolvimento de lesões e das manifestações clínicas observadas nos pacientes. A hipótese mais bem aceita atualmente para o desenvolvimento das formas clínicas polares (IND e CARD) durante a fase crônica da doença de Chagas tem a imunorregulação como ponto central. Pacientes com a forma IND são capazes de eliminar os parasitos de forma eficiente durante a fase aguda e montam uma resposta imune regulada, capaz de limitar o desenvolvimento da patologia. Em contrapartida, pacientes com a forma clínica CARD conseguem controlar a carga parasitária, entretanto, não desenvolvem mecanismos imunorreguladores adequados, favorecendo assim uma inflamação persistente (Dutra & Gollob, 2008). Aliado a isso, a presença de níveis elevados de citocinas e quimiocinas induzidas pelo

T. cruzi no infiltrado inflamatório no miocárdio pode levar a alterações crônicas na estrutura cardíaca, tais como deposição de colágeno e fibrose (Ribeiro dos Santos *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2002). Considerando a complexidade das interações imunológicas desencadeadas durante a infecção pelo *T. cruzi*, ainda são necessários esclarecimentos mais detalhados a respeito das populações e subpopulações celulares diretamente envolvidas nos mecanismos de resistência e morbidade da doença. O infiltrado inflamatório presente no coração dos pacientes durante a fase crônica é composto, em sua maioria, por células T CD4⁺ e CD8⁺. Contudo, células da imunidade inata como neutrófilos e monócitos também estão presentes, embora em menor número e extensão (Molina & Kierszenbaum, 1989; Higuchi *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1993; Muniz-Junqueira *et al.*, 2004; Bonney & Engman, 2008).

Os neutrófilos são as células efetoras da imunidade inata e participam da primeira linha de defesa do organismo contra agentes patogênicos, exercendo sua função microbicida através da fagocitose, degranulação de proteínas líticas, produção de reativos intermediários de oxigênio e, mais recentemente, através de NETosis - produção/liberação de NETs (*neutrophil extracellular traps*) que aprisionam e eliminam o patógeno de forma extremamente efetiva (Brinkmann *et al.*, 2004; Tecchio *et al.*, 2014). Além disso, descobertas recentes indicam que os neutrófilos também são células apresentadoras de antígenos profissionais, capazes de polarizar a resposta de linfócitos T e apresentarem antígenos através da interação de suas NETs com os receptores de célula T (TCR) (Tillack *et al.*, 2012). De forma complementar, Pillary e colaboradores (2012) descreveram um tipo de neutrófilo “regulador” capaz de suprimir a proliferação de linfócitos T via produção de H₂O₂ e sinalização por Mac-1. Puga *et al.* (2011) descreveram ainda a existência de neutrófilos “helpers”, capazes de ativar linfócitos B, promovendo troca de classe de imunoglobulinas, hipermutação somática e produção de anticorpos de forma T-independente, num mecanismo envolvendo algumas citocinas. Todavia, os neutrófilos vêm recebendo maior atenção nos últimos tempos por sua contribuição em processos de inflamação crônica, através da produção de citocinas, quimiocinas e proteases (Mantovani *et al.*, 2011; Tecchio *et al.*, 2014). No contexto da doença de Chagas, Chen e colaboradores (2001) observaram que neutrófilos podem desempenhar funções opostas em linhagens distintas de camundongos com relação a proteção/exacerbação da infecção, possivelmente através do controle da resposta Th1/Th2 em diferentes direções. Adicionalmente, Gomes e colaboradores (2012) demonstraram que neutrófilos de pacientes chagásicos não apresentam diferença na capacidade fagocítica quando comparados com indivíduos não infectados (NI). Entretanto, neutrófilos dos pacientes IND demonstraram uma

diminuição considerável na produção de citocinas, que poderia influenciar a capacidade fagocitária dos neutrófilos nestes pacientes.

Os monócitos compreendem uma subpopulação celular com notável plasticidade, podendo diferenciar-se em uma grande variedade de células e executar funções versáteis durante a infecção, formação de tumores e na inflamação crônica (Geissmann *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2015). A capacidade destas células para processar e apresentar antígenos, produzir citocinas e proporcionar sinais co-estimuladores demonstra o seu papel crucial na iniciação de respostas imunológicas (Souza *et al.* 2004; Italiani & Boraschi, 2014). Em doença de Chagas, o estudo de Souza *et al.* (2007) demonstrou que monócitos de pacientes IND apresentam um comprometimento com a resposta reguladora, através da alta produção de IL-10 e baixo estado de ativação caracterizado por baixa expressão de HLA-DR. Por outro lado, monócitos de pacientes CARD apresentam alta expressão de TNF- α e HLA-DR e podem ser destinados a indução de uma resposta inflamatória. Confirmando essa hipótese, monócitos de pacientes IND apresentam capacidade fagocítica diminuída em relação a indivíduos NI, contudo, expressam elevados níveis de óxido nítrico (NO) capaz de controlar a replicação do parasito (Gomes *et al.* 2012). Em estudo recente, Gomes *et al.* (2014) demonstraram que a depleção de monócitos aderentes em culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) induziu a diminuição considerável de citocinas no sobrenadante, após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. De forma complementar, de Pinho e colaboradores (2014) observaram o aumento da concentração da MMP-9 no sobrenadante de cultura de macrófagos após a infecção com *T. cruzi*.

Neutrófilos e monócitos estão envolvidos nos processos inflamatórios e no remodelamento tecidual, especialmente através da produção de citocinas e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Wright & Friedland, 2004; Kasama *et al.*, 2005; de Pinho *et al.*, 2014). Entretanto, seu desempenho no remodelamento cardíaco durante a cardiopatia chagásica ainda não está completamente estabelecido.

O remodelamento cardíaco é uma alteração na conformação das células e da matriz extracelular (MEC) do coração em resposta a uma agressão, resultando em mudanças moleculares, celulares e intersticiais miocárdicas. Dessa forma, o miocárdio apresenta variações no tamanho, forma e na fração de ejeção. O remodelamento cardíaco também é um mecanismo adaptativo à sobrecarga hemodinâmica, permitindo ao coração manter suas funções em vigência, apesar da sobrecarga (Cohn *et al.*, 2000; Mendes *et al.*, 2010). Essas alterações foram observadas em várias configurações na insuficiência cardíaca congestiva, no infarto agudo do

miocárdio, na fibrose cardíaca decorrente à fase crônica da doença de Chagas e podem ser atribuídas às mudanças da MEC entre os cardiomiócitos (Vanhoutte *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2008; Calvet *et al.*, 2009; Polyakova *et al.*, 2011).

A função biológica da MEC é o suporte estrutural, sendo capaz de manter a arquitetura do tecido, preenchendo os espaços entre as células no interstício. Além disso, confere adesão e forma, permitindo a migração, a proliferação e a diferenciação das células adjacentes (Adair-Kirk & Senior, 2008). Alterações na MEC, como mudanças no equilíbrio entre sua síntese e degradação e na continuidade da rede de colágeno fibrilar, são as características essenciais do remodelamento tecidual que ocorre em muitos processos patológicos, como na cardiopatia chagásica (Spinale *et al.*, 2000; Calvet *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2011). Torna-se cada vez mais evidente que a MEC do miocárdio não é uma estrutura estática e sim uma entidade dinâmica, que pode desempenhar um papel fundamental na adaptação das células cardíacas às situações de estresse, facilitando o remodelamento tecidual (Adair-Kirk & Senior, 2008). Estudos realizados em humanos e animais relatam que alterações na interface do colágeno, tanto em termos de estrutura e composição, ocorrem nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo, podendo influenciar a geometria do miocárdio. (Spinale *et al.*, 2000; Spinale, 2002; Adair-Kirk & Senior, 2008). Além disso, a reparação do tecido pelo processo de fibrose que ocorre após a apoptose dos cardiomiócitos, tem ganhado importância na busca por novos biomarcadores (Adair-Kirk & Senior, 2008; Calvet *et al.*, 2009; Polyakova *et al.*, 2011).

Na cardiomiopatia chagásica crônica, assim como em outras cardiomiopatias inflamatórias dilatadas, a fibrose ocorre em consequência da infiltração maciça e constante de células inflamatórias no miocárdio (Marin-Neto *et al.*, 2007; Cunha-Neto & Chevillard, 2014). Este processo é mediado por citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento que regulam a migração, proliferação e diferenciação celular, assim como a produção e degradação de diferentes componentes de matriz extracelular. A produção da citocina TGF- β em áreas próximas a lesões pode contribuir para a hipertrofia de miócitos e para a deposição de matriz extracelular (Araújo-Jorge *et al.*, 2008). Também foi observado um papel importante da IL-1 β e do TNF- α na insuficiência cardíaca por promover a hipertrofia do miocárdio e induzir a apoptose dos cardiomiócitos, possivelmente por seu envolvimento na inflamação e na indução de MMPs (Gulick *et al.*, 1989; Kumar *et al.*, 1996; Bujak & Frangogiannis, 2009; Van Tassell *et al.*, 2015).

A fibrose desempenha um papel duplo no remodelamento cardíaco após lesão. Por um lado, é pré-requisito para o reparo de danos teciduais, por outro, contribui para a dilatação

ventricular e desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Aliás, fibrose cardíaca não é definida apenas pelo aumento da MEC no interstício dos cardiomiócitos, mas também pela mudança na conformação, no tipo, na organização e nas ligações cruzadas do colágeno (Li *et al.*, 2000). Durante a mudança na conformação da matriz cardíaca o colágeno é substituído por fibras colágenas de fraca capacidade de interação, em um processo dependente das MMPs que promove a dilatação dos ventrículos (Brower *et al.*, 2006). De forma complementar, a destruição da MEC permite que seus fragmentos, conhecidos como matriquinas, regulem a atividade de células do tecido conjuntivo e favoreçam a inflamação (Li *et al.*, 2000). Assim, a fibrose evolui à medida que aumenta a ação das MMPs.

As MMPs compreendem um amplo grupo de aproximadamente 24 endopeptidases zinco-dependentes, classificadas de acordo com sua afinidade por determinado substrato e com a organização de seu domínio catalítico. Os principais grupos de MMPs são: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e MMPs de membrana (Kupai *et al.*, 2010; Geurts *et al.*, 2012). As collagenases correspondem a MMP-1, MMP-8 e MMP-13, são capazes de clivar principalmente o colágeno I, II e III do interstício. O grupo das gelatinases é composto por MMP-2 e MMP-9, que digerem a gelatina, desnaturam o colágeno IV, fibronectina e elastina. As matrilisinas, MMP-7 e MMP-26, digerem a fibronectina e gelatinas. As MMPs de membrana são MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25, que podem digerir várias proteínas da MEC, como gelatina, fibronectina e laminina. As estromelisinases, MMP-3 e MMP-10, degradam principalmente a caseína, a laminina e a gelatina. Embora a MMP-11 seja conhecida como uma estromelisinase, ela apresenta diferença na sequência de aminoácidos e no seu substrato específico quando comparada com a MMP-3 e MMP-10. Por isso, a MMP-11 também pode ser incluída no sexto grupo, que abrange as endopeptidases remanescentes MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28 que ainda não é completamente conhecido (Snoek-Van Beurden & Von Den Hoff, 2005).

Uma das funções dessas endopeptidases é a degradação de componentes da MEC, sendo reguladores importantes de uma variedade de processos fisiológicos, como a angiogênese, a morfogênese e a reparação tecidual. Entretanto, o desequilíbrio entre as MMPs e seus inibidores está envolvido em diversas situações patológicas como câncer, doenças cardiovasculares, artrite, diabetes, entre outras (Vanhoutte *et al.*, 2006; Page-McCaw *et al.*, 2007; Ghajar *et al.*, 2008; Gharagozlian *et al.*, 2009). Desde sua descoberta inicial, há cerca de 50 anos, as MMPs têm emergido como mediadores essenciais na definição de como as células interagem com o seu microambiente circundante (Gross & Lapiere, 1962). Além disso, as

MMPs atuam na resposta imune, ativando citocinas e quimiocinas e, assim, participando ativamente da inflamação (Li *et al.*, 2000; Vanhoutte *et al.*, 2006; Kupai *et al.*, 2010; Polyakova *et al.*, 2011).

As MMPs são secretadas ao meio extracelular ou expressas na membrana celular como pró-enzimas, em sua forma inativa. O processo de ativação enzimática pode acontecer em vários níveis, na transcrição, pós-transcrição ou ainda a nível proteico (Geurts *et al.*, 2012; Mannello & Medda, 2012; Duarte *et al.*, 2015) e envolve a perda de uma sequência do pró-peptídeo N-terminal, com cerca de 80 aminoácidos. O estado de latência das MMPs é garantido a partir da ligação zinco-cisteína no domínio catalítico, ocluindo o sítio para ligação do substrato (Sela-Passwell *et al.*, 2010). A etapa de ativação/inibição *in vivo* pode ser mediada por outras MMPs, por citocinas ou por seus inibidores endógenos e *in vitro* por tratamento químicos com ureia, detergentes e radicais livres alternadamente (Geurts *et al.*, 2012). Apesar da homologia no domínio catalítico das MMPs, cada enzima tem uma função especial no tecido (Gaffney *et al.*, 2015).

Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são uma família de quatro inibidores fisiológicos identificados (TIMP 1-4) capazes de regular a atividade proteolíticas das MMPs nos tecidos. Apesar da terminologia os TIMPs são encontrados também solúveis no plasma, assim como as MMPs (Nikkola *et al.*, 2005; Min *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2015). Os TIMPs se ligam reversivelmente as MMPs com a razão estequiométrica 1:1, formando um sistema importante para o controle da atividade endógena das MMPs *in vivo* (Spinale *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2015). A função inibitória do TIMPs ocorre através de uma interação entre o íon Zn^{2+} do sítio ativo da MMPs com os resíduos de cisteína N-terminal do TIMPs (Moore *et al.*, 2012).

Os processos que envolvem o remodelamento da MEC no coração têm sido relacionados principalmente com as gelatinases, MMP-2 e MMP-9. Muitos estudos apontam a presença das gelatinases no coração e sua capacidade em degradar os componentes da MEC (Brower *et al.*, 2006; Vanhoutte *et al.*, 2006; Polyakova *et al.*, 2011). A atividade das MMPs descontrolada resulta em degradação e substituição do colágeno, a inflamação, a fibrose e uma dilatação ventricular progressiva (Li *et al.*, 2000). Também foi observada a capacidade das gelatinases em clivar proteínas intracelulares como trombina e miosina durante o estresse oxidativo (Opdenakker *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2003; Nagase *et al.*, 2006). Um estudo de Schulz (2007) descreveu a ativação da MMP-2 e MMP-9 após isquemia e correlacionou negativamente sua atividade aumentada com o índice de função contrátil do ventrículo esquerdo.

Além disso, a MMP-2 e a MMP-9 já foram associadas com a infecção pelo *T. cruzi* em outros estudos. Geurts e colaboradores (2012) observaram que o *T. cruzi* foi capaz de reduzir formas latentes e ativas da MMP-9 *in vitro*. No entanto, o mesmo protozoário foi capaz de induzir a MMP-2 e a MMP-9 em culturas de cardiomiócitos. Gutierrez *et al.*, (2008) trataram camundongos infectados pelo *T. cruzi* com inibidores de MMPs e descreveram uma diminuição na inflamação no coração e aumento da sobrevida, acompanhado de níveis reduzidos de IFN- γ , TNF- α e NO. Nosso grupo de trabalho, em estudo pioneiro com humanos, observou um comportamento distinto entre a MMP-2 e MMP-9 na fisiopatologia da doença de Chagas. Nossos dados demonstram que a MMP-9 parece estar envolvida com a inflamação e o remodelamento cardíaco da doença de Chagas, enquanto a MMP-2 não apresentou correlação com moléculas inflamatórias (Fares *et al.*, 2013).

Embora muitos trabalhos tenham contribuído para o esclarecimento da fisiopatologia da doença de Chagas, os mecanismos que expliquem a evolução cardíaca da doença e a distinção das manifestações clínicas ainda não foram totalmente estabelecidos. Considerando a interação entre as MMPs, os TIMPs, as citocinas e as células da imunidade inata como importantes para compreensão da origem das alterações patológicas do miocárdio e a ausência de estudos que correlacionem essas células com essas moléculas durante a cardiopatia chagásica, este trabalho é fundamental para definição da sua participação no remodelamento cardíaco na doença de Chagas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo atende aos aspectos fundamentais da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. O projeto original e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) foram encaminhados para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa René Rachou e da Universidade Federal de Minas Gerais, obtendo parecer favorável e registrado sob número 15/2011 – CEP SH – CPqRR (Anexo B) e CAAE – 0502.0.203.000-11 (Anexo C), respectivamente.

4.2 População estudada

Os indivíduos que participaram deste estudo foram classificados em três grupos de acordo com as características clínicas e laboratoriais estabelecidas.

- **Grupo de indivíduos não infectados (NI):** Constituído por indivíduos saudáveis, que apresentaram um mínimo de dois resultados sorológicos negativos para doença de Chagas e ausência de alterações cardíacas.
- **Grupo de pacientes com a forma clínica indeterminada (IND):** Composto por pacientes com positividade sorológica e/ou parasitológica para doença de Chagas e ausência de sintomas através de eletrocardiograma (ECG) convencional normal e exames radiológicos do coração, cólon e esôfago normais.
- **Grupo de pacientes com a forma clínica cardíaca (CARD):** Constituído por pacientes com positividade sorológica e/ou parasitológica para doença de Chagas, no estágio mais avançado de cardiomiopatia dilatada, apresentando alterações graves no ECG, extra-sístoles ventriculares frequentes, aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole e silhueta cardíaca aumentada.

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/UFGM. Os critérios e descrição das formas clínicas foram baseados de acordo com Rocha *et al.*, 2007. Os indivíduos não infectados foram selecionados pelos pesquisadores, pertencendo ao convívio pessoal dos

mesmos, cuja procedência demográfica era conhecida, considerando os critérios de exclusão mencionados a seguir.

4.2.1 Critérios de inclusão

Após avaliação clínica, eletrocardiográfica e laboratorial, os pacientes chagásicos foram selecionados 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;
- Níveis de tensão arterial dentro de faixa na normalidade (sistólica <130 mmHg e diastólica <90 mmHg).
- Presença de alterações eletrocardiográficas (ECG) compatíveis com associação do bloqueio completo do ramo direito e hemibloqueio anterior esquerdo;
- Ausência de evidências clínicas e complementares de acometimento cardíaco não relacionado à doença de Chagas;
- Ausência de condições clínicas que possam alterar a função cardiocirculatória;
- Conclusão dos exames propostos;
- Consentimento voluntário de participação na pesquisa.

4.2.2 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 não induzido por medicamento;
- 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 420g de etanol (média diária acima de 60g 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.

4.3 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, gentilmente cedida pelo Dr. Policarpo Ademar Sales Junior. Os parasitos foram lavados três vezes em solução salina (PBS 0,15M pH=7,4) por centrifugação e a massa úmida foi congelada e descongelada três vezes em nitrogênio líquido. Completou-se a ruptura total dos parasitos por homogeneização em tubos Potter Elvehjem a 20.000g 5 vezes por 60 segundos cada, com 30 segundos de intervalo em banho de gelo. Subsequentemente, as suspensões foram centrifugadas a 50000g durante 60 minutos a 4°C com 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 final utilizada foi de 20µg/mL.

4.4 Análise da expressão das metaloproteinases e das citocinas em neutrófilos e monócitos de pacientes portadores da doença de Chagas por reações de imunofluorescência através de citometria de fluxo

4.4.1 Ex vivo

Alíquotas de 100µL de sangue dos indivíduos que participaram deste estudo foram coletadas a vácuo em tubos de 5mL contendo anticoagulante etilenodiaminoteracético (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 conjugados com proteína piridina de 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 (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) seguidos por uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 20µL de anticorpo anti-MMPs/citocinas conjugado com ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído em PBS-P aos respectivos tubos, 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 (*Mac's Facs Fix*- 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. A molécula de superfície analisada foi CD14 PerCP (BD, USA. Clone MΦP9). Os marcadores intracitoplasmáticos analisados foram: MMP-2 PE (R&D Systems. Clone 1A10), MMP-9 FITC

(R&D Systems. Clone 56129), TGF- β PE (BD, USA. Clone TW4-9E7), IL-1 β PE (BD, USA. Clone AS10), TNF- α (BD, USA. Clone 6401.1111) e IL-10 PE (BD, USA. Clone JES3-9D7). A diluição para esses marcadores intracitoplasmáticos foi de 1:7.

4.4.2 Após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*

O sangue dos indivíduos que participaram deste estudo foi coletado em tubo Vacutainer estéril contendo heparina. Alíquotas de 1mL de sangue total foram adicionadas a tubos de polipropileno de 14mL (Falcon, E.U.A). O sangue periférico foi incubado na presença de meio *Roswell Park Memorial Institute* - RPMI (Gibco), recebendo a denominação de cultura controle (Meio) ou na presença de antígenos solúveis tripomastigotas do *T. cruzi*, com uma concentração final de 20 μ g/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 20 μ L 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 das moléculas no interior da célula, uma vez que essa substância interfere no transporte intracelular quando rompe o aparelho de Golgi. Após a incubação, 200 μ L 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 200 μ L deste sangue para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon, EUA) previamente identificados e com os anticorpos de superfície correspondentes e em seguida, incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lisadas e fixadas em 2mL de solução de lise (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 200 μ L 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) foram adicionados 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) seguido por uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação foi adicionado 20μL de anticorpo anti-citocina ou anti-MMPs marcado com PE, diluído em PBS-P aos respectivos tubos, 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 200μL 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 totais. A molécula de superfície analisada foi CD14 PerCP (BD, USA. Clone MΦP9). Os marcadores intracitoplasmáticos analisados foram: MMP-2 PE (R&D Systems. Clone 1A10), MMP-9 FITC (R&D Systems. Clone 56129), TGF-β PE (BD, USA. Clone TW4-9E7), IL-1β PE (BD, USA. Clone AS10), TNF-α (BD, USA. Clone 6401.1111) e IL-10 PE (BD, USA. Clone JES3-9D7). A diluição para esses marcadores intracitoplasmáticos foi de 1:7.

4.5 Aquisição e estratégias de análise dos dados

O citômetro de fluxo (FACScalibur- BD, E.U.A) utilizado neste trabalho é equipado com lâmpada de argônio que permite a avaliação básica de 6 parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4). FL1, FL2, FL3 e FL4 correspondem respectivamente a sinais luminosos emitidos pela excitação de FITC, PE, PerCP e APC. A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e subpopulações, foram feitas através do software *FlowJo*. Foram coletados 70.000 eventos totais para análise dos dados.

A seleção da população de monócitos foi realizada a partir de gráficos de distribuição por densidade de pontos de FL3 (CD14) versus granulosidade (SSC) (Figura 1), onde a população de monócitos apresenta baixa granulosidade (200-400) e alta intensidade de fluorescência para CD14. A população de neutrófilos foi selecionada a partir de gráficos de distribuição por densidade de pontos de FL3 (CD14) versus granulosidade (SSC) (Figura 1),

onde a população de neutrófilos apresenta alta granulosidade (300-800) e intensidade de fluorescência intermediária para CD14. Após a seleção da população de interesse foram construídos gráficos de histograma para análise dos marcadores intracelulares. As metaloproteinases foram avaliadas por intensidade média de fluorescência (IMF) e as citocinas por percentual de células produtoras.

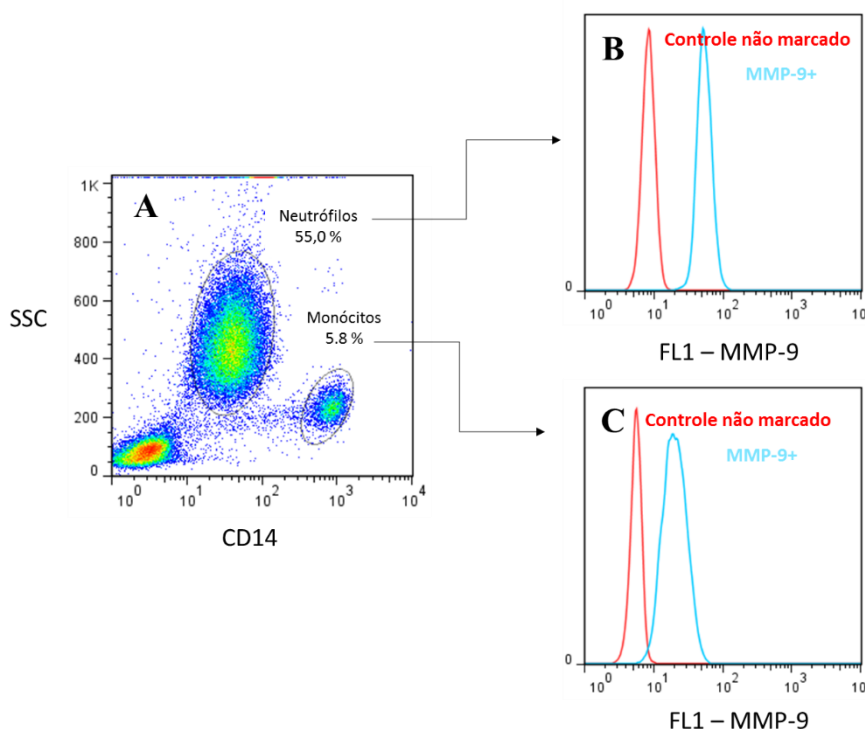


Figura 1. Estratégia de análise dos dados.

(A) Gráfico de densidade de pontos que representa o perfil de monócito e neutrófilos a partir da granulosidade (SSC) versus CD14. As linhas vermelhas representam o controle de células não marcadas. As linhas azuis correspondem as células positivas para MMP-9 na população de neutrófilos (B) e monócitos (C). A mesma estratégia foi utilizada para os outros marcadores avaliados.

4.6 Perfil de expressão de metaloproteinases e citocinas após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*

A partir dos resultados obtidos, o perfil de expressão das moléculas intracelulares por neutrófilos e monócitos foi definido em “baixo” e “alto” produtores. Para isso, a mediana foi estabelecida para os três grupos agregados, em cada molécula avaliada, considerando os dados obtidos em IMF para as MMPs e percentual de células positivas para as citocinas e as diferentes subpopulações (monócitos e neutrófilos). Em acordo com resultados anteriores da

literatura e do nosso grupo de pesquisa estabeleceu-se IL-10 e MMP-2 como moléculas regulatórias e IL-1 β , TGF- β , TNF- α e MMP-9 como moléculas inflamatórias (Araújo-Jorge *et al.*, 2008; Fares *et al.*, 2013; Saraiva *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2014), um total de seis parâmetros avaliados. Desta forma, quando os valores para cada paciente e cada molécula estavam acima da mediana encontrada, os neutrófilos e monócitos foram classificados em “alto” produtor inflamatório/regulatório dependendo da molécula em questão. Quando o valor estava abaixo da mediana considerou-se a célula como “baixo” produtora. O total foi definido para cada paciente, considerando a predominância de “alto” produtores em relação a maioria de baixo produtores. É importante ressaltar que o perfil global de citocinas foi construído considerando o mesmo peso para cada molécula e cada subpopulação de neutrófilos e monócitos. Quando houve igualdade entre o “alto” produtores inflamatório e regulatório o paciente foi classificado como “misto” (inflamatório/regulatório). Por fim, um diagrama de cores e um gráfico foram ilustrados a fim de permitir a visualização do perfil total de produção de citocinas e MMPs para os neutrófilos e monócitos nos grupos NI, IND e CARD.

4.7 Detecção da MMP-2 e -9 e do TIMP-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 biotinizado 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 biotinizado 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.

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA). Os dados apresentaram distribuição não paramétrica, aplicando-se o teste Mann-Witney entre os grupos avaliados. Para verificar diferenças estatísticas entre as culturas estimuladas ou não com antígenos do parasito foi realizada análise pareada empregando o teste de Wilcoxon, seguido de Rank. A ocorrência de valores “outliers” foi verificada utilizando o teste de Grubbs. O intervalo de confiança definido foi 95% e as diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Para verificar a correlação entre as variáveis estudadas aplicou-se o coeficiente de Spearman. O índice de correlação (r) pode variar entre -1 a 1 e foi utilizado para estabelecer a força da correlação. Quando $r < 0$ a correlação é negativa, quando $r > 0$ há uma correlação positiva. Para este estudo foi considerado apenas correlações fortes, sendo as positivas com $r > 0,63$ e as negativas com $r > -0,63$. Além disso, o nível de significância definido foi $p < 0,05$.

5.1 Avaliação da expressão de MMP-2 e MMP-9 em neutrófilos

A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações clínicas observadas em alguns pacientes (Gomes *et al.*, 2005; Dutra & Gollob, 2008; Sathler-Avelar *et al.*, 2009). Além da produção de citocinas, os leucócitos também estão envolvidos na produção e secreção das MMPs, principalmente MMP-9 (Opdenakker *et al.*, 2001; Brunner *et al.*, 2010; Edsparr *et al.*, 2011).

Dados recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram um aumento significativo na expressão de MMP-2 e MMP-9 em linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico de pacientes infectados pelo *T. cruzi* durante a fase crônica (Fares *et al.*, 2013). Partindo deste princípio e da premissa que os neutrófilos são os leucócitos com maior capacidade de produzir MMPs (Opdenakker, 2001), aliado a sua capacidade de interagir e regular a resposta imune adaptativa (Mantovani *et al.*, 2011; Kurihara *et al.*, 2012), avaliamos a expressão dessas gelatinases por estas células nos grupos NI, IND e CARD antes (contexto *ex vivo*) e após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.

Os resultados mostram um aumento significativo na expressão de MMP-2 em neutrófilos dos pacientes com doença de Chagas em relação ao grupo NI (Figura 2A). A análise estatística mostra uma diferença entre a cultura controle e a cultura estimulada com antígenos Tripo, que após o estímulo apresentou decréscimo significativo na expressão intracelular de MMP-2 nos grupos IND e CARD (Figura 2A). Para a expressão da MMP-9 observamos um aumento significativo nos neutrófilos do sangue periférico de pacientes com doença de Chagas após o estímulo *in vitro* (Figura 2B).

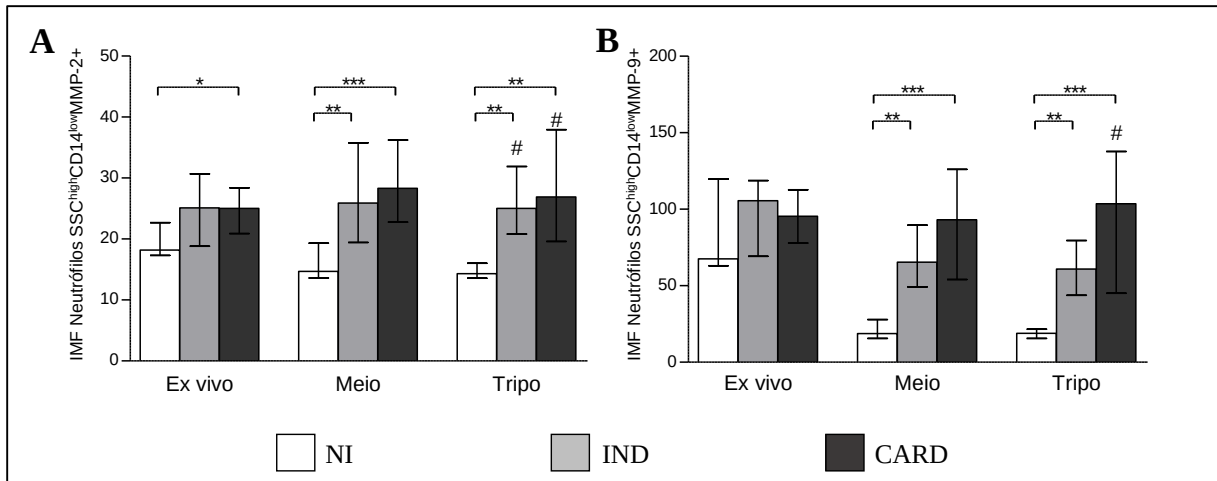


Figura 2. Análise da expressão da MMP-2 e MMP-9 em neutrófilos.

A expressão da MMP-2 (A) e MMP-9 (B) foi avaliada em neutrófilos $SSC^{high}CD14^{low}MMP^{+}$ do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI, n=6) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=8) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas. Os dados foram apresentados como intensidade média de fluorescência (IMF) no contexto *ex vivo*, na cultura controle (Meio) e na cultura estimulada (Tripo). Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas e pelo símbolo (*). O símbolo (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura estimulada com Tripo e a cultura controle.

A razão entre a MMP-9/MMP-2 também foi calculada a fim estabelecer uma proporção entre as duas gelatinases nos grupos estudados. A partir dos dados apresentados na figura 3 podemos constatar que a expressão da MMP-9 é significativamente maior em relação a MMP-2 após o estímulo *in vitro*, principalmente nos pacientes infectados IND e CARD em comparação ao grupo controle NI.

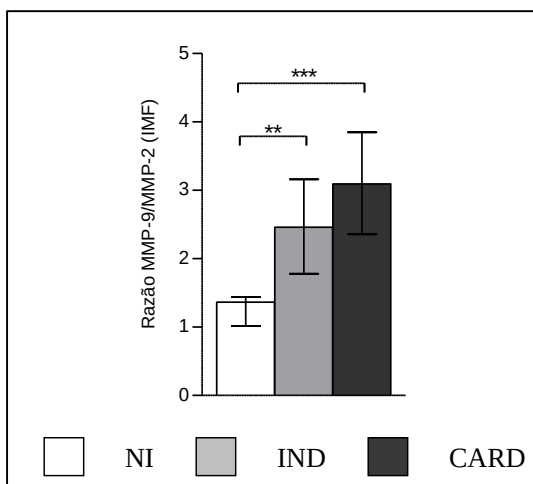


Figura 3. Razão entre a expressão de MMP-9/MMP-2 em neutrófilos.

A razão foi calculada a partir dos valores obtidos por intensidade média de fluorescência (IMF) para MMP-2 e MMP-9 em neutrófilos $SSC^{high}CD14^{low}MMP^{+}$ do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI, n=6) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=8) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas e pelo símbolo (*).

5.2 Avaliação da expressão de MMP-2 e MMP-9 em monócitos

Apesar do grande número de estudos envolvendo os monócitos na doença de Chagas (Kayama & Takeda, 2010; Gomes *et al.*, 2012, 2014), pouco se sabe a respeito de sua participação na expressão de MMPs durante a fase crônica da doença.

Os resultados obtidos mostram que monócitos de pacientes infectados em fase crônica apresentam maior expressão de MMP-2 (Figura 4A) e MMP-9 (Figura 4B) após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Observamos, ainda, que para monócitos a expressão de MMP-2 apresentou um decréscimo significativo após o estímulo *in vitro* quando comparamos com a cultura controle (Figura 4A).

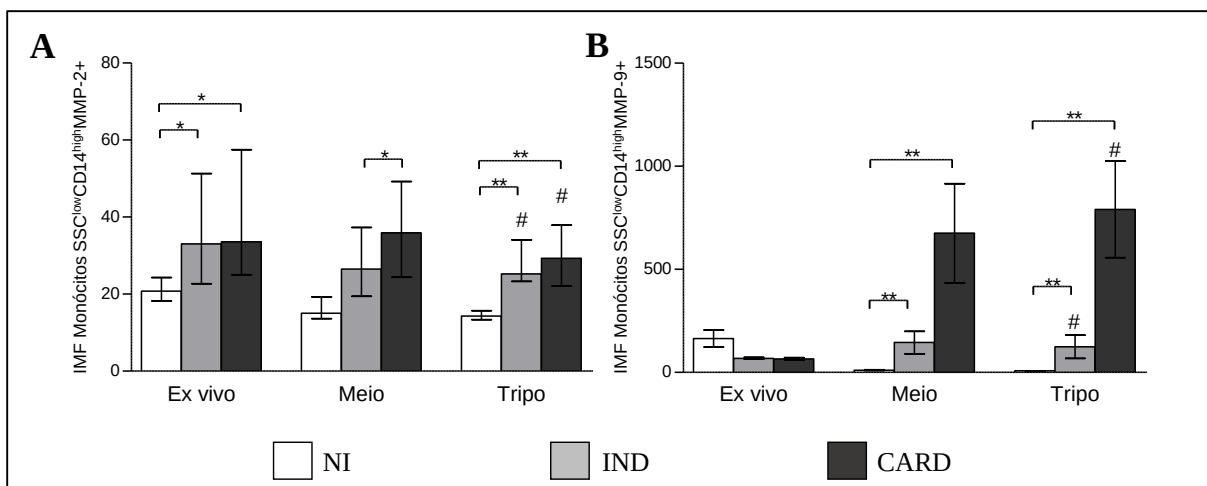


Figura 4. Análise da expressão da MMP-2 e MMP-9 em monócitos.

A expressão da MMP-2 (A) e MMP-9 (B) foi avaliada em neutrófilos SSC^{low}CD14^{high}MMP⁺ do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI, n=6) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=8) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas. Os dados foram apresentados como intensidade média de fluorescência (IMF) no contexto *ex vivo*, na cultura controle (Meio) e na cultura estimulada (Tripo). Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas e pelo símbolo (*). O símbolo (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura estimulada com Tripo e a cultura controle.

O cálculo da razão entre as MMPs confirma a maior expressão da MMP-9 em relação a MMP-2 nos grupos dos pacientes IND e CARD, após estímulo *in vitro* com antígenos derivados do *T. cruzi* em relação ao controle NI (Figura 5).

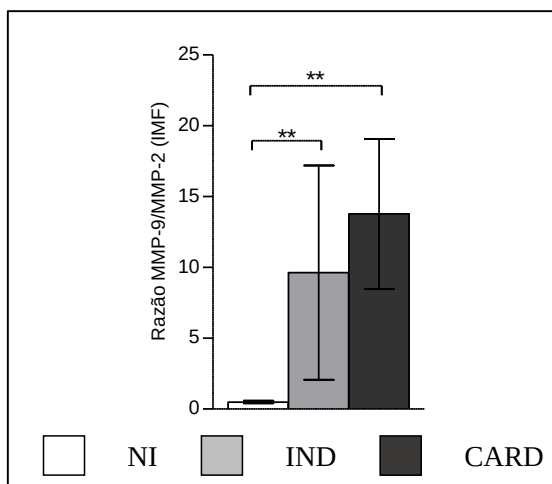


Figura 5. Razão entre a expressão de MMP-9/MMP-2 em monócitos.

A razão foi calculada a partir dos valores obtidos por intensidade média de fluorescência (IMF) para MMP-2 e MMP-9 em monócitos $SSC^{\text{low}}CD14^{\text{high}}MMP^+$ do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI, n=6) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=8) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas e pelo símbolo (*).

5.3 Avaliação da expressão das citocinas em neutrófilos

Para expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , TGF- β e TNF- α observou-se um aumento estatisticamente significativo antes e após o estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* em neutrófilos do sangue periférico dos grupos IND e CARD em relação ao grupo controle NI (Figuras 6A, 6B, 6C). Entretanto, para a citocina regulatória IL-10, constatou-se um aumento estatisticamente significativo em sua expressão por neutrófilos do grupo IND em relação aos grupos NI e CARD, antes e após estímulo *in vitro* (Figura 6D).

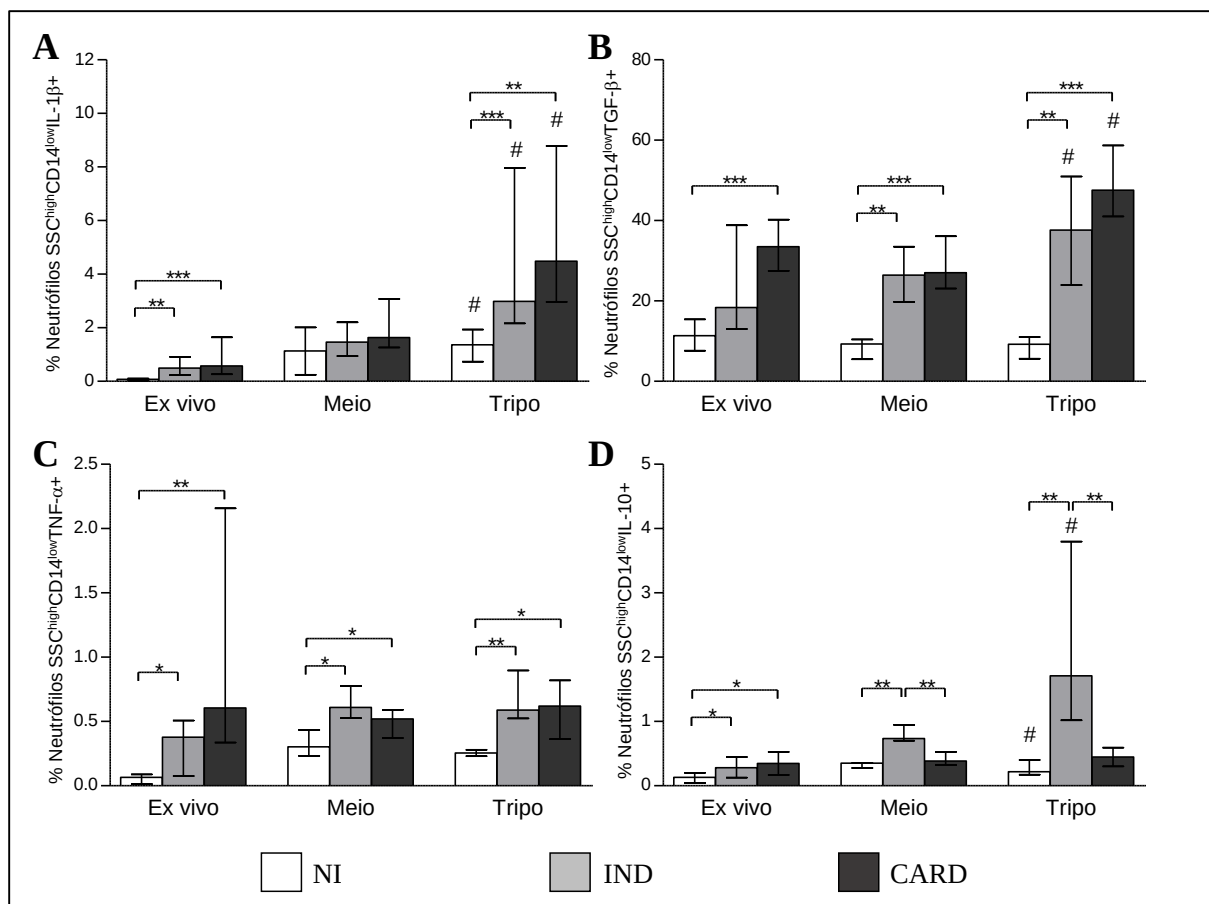


Figura 6. Análise da expressão das citocinas em neutrófilos.

A expressão das citocinas IL-1β (A), TGF-β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) foi avaliada em neutrófilos SSC^{high}CD14^{low}citocina⁺ do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI, n=6) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=8) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas. Os dados foram apresentados como percentual de células positivas no contexto *ex vivo*, na cultura controle (Meio) e na cultura estimulada (Tripo). Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas e pelo símbolo (*). O símbolo (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura estimulada com Tripo e a cultura controle.

5.4 Avaliação da expressão das citocinas em monócitos

Considerando os monócitos como importantes células na produção de citocinas, a expressão dessas moléculas também foi avaliada. A figura 7 representa a expressão de IL-1β, TGF-β, TNF-α e IL-10 em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos NI, IND e CARD.

Observa-se que não há alterações significativas na expressão de IL-1β e TGF-β nos monócitos do sangue periférico dos grupos avaliados antes e após estímulo *in vitro* com

antígenos do *T. cruzi* (Figura 7A e 7B). Contudo, os monócitos do sangue periférico de pacientes do grupo IND apresentaram um aumento significativo na expressão de TNF- α e IL-10 antes e após estímulo *in vitro* (Figura 7C e 7D).

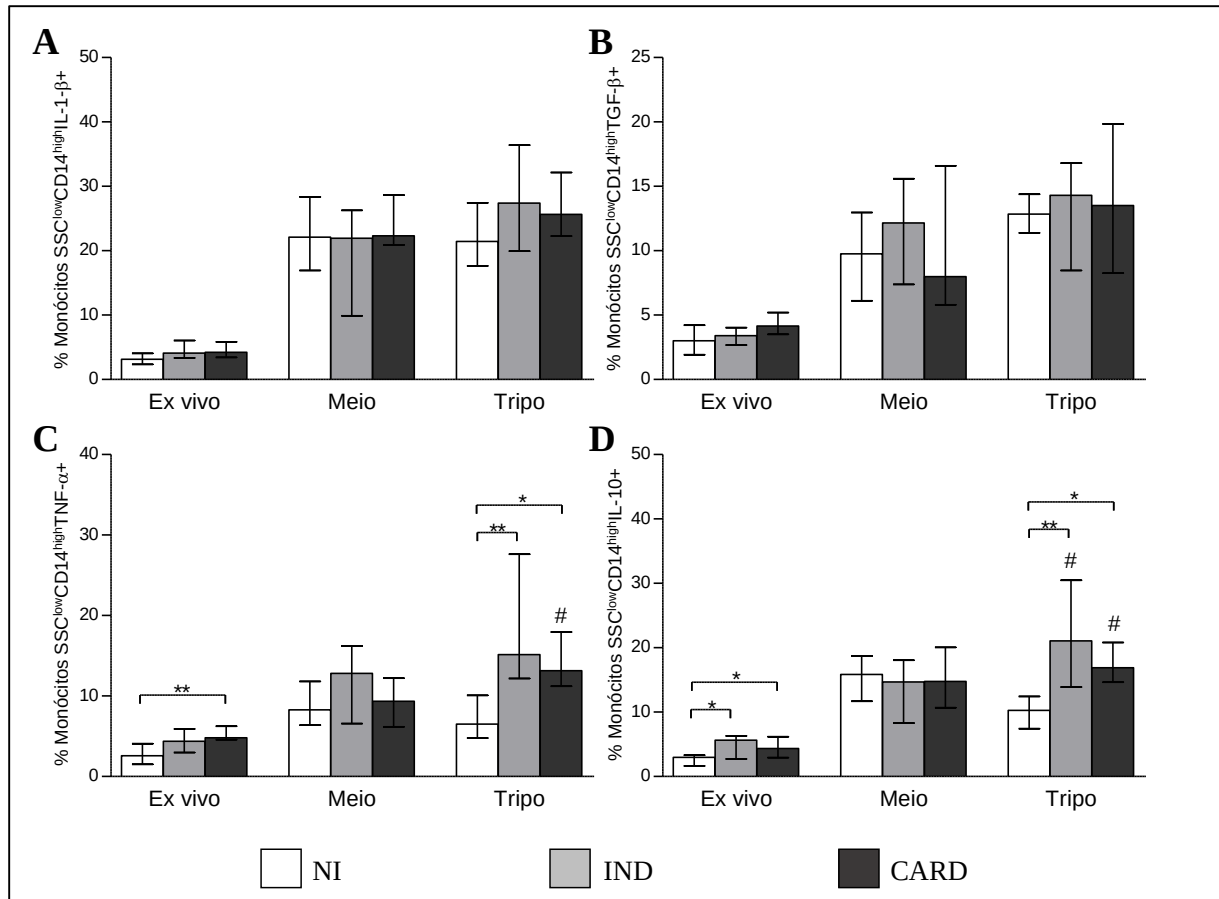


Figura 7. Análise da expressão das citocinas em monócitos.

A expressão das citocinas IL-1 β (A), TGF- β (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) foi avaliada em monócitos SSC^{low}CD14^{high}citocina⁺ do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI, n=6) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=8) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas. Os dados foram apresentados como percentual de células positivas no contexto *ex vivo*, na cultura controle (Meio) e na cultura estimulada (Tripo). Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas e pelo símbolo (*). O símbolo (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura estimulada com Tripo e a cultura controle.

5.5 Análise de correlação entre as MMP-2 e MMP-9 e as citocinas avaliadas após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*

A partir dos dados encontrados para expressão de MMP-2, MMP-9, IL-1 β , TGF- β , TNF- α e IL-10 em neutrófilos e monócitos do sangue periférico dos grupos avaliados, a próxima etapa foi a análise de correlação para verificar a relação entre essas moléculas.

Os resultados representados na figura 8 mostram uma correlação positiva entre a expressão da MMP-2 e a citocina anti-inflamatória IL-10 em neutrófilos do sangue periférico dos indivíduos dos grupos NI ($r=0,812$) e IND ($r=0,719$). Esse dado infere que quanto maior a expressão de MMP-2, maior a expressão de IL-10 nesses grupos. Para os neutrófilos do sangue periférico dos pacientes do grupo CARD nota-se uma correlação positiva entre a MMP-2 e a MMP-9 ($r=0,630$), além da correlação positiva entre as citocinas inflamatórias TGF- β ($r=0,831$), IL- β ($r=0,857$) e TNF- α ($r=0,831$).

Em contrapartida, a expressão de MMPs e citocinas por monócitos do sangue periférico do grupo NI não apresentou nenhuma correlação significativa (Figura 8). Porém, no grupo IND houve uma correlação negativa da MMP-2 com a citocina inflamatória IL-1 β ($r=-0,786$), indicando que quanto maior a expressão de MMP-2, menor a expressão de IL-1 β nos monócitos após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (Figura 8). Além disso, a expressão de MMP-2 apresentou correlação positiva com a expressão de MMP-9 nos monócitos do sangue periférico do grupo CARD ($r=0,893$). Outras correlações positivas e significativas ainda foram observadas nos monócitos do grupo CARD, tais como a expressão de MMP-9 com a expressão de IL-1 β ($r=0,630$), a expressão de MMP-2 com a expressão de IL-10 ($r=0,634$), a expressão de TGF- β com a IL-10 ($r=0,836$) e, por fim, entre TNF- α e IL-10 ($r=0,762$) (Figura 8).

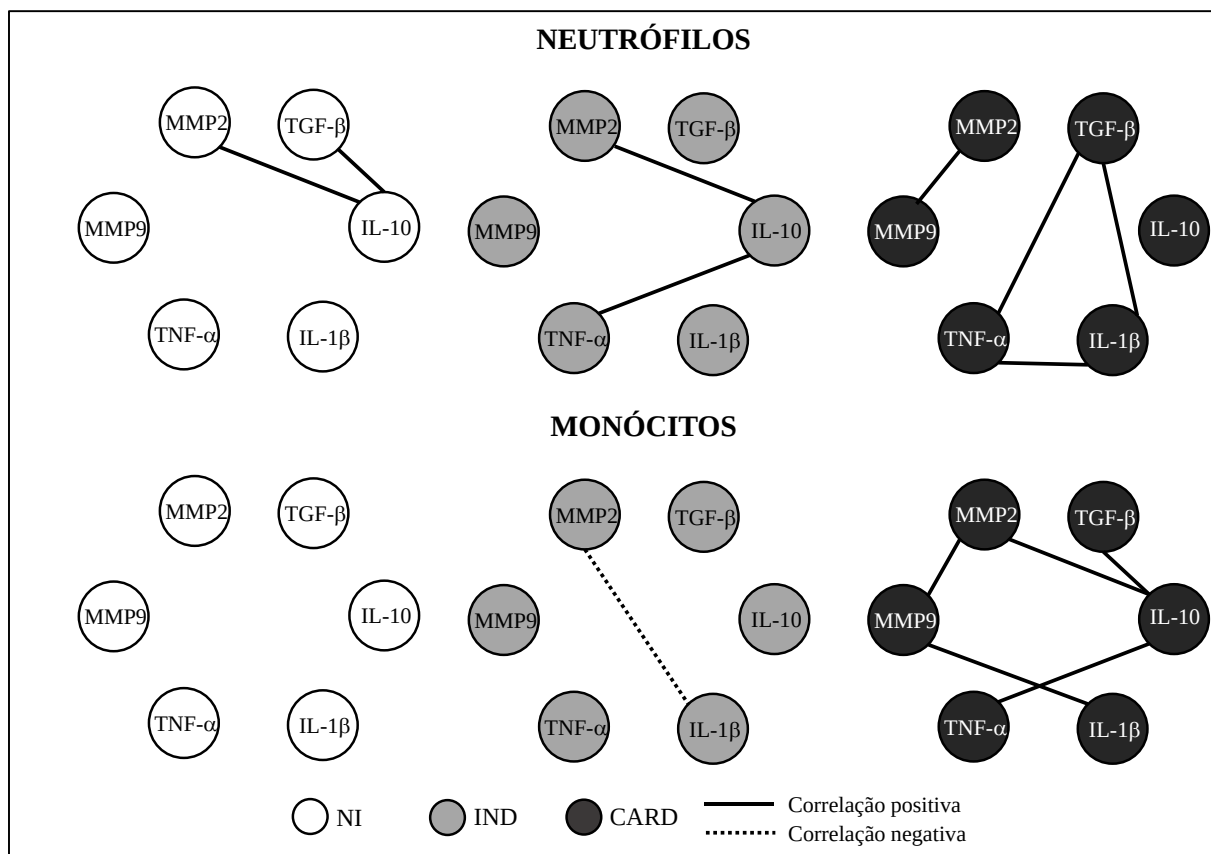


Figura 8. Redes de correlações entre a expressão da MMP-2, MMP-9 e das citocinas em neutrófilos e monócitos após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.

As análises foram realizadas em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI, n=6) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=8) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas após o estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. As linhas contínuas representam correlações positivas ($r > 0,63$) e as linhas tracejadas representam correlações negativas ($r > -0,63$). Todas correlações representadas apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

5.6 Avaliação do perfil de expressão das MMPs -2 e -9 e de citocinas inflamatórias/regulatórias por neutrófilos e monócitos após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*

A partir dos resultados encontrados, o perfil de expressão dos marcadores avaliados foi delineado longitudinalmente a fim de comparar os grupos NI, IND e CARD após o estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Essa abordagem permite visualizar o perfil dos pacientes individualmente e observar se há um comportamento semelhante entre os grupos na expressão da MMP-2, MMP-9, IL-1 β , TGF- β , TNF- α e IL-10.

Dessa forma, a figura 9 representa o perfil longitudinal de expressão de MMP-2, MMP-9, IL-1 β , TGF- β , TNF- α e IL-10 em neutrófilos dos grupos NI, IND e CARD após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Esse dado permite visualizar um comportamento semelhante dos neutrófilos do sangue periférico dos pacientes com doença de Chagas IND e CARD, onde há uma maior expressão de MMP-9 e TGF- β quando comparado ao grupo NI (Figura 9).

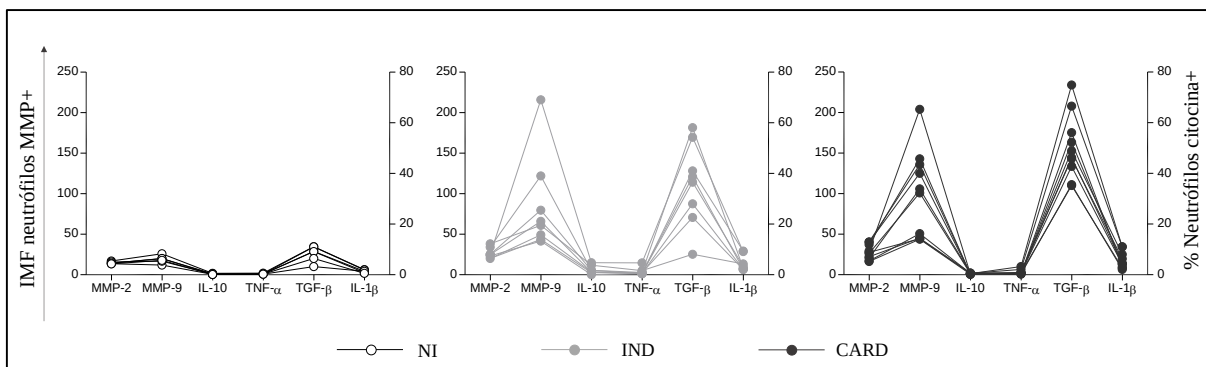


Figura 9. Perfil longitudinal da expressão de MMPs e citocinas em neutrófilos após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.

A expressão de MMP-2, MMP-9, IL-10, TNF- α , TGF- β e IL-1 β foi avaliada por citometria de fluxo conforme descrito em materiais e métodos em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI, n=6) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=8) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas após o estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Os resultados estão apresentados em intensidade média de fluorescência (IMF) para as MMPs (eixo Y esquerdo) e em percentual para as citocinas (eixo Y direito) em gráfico de linhas na população de neutrófilos.

Para os monócitos é possível observar que os pacientes infectados apresentam maior expressão de citocinas de uma forma geral. Entretanto, para a MMP-9 observamos que há um aumento em sua expressão no grupo CARD em relação ao grupo NI (Figura 10).

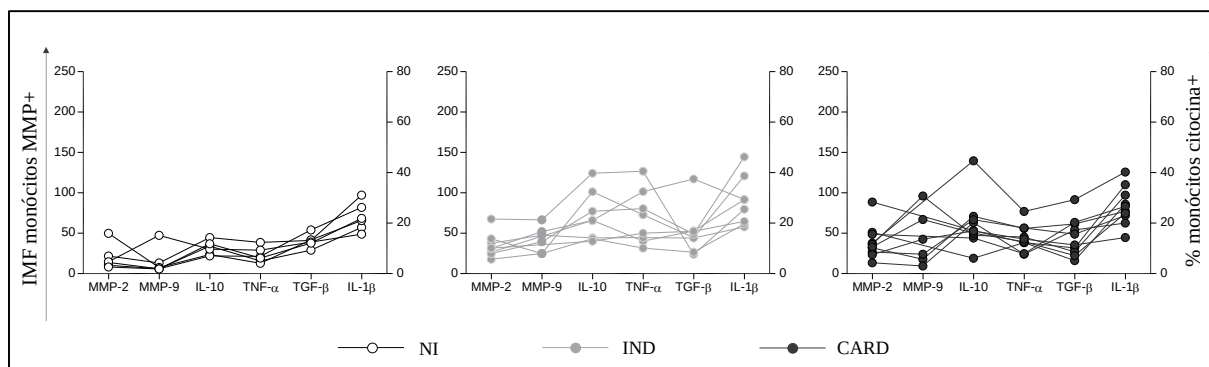


Figura 10. Perfil longitudinal da expressão de MMPs e citocinas em monócitos após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.

A expressão de MMP-2, MMP-9, IL-10, TNF- α , TGF- β e IL-1 β foi avaliada por citometria de fluxo conforme descrito em materiais e métodos em monócitos do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI, n=6) e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=8) e cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas após o estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Os resultados estão apresentados em intensidade média de fluorescência (IMF) para as MMPs (eixo Y esquerdo) e em percentual para as citocinas (eixo Y direito) em gráfico de linhas na população de monócitos.

Para delinear o perfil em “alto” ou “baixo” produtor para neutrófilos e monócitos na expressão de citocinas e MMPs utilizamos outra abordagem, conforme descrito no item 4.6 de Materiais e métodos. A figura 11 mostra a diferença entre os grupos avaliados, onde o grupo controle NI apresentou a maioria dos neutrófilos e monócitos (75%) “baixo” produtor para todas as moléculas avaliadas e um percentual de 8% dessas células como “alto” produtoras inflamatórias, regulatórias e misto (Figura 11A). Por outro lado, neutrófilos e monócitos dos pacientes com doença de Chagas apresentaram-se, em sua maioria absoluta, como “alto” produtores para moléculas inflamatórias (MMP-9, IL-1 β , TNF- α e TGF- β), sendo 81% para o grupo IND e 75% para o grupo CARD. Cerca de 13% dos neutrófilos e monócitos do grupo IND são “alto” produtores de moléculas regulatórias (Figura 11B) enquanto para o grupo CARD apenas 5% dessas células apresentam esse perfil (Figura 11C). Aproximadamente 6% dos neutrófilos e monócitos do sangue periférico de pacientes do grupo IND apresentaram um perfil “misto” (inflamatório/regulatório), enquanto 15% dos neutrófilos e monócitos do sangue periférico de pacientes do grupo CARD apresentaram essa condição (Figura 11B e 11C). Além disso, no grupo CARD, aproximadamente 5% dos neutrófilos e monócitos do sangue periférico dos pacientes são “baixo” produtores de citocinas e MMPs (Figura 11C).

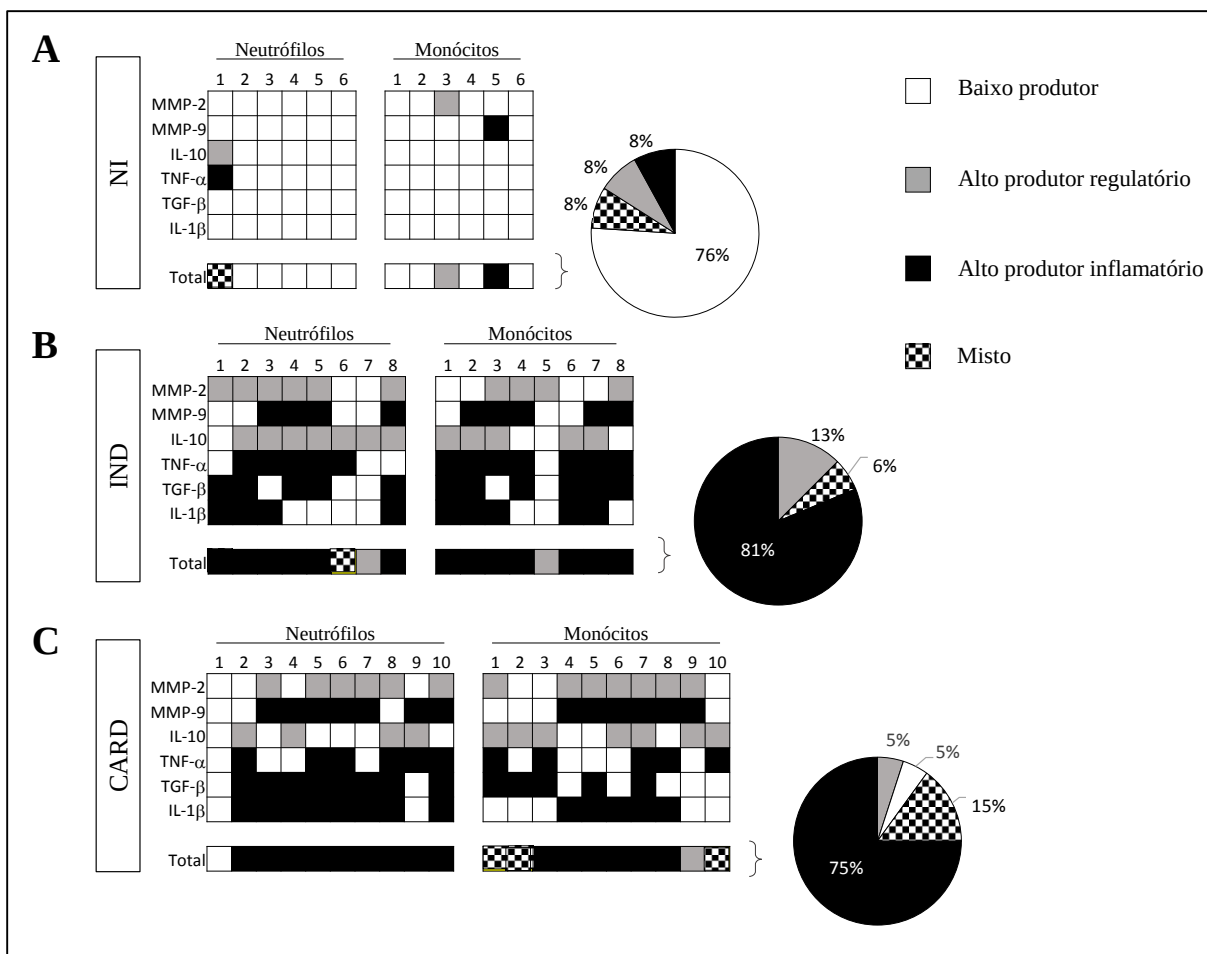


Figura 11. Perfil de expressão de moléculas inflamatórias/regulatórias por neutrófilos e monócitos após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.

Os diagramas representam o perfil de expressão de moléculas inflamatórias (MMP-9, TGF- β , TNF- α e IL-1 β) e regulatórias (MMP-2 e IL-10) em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de (A) indivíduos não infectados (NI, n=6) e de (B) pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND, n=8) e (C) cardíaca (CARD, n=10) da doença de Chagas após o estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Os gráficos de pizza representam o perfil geral de expressão de citocinas e MMPs, representando a frequência de baixo produtores, alto produtores inflamatórios, alto produtores regulatórios ou mistos dominante em neutrófilos e monócitos.

5.7 Avaliação da MMP-2 e MMP-9 e dos TIMP-1 e -2 em amostras de soro por Milliplex

As MMPs são enzimas solúveis, secretadas em sua forma inativa, sendo necessária uma ativação extracelular. Sendo assim, é possível determinar sua concentração sérica, bem como a concentração do seu inibidor TIMP, que além de localizar-se nos tecidos conforme sua própria denominação, também pode ser detectado na sua forma solúvel. Os resultados mostram que a MMP-2 está aumentada no soro dos pacientes do grupo CARD em relação aos grupos NI

e IND (Tabela 1). Da mesma forma, a concentração da MMP-9 está significativamente maior no grupo CARD em relação ao grupo controle NI (Tabela 1). A razão MMP-9/MMP-2 no soro não foi estatisticamente significativa (Tabela 1).

A partir da quantificação dos TIMP-1 e TIMP-2 séricos, não observamos diferenças significativas na concentração do TIMP-1 nos grupos avaliados (Tabela 1). Em contrapartida, o TIMP-2 apresenta maior concentração no soro dos pacientes CARD em relação aos grupos NI e IND (Tabela 1). O cálculo da razão TIMP-1/TIMP-2 nos permite inferir que o grupo NI apresenta quantidade significativamente maior deste inibidor em relação ao grupo CARD (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração sérica das MMPs e dos TIMPs.

	NI (n=20)	IND (n=23)	CARD (n=27)
MMP-2 (ng/mL)	62,48 ± 12,735	75,08 ± 15,17	81,85 ± 18,12
MMP-9 (ng/mL)	144,34 ± 96,02	174,12 ± 97,90	205,34 ± 165,88
TIMP-1 (ng/mL)	186,48 ± 29,93	181,36 ± 43,91	189,82 ± 31,21
TIMP-2 (ng/mL)	99,96 ± 16,40	100,42 ± 16,77	122,45 ± 27,06
MMP-9/MMP-2	2,19 ± 1,58	2,64 ± 1,80	2,60 ± 2,12
TIMP-1/TIMP-2	1,90 ± 0,36	1,82 ± 0,40	1,60 ± 0,31
MMP-9/TIMP-1	0,82 ± 0,64	0,98 ± 0,55	1,16 ± 1,03
MMP-2/TIMP-2	0,69 ± 0,12	0,73 ± 0,16	0,70 ± 0,21

*Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) representadas em negrito. **Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Os resultados obtidos para os níveis séricos das MMPs e dos TIMPs foram submetidos a análise de correlação a fim de avaliar a relação entre essas moléculas nos grupos estudados. Observamos uma correlação positiva entre a concentração do TIMP-2 e a MMP-9 no grupo NI ($r=0,698$) (Figura 12A). Ou seja, enquanto a concentração sérica da MMP-9 aumenta, aumenta também a do TIMP-2 no grupo NI. Para o grupo IND, observamos uma correlação negativa entre a concentração da MMP-2 e da MMP-9 ($r=-0,631$) no soro desses pacientes e uma correlação positiva significativa entre a concentração sérica do TIMP-1 e do TIMP-2 ($r=0,671$) no mesmo grupo (Figura 12B). Por outro lado, no grupo CARD, a concentração da MMP-2 e MMP-9 apresentou uma correlação negativa ($r=-0,666$ e $r=-0,642$) com a concentração do TIMP-1 no soro desses pacientes (Figura 12C).

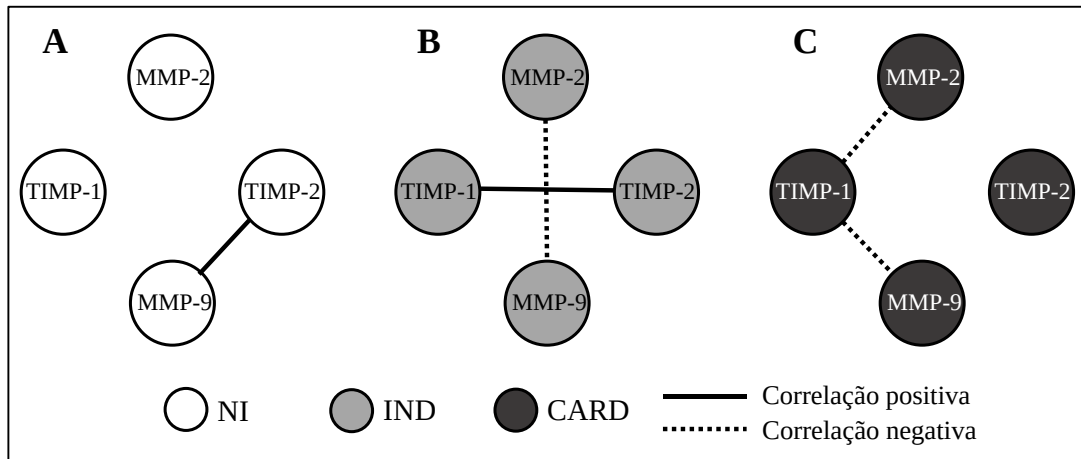


Figura 12. Redes de correlações entre concentrações séricas de MMPs e TIMPs.

As análises foram realizadas a partir das concentrações determinadas no soro de (A) indivíduos não infectados (NI, n=20) e de pacientes portadores das formas clínicas (B) indeterminada (IND, n=23) e (C) cardíaca (CARD, n=27) da doença de Chagas. As linhas contínuas representam correlações positivas ($r > 0,68$) e as linhas tracejadas representam correlações negativas ($r > -0,68$). Todas correlações representadas apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

A infecção pelo *T. cruzi* envolve inúmeros mecanismos imunológicos importantes que levam ao reconhecimento do micro-organismo e a elaboração de uma resposta imune inata e adaptativa eficaz, capaz de controlar a replicação do parasito. A ativação do sistema imune, aliada a fatores genéticos que envolvem o hospedeiro vertebrado e o protozoário, podem ser cruciais para as consequências clínicas durante a fase crônica da doença (Dutra *et al.*, 2009; Menezes *et al.* 2011). A heterogeneidade das manifestações clínicas na doença de Chagas crônica é, até hoje, um dos pontos a ser desvendados pela ciência. Ainda não há um mecanismo exato que esclareça por quê alguns pacientes desenvolvem alterações cardíacas e/ou digestivas tão graves, enquanto outros não apresentam sinais ou sintomas relacionados à infecção. A hipótese mais aceita é que pacientes assintomáticos são capazes de reduzir o número de parasitos em fase inicial de infecção e montam uma resposta imune modulada, que parece limitar a patologia. Em contrapartida, pacientes que irão desenvolver doença cardíaca, embora capazes de controlar a replicação do parasito, não constroem mecanismos imunorreguladores eficientes, favorecendo uma inflamação persistente e exacerbada (Gomes *et al.*, 2003; 2005; Dutra & Gollob, 2008).

A variabilidade das manifestações clínicas pode ser observada até mesmo nos pacientes que desenvolvem a cardiopatia chagásica, que são classificados em estágios de acordo com o grau de comprometimento do coração (Rocha *et al.*, 2007). Apesar dessa classificação permitir identificar pacientes com pior prognóstico, a morte súbita e eventos clínicos graves podem ocorrer em pacientes com o estágio inicial do acometimento cardíaco (Andrade *et al.*, 2011). Dessa forma, o principal desafio na fisiopatologia da doença de Chagas envolve fatores que precedem o dano cardíaco, a fim de conhecer um biomarcador imunológico para a evolução clínica durante a fase crônica, que pode ser um ponto de intervenção para impedir a progressão da doença em pacientes que ainda apresentam a forma clínica indeterminada ou estão no estágio inicial do acometimento cardíaco (Rocha *et al.*, 2007; Dutra *et al.*, 2009; Menezes *et al.*, 2011). Em busca deste biomarcador, alguns grupos de pesquisas apontaram as MMPs como enzimas importantes no remodelamento cardíaco (Li *et al.*, 2000; Vanhoutte *et al.*, 2006; Polyakova *et al.*, 2011) e pela primeira vez, nosso grupo observou a MMP-2 e MMP-9 na cardiopatia chagásica em humanos (Fares *et al.*, 2013).

Diante destas evidências, este estudo avaliou a expressão da MMP-2 e MMP-9 em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de pacientes portadores das formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas e de indivíduos não infectados antes e após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Os resultados mostram um aumento significativo na expressão da MMP-

2 e MMP-9 em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de pacientes com doença de Chagas em relação ao grupo controle NI, antes e após estímulo *in vitro* (Figuras 2 e 4). Nossos dados sugerem o envolvimento dos neutrófilos e monócitos na produção da MMP-2 e MMP-9 durante a fase crônica da doença de Chagas, especialmente nos pacientes que desenvolvem a cardiopatia dilatada. Outros tipos celulares são capazes de produzir MMPs, entretanto, a contribuição das células da imunidade inata durante a inflamação e na comunicação com a resposta adaptativa, além de muitas outras funções importantes, conferem aos neutrófilos e monócitos um papel de destaque durante o desenvolvimento das manifestações clínicas na doença de Chagas.

Em concordância com esses resultados, Fares e colaboradores (2013) observaram um aumento na expressão de MMP-2 e MMP-9 em linfócitos de pacientes com doença de Chagas. Os dados de Polyakova *et al.* (2011) mostraram que o aumento da expressão das MMP, especialmente das MMPs 2 e 9, estão associados à maturação do colágeno I e III em indivíduos com insuficiência cardíaca, indicando a importância dessas enzimas na configuração, ativação e deposição do colágeno no processo de fibrose. Na falência cardíaca, as MMPs desempenham uma função importante na degradação e deposição dos componentes da MEC, na substituição do colágeno e no processo inflamatório através da clivagem dos precursores inativos de citocinas e quimiocinas (Li *et al.*, 2000; Brower *et al.*, 2006).

Embora demonstramos que há aumento das MMPs nos pacientes com doença de Chagas após estímulo, nossos resultados também mostram a diminuição significativa da expressão da MMP-2 após o estímulo *in vitro*, em relação ao controle não estimulado, em neutrófilos e monócitos dos mesmos pacientes (Figuras 2A e 4A). Possivelmente, a expressão da MMP-2 pode estar sendo regulada pela presença do antígeno do *T. cruzi*, sugerindo que a MMP-9 pode ser mais importante para as alterações que acontecem na fase crônica da doença de Chagas. Então, é provável que exista uma regulação eficiente da MMP-2 que não é observada para a MMP-9, que é capaz de sobressair-se e contribuir para exacerbação da inflamação na ativação de citocinas e quimiocinas inflamatórias e também para o reparo tecidual através da deposição de proteínas da MEC. Esse resultado corrobora com nossos resultados anteriores, onde descrevemos um envolvimento diferente da MMP-2 e da MMP-9 na patogênese da doença de Chagas (Fares *et al.*, 2013). De forma complementar, observamos com o cálculo da razão MMP-9/MMP-2, uma maior expressão da MMP-9 em relação a MMP-2 nos neutrófilos e monócitos de pacientes com a doença de Chagas (Figuras 3 e 5). Os estudos

de Fares *et al.* (2013) na doença de Chagas e de Li *et al.* (2000) em outras cardiopatias também mostraram que a MMP-9 é constitutivamente produzida em quantidades superiores a MMP-2.

Alguns fatores imunológicos podem ser destacados durante a resposta imune à infecção pelo *T. cruzi*. Entre eles 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, quimiocinas e outros fatores solúveis essenciais para o controle da replicação do parasito e que podem determinar o destino da infecção crônica (Dutra & Gollob, 2008). Certamente as citocinas possuem uma função importante nos mecanismos relacionados à evolução da doença de Chagas e o equilíbrio entre a expressão de citocinas inflamatórias e regulatórias tem sido apontado como um dos fatores determinantes na morbidade da doença (Gomes *et al.*, 2003, 2005; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2013).

Nossos dados mostram um aumento significativo na expressão de TGF- β , IL-1 β e TNF- α em neutrófilos dos grupos IND e CARD antes e após o estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (Figura 6A, 6B e 6C). Por outra perspectiva, os monócitos não apresentaram alterações significativas na expressão de IL-1 β e TGF- β (Figuras 7A e 7B), porém, observamos um aumento significativo na expressão de TNF- α nos pacientes com doença de Chagas antes e após estímulo *in vitro* (Figura 7C). Os resultados encontrados por nós sugerem uma participação dos neutrófilos na expressão de citocinas inflamatórias como TGF- β , IL-1 β e TNF- α nos pacientes CARD, enquanto os monócitos parecem contribuir com a produção de TNF- α no mesmo grupo.

Adicionalmente, estudos recentes associam a IL-1 β a inflamação e a doenças cardiovasculares, tornando-a um possível alvo terapêutico (McCarty & Frishman, 2014). Liu *et al.* (2014) demonstraram que a interação da IL-1 β com receptores da angiotensina-1 contribui para progressão da insuficiência cardíaca em modelo murinho. De fato, Rutschow *et al.* (2006) demonstrou que a IL-1 β reduz a contratilidade das células cardíacas e contribui para a apoptose dos cardiomiócitos, com consequente hipertrofia. Aliado a isso, o TGF- β também representa um regulador central da fibrose cardíaca por ser um potente indutor de fibroblastos cardíacos, por favorecer a deposição de colágeno, além de ativador de MMPs (Li *et al.*, 2008; Behnes *et al.*, 2011). Araújo-Jorge *et al.* (2012) faz considerações importantes sobre TGF- β na cardiopatia chagásica e aponta o desenvolvimento de terapias que interfiram na sinalização desta molécula como adjuvantes no manejo das alterações cardíacas apresentadas pelos pacientes com doença de Chagas. O trabalho de Li *et al.* (2008) destaca o TGF- β como fator determinante para o

desenvolvimento de fibrilação atrial através da indução da fibrose e sugere, ainda, que essa citocina seja ponto de partida para o desenvolvimento de um mecanismo capaz de impedir as alterações cardíacas. O TNF- α também é outra molécula que desempenha função importante no contexto da inflamação e fibrose, especialmente por sua capacidade de ativar as vias de sinalização que conduzem à sobrevivência celular, proliferação, migração, diferenciação ou apoptose, e por participar na ativação de MMPs (Ślebioda & Kmiec, 2014). Ferreira *et al.* (2003) demonstraram que pacientes com a forma clínica CARD da doença de Chagas apresentam níveis plasmáticos elevados de TNF- α em relação aos grupos IND e NI, sugerindo que essa citocina pode estar envolvida nas alterações cardíacas observadas nesses pacientes. Associados aos achados da literatura, nossos dados mostram correlação positiva entre TGF- β com TNF- α e IL- β em neutrófilos e entre MMP-9 e IL- β em monócitos nos pacientes do grupo CARD (Figura 8). Este cenário sugere, mais uma vez, que os neutrófilos e monócitos dos pacientes com a forma clínica CARD podem estar envolvidas no processo inflamatório crônico e que a produção dessas citocinas pode induzir a deposição de colágeno na MEC, a ativação de MMPs e o remodelamento cardíaco.

Nossos resultados mostram ainda que neutrófilos e monócitos de pacientes do grupo IND expressam a citocina IL-10 em níveis maiores que as células dos grupos NI e CARD antes e após o estímulo *in vitro* (Figuras 6D e 7D). Já foi demonstrado que pacientes com a forma clínica CARD apresentam uma condição inflamatória exacerbada, com predomínio das citocinas IL-1 β , TGF- β e TNF- α e que essas moléculas estariam associadas com a diminuição da fração de ejeção e aumento do ventrículo esquerdo no coração desses pacientes (Araújo-Jorge *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2014). Outro ponto importante, que também foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa, é que pacientes com a forma clínica IND apresentam uma resposta imune regulada, com alta expressão de IL-10 e que essa citocina correlaciona-se positivamente com a melhor função do coração, observada por aumento na fração de ejeção e diâmetro normal do ventrículo esquerdo (Gomes *et al.* 2003, 2005; de Araújo *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2014).

A IL-10 atua como citocina imunossupressora, que regula respostas inflamatórias crônicas por mecanismos diversos. Além disso, a IL-10 também tem sido apontada como inibidora da fibrose em diversos modelos experimentais por um mecanismo ainda não conhecido (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 MEC. No contexto da doença cardíaca, 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).

Diante dessas evidências, nossos resultados apontam o envolvimento de monócitos e neutrófilos na regulação do processo inflamatório através da expressão de IL-10. Dessa forma, a produção de IL-10 elevada no grupo IND pode estar relacionada com a proteção/regulação observada nesses pacientes em relação ao grupo CARD. Podemos inferir ainda, que as MMPs parecem ser controladas nos pacientes IND através da produção de IL-10, uma vez que os pacientes deste grupo mostraram uma produção acentuada de MMPs em relação ao grupo NI, entretanto, não apresentam as alterações cardíacas durante a fase crônica da doença de Chagas. De forma oposta, neutrófilos e monócitos dos pacientes CARD possuem alta expressão de MMPs, porém, acompanhado de alta expressão de citocinas inflamatórias. As análises de correlação evidenciam esse comportamento, uma vez que observamos correlações positivas entre a MMP-2 e a IL-10 e negativa entre a MMP-2 e a IL-1 β no grupo IND. Portanto, esse perfil inflamatório regulado observado nos pacientes do grupo IND é o oposto no grupo CARD, onde a presença de um perfil inflamatório com a expressão de MMP-9, IL-1 β , TGF- β e TNF- α predomina em relação aos níveis de IL-10.

As MMPs são produzidas inicialmente em suas formas inativas, sendo necessária uma ativação posterior, que inclui a participação de moléculas coadjuvantes, como proteases, citocinas, fatores de crescimento, hormônios ou tratamentos químicos (Parks *et al.*, 2004; Calvet *et al.*, 2009; Geurts *et al.*, 2012). Especialmente as citocinas IL-1 β , TGF- β e TNF- α são apontadas como os potenciais indutores da transcrição das MMPs e podem estar envolvidas na ativação dessas proteases. Da mesma forma, a MMP-2 e a MMP-9 também estão envolvidas na ativação destas citocinas por vias alternativas (Ito *et al.*, 1996; Sarén *et al.*, 1996; Schönbeck *et al.*, 1998; Yu & Stamenkovic, 2000; Deschamps & Spinale, 2006; Lockwood *et al.*, 2008).

A partir desses indícios, investigamos as correlações entre a expressão das MMP-2 e MMP-9 com a expressão das citocinas IL-1 β , TGF- β , TNF- α e IL-10 em neutrófilos e monócitos dos grupos NI, IND e CARD. Nossos dados mostram uma correlação negativa da

expressão da MMP-2 com a expressão da IL-1 β em monócitos do grupo IND (Figura 8). De forma complementar, observamos correlações positivas entre a expressão da MMP-2 e a expressão da citocina reguladora IL-10 em neutrófilos dos indivíduos dos grupos NI e IND e em monócitos do grupo CARD após estímulo *in vitro* (Figura 8). Também observamos uma correlação positiva entre a expressão da MMP-9 com a expressão da IL-1 β em monócitos do grupo CARD (Figura 8). Os resultados encontrados sustentam a hipótese que as MMPs e as citocinas atuam sinergicamente, possivelmente promovendo a ativação mútua. A MMP-9 parece induzir mudanças na MEC, a inflamação e a fibrose nos pacientes CARD. Em contrapartida, as correlações encontradas para a MMP-2 apontam o envolvimento dessa endopeptidase na regulação do processo inflamatório, por correlacionar-se positivamente com a IL-10 e negativamente com a IL-1 β . Novamente, os dados encontrados direcionam os neutrófilos e monócitos para o envolvimento durante o remodelamento cardíaco na doença de Chagas. Esses resultados apoiam a hipótese de Fares e colaboradores (2013) que observaram um comportamento distinto entre as gelatinases na doença de Chagas, onde a MMP-2 parece ter um desempenho regulatório, devido a sua correlação positiva com citocinas anti-inflamatórias e negativa com citocinas inflamatórias. O grupo mostrou ainda que os níveis séricos de MMP-9 correlacionam-se positivamente com os níveis séricos das citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β , TGF- β e TNF- α , indicando comportamentos opostos entre a MMP-2 e MMP-9 (Fares *et al.*, 2013).

Considerando a importância dessas moléculas na doença de Chagas, novas estratégias vêm sendo empregadas para elaboração de um panorama de expressão de citocinas e MMPs. Utilizamos uma dessas estratégias, baseada no trabalho de Vitelli-Avelar *et al.* (2008), para avaliar o panorama das citocinas e MMPs nas populações alvo e descrever o perfil geral de citocinas dominantes associadas as formas IND e CARD da doença de Chagas. Nosso panorama demonstra que nos pacientes com doença de Chagas, independente da forma clínica, predomina um perfil “alto” produtor de citocinas inflamatórias em relação ao grupo NI, que apresentou um perfil “baixo” produtor dominante (Figura 11). Em contrapartida, os pacientes do grupo IND apresentam cerca de 13% de seus neutrófilos e monócitos comprometidos com a resposta regulatória, sendo “alto” produtores para moléculas de características moduladoras (IL-10 e MMP-2) (Figura 11B), enquanto apenas 5% dos neutrófilos e monócitos do grupo CARD apresenta essa característica (Figura 11C). Esses resultados sugerem que, mesmo com um perfil inflamatório desenvolvido, os pacientes IND conseguem controlar essa tendência

através de uma resposta regulatória superior. Ao contrário, no grupo CARD, a resposta inflamatória não consegue ser controlada por uma resposta imune regulatória eficiente. Portanto, os pacientes IND são capazes de montar uma resposta imune equilibrada entre inflamatório/regulatório, enquanto nos pacientes CARD a resposta regulatória parece comprometida em relação ao mecanismo inflamatório predominante. Dessa forma, neutrófilos e monócitos também estão envolvidos na imunorregulação nos pacientes IND e na inflamação nos pacientes CARD.

Vitelli-Avelar *et al.* (2008) demonstraram que pacientes IND apresentam quase 75% de seus leucócitos como “alto” produtores de moléculas regulatórias, ao passo que os pacientes CARD têm 80% de seus leucócitos “alto” produtores para moléculas inflamatórias. O estudo de Vitelli-Avelar *et al.* (2008) abrange os leucócitos de uma forma global, onde analisaram moléculas inflamatórias e regulatórias distintas, em neutrófilos, monócitos, células NK, linfócitos B e linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Nós, entretanto, avaliamos apenas o envolvimento de neutrófilos e monócitos nos grupos avaliados. O nosso panorama reflete a contribuição de neutrófilos e monócitos após estímulo *in vitro* e revela a participação dessas células na doença de Chagas. É possível que em uma nova avaliação geral dos leucócitos o panorama seja o mesmo encontrado por esses autores, porém, não caracteriza a contribuição específica da subpopulação alvo. Nossos resultados refletem não apenas a produção de citocinas por essas células, porque investigamos também a produção de MMPs. Além disso, avaliamos outras citocinas que não foram consideradas por Vitelli-Avelar *et al.* (2008), o que pode justificar o perfil distinto.

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). Considerando a importância dos TIMPs para o entendimento da participação das MMPs na cardiopatia chagásica e a limitação metodológica encontrada para sua detecção por citometria de fluxo, realizamos a quantificação sérica dos TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 e MMP-9 com o kit Milliplex®. Nossos resultados mostram que não há diferença no nível sérico do TIMP-1 entre os grupos estudados, enquanto os níveis séricos do TIMP-2 são maiores nos pacientes CARD (Tabela 1). Ainda não há uma especificidade definida para os TIMPs. Porém, alguns autores citam a preferência do TIMP-1 à MMP-9 e do TIMP-2 à MMP-2 (Brew & Nagase, 2010; Moore *et al.*, 2012). Esse resultado sugere a importância do TIMP-1 para a regulação da MMP-9 que está aumentada no grupo CARD. A inibição insuficiente dessa

enzima pode ser apontada como causa da resposta inflamatória exacerbada e do remodelamento da MEC cardíaca desencadeado pela MMP-9. É importante ressaltar, que o aumento do TIMP-2 no grupo CARD acompanha o aumento da MMP-2, sugerindo que a inibição dessa MMP pode ser eficiente.

Para entender a relação dos TIMPs com as MMPs, realizamos análises de correlação. Observamos uma correlação positiva entre a MMP-9 e TIMP-2 no grupo NI (Figura 12A), indicando que o TIMP-1 pode realmente ter maior afinidade para MMP-9. Nossos resultados mostram também uma correlação positiva entre os níveis séricos do TIMP-1 e TIMP-2 e uma correlação negativa entre os níveis séricos da MMP-2 e MMP-9 no grupo IND (Figura 12B), sugerindo que as MMP-2 pode ter um papel fundamental no grupo IND. Contudo, no grupo CARD observamos uma correlação negativa da MMP-2 e MMP-9 com o TIMP-1 (Figura 12C). Esse dado, acompanhado do resultado que mostra o TIMP-2 em concentrações elevadas no grupo CARD e que a razão TIMP-1/TIMP-2 é maior no grupo NI em relação ao mesmo grupo, sugere que o TIMP-1 parece ser essencial para a regulação da MMP-9. Fortalecendo essa hipótese, a concentração da MMP-2 e da MMP-9 está aumentada no grupo CARD, entretanto o TIMP-2, que também apresentou aumento no mesmo grupo, consegue regular a MMP-2, mas não a MMP-9.

Diversos estudos têm demonstrado o aumento nos níveis séricos dos TIMPs em pacientes com cardiopatia distintas (Thomas *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 2006). Thomas *et al.* (1998) descreveram um aumento significativo de TIMP-1 e TIMP-2 no miocárdio de pacientes com cardiopatia dilatada grave. Ahmed *et al.* (2006) observaram um aumento na concentração plasmática do TIMP-1 em pacientes com hipertrofia do ventrículo esquerdo e insuficiência cardíaca crônica. De forma complementar, observaram um aumento na concentração plasmática do TIMP-2 independente de alterações cardíacas. Embora o TIMP-2 esteja em concentrações elevadas no grupo CARD, a inibição das MMPs parece não ser suficiente, indicando que o TIMP-1 pode exercer um papel diferencial para o controle das MMPs na cardiopatia chagásica.

Estudos clínicos já 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). 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. 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*.

Em conjunto, nossos resultados sugerem uma possível associação da MMP-9 e das citocinas IL-1 β , TNF- α e TGF- β com o remodelamento cardíaco e com a inflamação e, consequentemente, sua participação na cardiomiopatia chagásica. Por outro lado, observamos que a MMP-2 pode estar relacionada com a regulação nos pacientes IND, observada pelo aumento de sua expressão em neutrófilos e monócitos nesse grupo, além da correlação positiva com IL-10 e negativa com IL-1 β . Já foi observado que a MMP-2 pode localizar-se no núcleo de células cardíacas, onde essa proteína teria papel protetor ao impedir a apoptose dessas células. Entretanto, ainda não foram identificadas funções protetoras para MMP-9 (Mannello & Medda, 2012). O estudo realizado por Itoh e colaboradores (2002) corrobora com nossos achados. Eles demonstraram que a MMP-2 está relacionada com a regulação da inflamação e da degradação da MEC em camundongos com artrite reumatoide. Por outro lado, comprovaram também que a MMP-9 contribui para o desenvolvimento da doença inflamatória nas articulações. Suportando nossa hipótese, Ahmed e colaboradores (2006) encontraram maiores concentrações plasmáticas da MMP-9, acompanhado de uma diminuição da concentração plasmática da MMP-2 em pacientes com hipertrofia do ventrículo esquerdo.

Dessa forma, é provável que as MMPs também contribuam de maneira diferente na cardiopatia chagásica e que os neutrófilos e monócitos atuem sinergicamente na expressão dessas endopeptidases e de citocinas envolvidas na fisiopatologia da doença de Chagas. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que linfócitos T CD8⁺ também são capazes de produzir MMPs durante a doença de Chagas (Fares *et al.*, 2013). O fato de neutrófilos e monócitos também contribuírem significativamente para a produção de MMPs, além da sua capacidade de apresentar antígenos para linfócitos T, tornam essas células importantes não apenas no processo inflamatório ou no controle da replicação do parasito. Neutrófilos e monócitos são células fundamentais na comunicação entre as células do sistema imune e podem estar envolvidos na doença Chagas, sobretudo, na regulação presente nos pacientes IND e na inflamação e remodelamento cardíaco encontrado nos pacientes CARD. Na busca pelo biomarcador imunológico capaz de anteceder o dano cardíaco intrínseco à doença de Chagas, as MMP-2 e MMP-9 abrem espaço para novos estudos. Considerando novamente um envolvimento distinto entre essas gelatinases na doença de Chagas e a atuação de neutrófilos e

monócitos na produção dessas enzimas e das citocinas aqui avaliadas, fica cada vez mais evidente que o sistema imune é extremamente organizado, eficiente e pleiotrópico.

7 CONCLUSÃO

Neutrófilos e monócitos contribuem ativamente na produção de citocinas e MMPs, podendo estar envolvidos no processo inflamatório e no remodelamento cardíaco observado em alguns pacientes durante a fase crônica da doença de Chagas. O perfil “alto” e “baixo” produtor de citocinas e MMPs representado nesse estudo reflete a importante contribuição dessas células para o processo inflamatório e/ou para sua regulação nos pacientes IND e CARD. Embora MMP-2 e MMP-9 estejam envolvidas no reparo tecidual e nos processos inflamatórios, o antagonismo apresentado por elas nesse e em outros estudos pode esclarecer e desencadear novas investigações sobre seu envolvimento na cardiopatia chagásica.

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409-9641 FAX: (31) 3409-9642

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Projetos de Pesquisa**TÍTULO:**

- Avaliação dos mecanismos imunorreguladores envolvidos no controle da miocardiopatia chagásica.
- Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas.
- Identificação de marcadores imunológicos associados com a disfunção cardíaca na doença de Chagas

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica, e antes de aceitar é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

Descrição da Pesquisa:

OBJETIVOS: O estudo tem como objetivo avaliar os mecanismos imunológicos presentes em pacientes chagásicos, auxiliando na compreensão do aparecimento das lesões e da evolução da doença e, consequentemente, no manejo clínico dos pacientes.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Será colhida pequena amostra de sangue (20ml) em tubos estéreis. Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença.

BENEFÍCIOS: Os participantes terão seu estado imunológico avaliado através do hemograma e de outros exames a serem realizados. Além disso, a participação nesse estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença de Chagas, podendo colaborar para a melhoria do tratamento desta doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo.

RISCOS EM POTENCIAL: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da retirada do sangue; no entanto, a coleta será realizada por profissional de enfermagem treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE): Todas as informações serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

CONFIDENCIALIDADE: Os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, o orientador da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do CPqRR-FIOCRUZ.

DESLIGAMENTO: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

EQUIPE RESPONSÁVEL:

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG)

Coordenadores adjuntos: Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (FIOCRUZ)
Profa. Dra Juliana de Assis Silva Gomes (UFMG)

Colaboradores: Dra Ana Thereza Chaves
Dra Fernanda Fortes
Dra Rafaelle Christine Gomes Fares
Dra Ester Roffe Santiago
Ms Giovane Rodrigo de Sousa
Nayara Ingrid de Medeiros

Se precisar de maiores informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com Professor Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil 31270-901 ou pelo telefone (0XX) 31- 3409 4592, OU NO Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone 31- 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

CONSENTIMENTO: Com base no exposto, estou ciente que a minha participação é voluntária e será restrita à doação de amostras de sangue. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em doença de Chagas do CTR-DIP.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

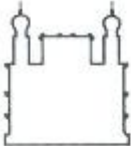
Ass. do paciente ou responsável: _____

Ass. da 1ª testemunha: _____

Ass. da 2ª testemunha: _____

Ass. do pesquisador: _____

Anexo B – Carta de aprovação do comitê de ética do CPqRR.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa René Rachou
Comitê de Ética



CARTA DE APROVAÇÃO Nº 01/2012 – CEP / CPqRR / FIOCRUZ / MS

Protocolo CEP - CPqRR nº: 15/2011

Projeto de Pesquisa: *Identificação de marcadores imunológicos associados com a disfunção cardíaca na doença de Chagas*.

Pesquisadora Responsável: Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Instituição Realizadora: Centro de Pesquisa René Rachou

Após submissão e análise criteriosa das pendências emitidas no parecer emitido em 27 de setembro de 2011, no Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 196/96 CNS, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR / FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições à ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela homologação das alterações no projeto de pesquisa proposto.

Situação: APROVADO.

Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios parciais e final.

Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Belo Horizonte, 19 de janeiro de 2012.

APROVADO

Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos
Centro de Pesquisas René Rachou - MS / FIOCRUZ

Flávia Galdino



João Carlos Pinto Dias
Coordenador do CEP/SH-CPqRR

Av. Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto - 30130-002, Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: 55 0xx31 3285 3565 (ramal 181) Fax: 55 0xx31 3285 3115 <http://www.cpqrr.fiocruz.br>

Anexo C – Carta de aprovação do comitê de ética da UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

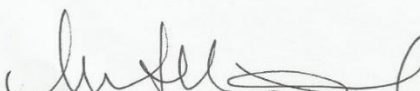
Projeto: CAAE – 0502.0.203.000-11

Interessado(a): Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de novembro de 2011, o projeto de pesquisa intitulado **"Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

9 REFERÊNCIAS

ADAIK-KIRK, T. L. & SENIOR, R. M. Fragments of Extracellular Matrix as Mediators of Inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.40, n.7, p.1101-1110, 2008.

AHMED, S. H.; CLARK, L. L.; PENNINGTON, W. R.; WEBB, C. S.; BONNEMA, D. D.; LEONARDI, A. H.; MCCLURE, C. D.; SPINALE, F. G.; ZILE, M. R. 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.

ANDRADE, JP; MARIN-NETO, JA; PAOLA, AA; VILAS-BOAS, F; OLIVEIRA, GM; BACAL, F; BOCCHI, EA; ALMEIDA, DR; FRAGATA-FILHO, AA; MOREIRA, MC; XAVIER, SS; OLIVEIRA JUNIOR, WA; DIAS, JC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Chagásica Arq Bras Cardiol.*;97(2 Suppl 3):1-48, 2011.

ANDREOLLO, NA. & MALAFAIA, O. Os 100 anos da doença de Chagas no Brasil. *ABCD, arq. bras. cir. dig.*, 2009, vol.22, n.4, pp. 185-191.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; WAGHABI, M. C.; BAILLY, S.; FEIGE, J. J. The TGF- β pathway as an emerging target for Chagas disease therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2012 Nov;92(5):613-21.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; WAGHABI, M. C.; SOEIRO, M. N.; KERAMIDAS, M.; BAILLY, S.; FEIGE, J. J. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardiopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2008; 19(5-6):405-13.

BARRETTO, M. P. Epidemiologia. In Brener, Z. & Andrade, Z.A. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p.89-151.

BEHNES, M; HOFFMANN, U; LANG, S; WEISS, C; AHMAD-NEJAD, P; NEUMAIER, M; BORGGREFE, M; BRUECKMANN, M. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) in atrial fibrillation and acute congestive heart failure. *Clin Res Cardiol.*, 2011; 100(4):335-42.

BITTENCOURT, A. L. Congenital Chagas disease. *Am. J. Dis. Child.*, Chicago, v.130, n.1, p.97-103, 1976.

BOGLIOLO, L. Anatomie causes of cardiac insufficiency in chronic chagasic cardiopathy (myocarditis) studied in comparison to anatomic causes of cardiac insufficiency in other cardiopathies. *Arq Bras Cardiol.* 1976; 29(5):419-24.

BONNEY, KM. & ENGMAN, DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med.* 2008; 8(6):510-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816 p.

BRENER, Z; ANDRADE, ZA; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 344-378, 1999.

BREW, K. & NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.*, 2010; 1803(1): 55–71.

BRINKMANN, V; REICHARD, U; GOOSMANN, C; FAULER, B; UHLEMANN, Y; WEISS, DS; WEINRAUCH, Y; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004; 5;303(5663):1532-5.

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*, v.30, n.4, p.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. *Am J Cardiol.* 2010; 15;105(4):429-34.

BUJAK, M; FRANGOIANNIS, NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2009; 57(3):165-76.

CALVET, CM; OLIVEIRA, FO JR; ARAÚJO-JORGE TC; PEREIRA, MC. Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *Int J Med Microbiol.*, 2009; 299(4):301-12.

CHAGAS, CARLOS. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1909: vol.1, n.2, pp. 159-218.

CHEN, L; WATANABE, T; WATANABE, H; SENDO, F. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. *Eur J Immunol.* 2001; 31(1):265-75.

COHN, JN.; 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.

COURA, J. R. & DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.104, n.1, p.31-40, 2009.

CUNHA-NETO, E. & CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:683230.

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.*, 2007; 1;12:2797-806.

DE PINHO, RT.; DA SILVA, WS.; DE CASTRO CÔRTEZ, LM.; DA SILVA VASCONCELOS SOUSA, P.; DE ARAUJO SOARES, RO.; ALVES, CR. Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Exp Parasitol.*, 2014;147:72-80.

DESCHAMPS, AM, & SPINALE FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res.* 2006; 69(3):666-76.

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

DIAS, JCP. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, 1989; v.22, n.3, p.157-156.

DUARTE, S.; BABER, J.; FUJII, T.; COITO, AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol.* 2015 Jan 16. pii: S0945-053X(15)00005-0.

DUTRA, WO & GOLLOB KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*, 2008; v. 21, n. 3, p. 287-92.

DUTRA, WO.; MENEZES, CA.; VILLANI, FN.; DA COSTA, GC.; DA SILVEIRA, AB.; REIS, DD.; GOLLOB, KJ. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 Suppl 1:208-18.

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.

FARES, RC; GOMES, JAS; GARZONI, LR; WAGHABI, MC; SARAIVA, RM; MEDEIROS, NI; OLIVEIRA-PRADO, R; SANGENIS, LH; CHAMBELA, MC; de ARAÚJO, FF; TEIXEIRA-CARVALHO, A; DAMÁSIO, MP; VALENTE, VA; FERREIRA, KS; SOUSA, GR; ROCHA, MO; CORREA-OLIVEIRA, R. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are differentially expressed in patients with indeterminate and cardiac clinical forms of Chagas disease. *Infect Immun.*, 2013; 81(10): 3600-8.

FERREIRA, RC.; IANNI, BM.; ABEL, LC.; BUCK, P.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98(3):407-11.

FERREIRA, ILM. & SILVA, TPT. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2006; v.39, n.5, p. 507-509.

FONTANA, V.; SILVA, PS.; GERLACH, RF.; TANUS-SANTOS, JE. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta*; 2012; 413(7-8):656-662.

GAFFNEY, J.; SOLOMONOV, I.; ZEHORAI, E.; SAGI, I. Multilevel Regulation of Matrix Metalloproteinases in Tissue Homeostasis Indicates Their Molecular Specificity *in vivo*. *Matrix Biol.* 2015; 23. pii: S0945-053X(15)00026-8.

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.* 2003; 57(2):426-33.

GEISSMANN, F.; MANZ, MG.; JUNG, S.; SIEWEKE, MH.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010; 5;327(5966):656-61.

GEURTS, N.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, PE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacol Ther.* 2012; 133(3):257-79.

GHAJAR, CM.; GEORGE, SC.; PUTNAM, AJ. Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.*, 2008; v.18, n.3, p.251-278.

GHARAGOZLIAN, S.; SVENNEVIG, K.; BANGSTAD, HJ.; WINBERG, JO.; KOLSET, SO. Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes. *BMC Clin. Pathol.*, 2009; v.9, n.1, p.1-5.

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.* 2005; 73(12):7960-6.

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.* 2003;71(3):1185-1193.

GOMES, JAS.; CAMPI-AZEVEDO, AC.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SILVEIRA-LEMOES, 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*, 2012; 217:1005–1016.

GOMES, JAS.; MOLICA, AM.; KEESEN, TS.; MORATO, MJ.; DE ARAUJO, FF.; FARES, RC.; FIUZA, JÁ.; CHAVES, AT.; PINHEIRO, V.; NUNES, MDOC.; CORREA-OLIVEIRA, R.; DA COSTA ROCHA, MO. Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. *Hum Immunol.*, 2014; 75(1):20-8

GROSS, J & LAPIERE, CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1962; 15;48:1014-22.

GULICK, T.; CHUNG, MK.; PIEPER, SJ.; LANGE, LG.; SCHREINER, GF. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:6753–6757.

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.*, 2008; 197:1468–1476.

HIGUCHI, MDEL.; GUTIERREZ, PS.; AIELLO, VD.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423(3):157-60.

HOTEZ, PJ.; MOLYNEUX, DH.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, SE.; SACHS, JD.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med.* 2007; 6;357(10):1018-27.

ITALIANI, P & BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol.* 2014; 17;5:514.

ITO, A.; MUKAIYAMA, A.; ITOH, Y.; NAGASE, H.; THOGERSEN, IB.; ENGHILD, JJ.; SASAGURI, Y.; MORI, Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.*, 1996; 21;271(25):14657-60.

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.* 2002; 1;169(5):2643-7.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, SL. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4(3):273-9.

KAYAMA, H. & TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.*, 2010; 12(7):511-7.

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*; 2007; 28(6):711-718.

KIRCHHOFF, LV. Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). *Advances in Parasitology*, 2011; v.75, n.1, p.1-18.

KUMAR, A.; THOTA, V.; DEE, L.; OLSON, J.; URETZ, E.; PARRILLO, JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for *in vitro* myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med.* 1996; 183:949–958.

KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zimography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 2010; 61;205-209.

KURIHARA, T; SHIMIZU-HIROTA, R; SHIMODA, M; ADACHI, T; SHIMIZU, H; WEISS, SJ; ITOH, H; HORI, S; AIKAWA, N; OKADA, Y. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 triggers acute aortic dissection. *Circulation*, 2012; 126(25):3070-80.

LAMBERT, E.; DASSÉ, E.; HAYE, B.; PETITFRÈRE, E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004; 49(3):187-98.

LI, X.; MA, C.; DONG, J.; LIU, X.; LONG, D.; TIAN, Y.; YU, R. The fibrosis and atrial fibrillation: is the transforming growth factor-beta 1 a candidate etiology of atrial fibrillation. *Med Hypotheses*. 2008; 70(2):317-9.

LI, YY.; McTIERNAN, CF.; FELDMAN, A. M. Interplay of matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovascular Research*, 2000, v.46, n.2, p.214-224.

LIU, Q.; WANG, T.; YU, H.; LIU, B.; JIA, R. Interaction between interleukin-1 beta and angiotensin II receptor 1 in hypothalamic paraventricular nucleus contributes to progression of heart failure. *J Interferon Cytokine Res*. 2014; 34(11):870-5.

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*. 2008; 78(6):1064-72.

LUNA-GOMES, T; FILARDY, AA; ROCHA, JD; DECOTE-RICARDO, D; LAROCQUE-DE-FREITAS, IF; MORROT, A; BOZZA, PT; CASTRO-FARIA-NETO, HC; DOS REIS, GA; NUNES, MP; FREIRE-DE-LIMA, CG. Neutrophils increase or reduce parasite burden in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages, depending on host strain: role of neutrophil elastase. *PLoS One*, 2014; 5;9(3):e90582.

MACEDO, VO. Forma indeterminada da doença de Chagas. *J. Bras. Med.*, 1980; v.38, p.34-40.

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*. 1994; 90(6):3098-102.

MAGALHÃES, LM.; VILLANI, FN.; NUNES, MDOC.; GOLLOB, KJ.; ROCHA, MO.; DUTRA, WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis*. 2013; 15;207(4):661-5.

MANNELLO, F & MEDDA, V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Progress in Hist and Cytoc*. 2012; 47:27-58.

MANTOVANI, A; CASSATELLA, MA; COSTANTINI, C; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.*, 2011; 11(8):519-31.

- MARIN-NETO, JÁ.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, BC.; SIMÕES, MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007; 6;115(9):1109-23.
- MATSUDA, NM.; MILLER, SM.; EVORA, PR. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2009; 64(12):1219-24.
- MATSUNAGA, T.; ABE, N.; KAMEDA, K.; HAGII, J.; FUJITA, N.; ONODERA, H.; KAMATA, T.; ISHIZAKA, H.; HANADA, H.; OSANAI, T.; OKUMURA, K. Circulating level of gelatinase activity predicts ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2005; 2;105(2):203-8.
- MAYADAS, TN.; CULLERE, X.; LOWELL, CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014; 9:181-218.
- MCCARTY S & FRISHMAN W. Interleukin 1 β : a proinflammatory target for preventing atherosclerotic heart disease. *Cardiol Rev*. 2014; 22(4):176-81.
- MENDES, OC.; 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.*, 2010; v.94, n.1, p.59-66.
- MENEGHELLI, UG. Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. *Braz J Med Biol Res*. 1985; 18(3):255-64.
- MENEZES, C.; COSTA, GC.; GOLLOB, KJ.; DUTRA, WO. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. *Drug Dev Res*. 2011; 72(6):471-479.
- MIN, BS.; KIM, NK.; JEONG, HC.; CHUNG, HC. High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver metastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. *Oncol Lett*. 2012; 4(1):123-130.
- MOCELIN, AO.; ISSA, VS.; BACAL, F.; GUIMARÃES, GV.; CUNHA, E.; BOCCHI, EA. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2005; 7(5):869-73.
- MOLINA, HA. & KIERSZENBAUM, F. Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes bystander cardiac cell damage. *Immunology*, 1989; 66(2):289-95.
- 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, Rio de Janeiro*, 2009; v.104, n.1, p.17-30.
- MOORE, L.; FAN, D.; BASU, R.; KANDALAM, V.; KASSIRI, Z. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2012; v.17, n.4-5, p.693-706, 2012.

MUNIZ-JUNQUEIRA, MI.; MOTA, LM.; AIRES, RB.; JUNQUEIRA JÚNIOR, LF. Differing phagocytic function of monocytes and neutrophils in Chagas' cardiopathy according to the presence or absence of congestive heart failure. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37(6):447-53.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardio Research*. 2006; 69:562-573.

NIKKOLA, J.; VIHINEN, P.; VUORISTO, MS.; KELLOKUMPU-LEHTINEN, P.; KÄHÄRI, VM.; PYRHÖNEN, S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*, 2005; v.11, n.14, p.5158-5166.

NÓBREGA, AA.; GARCIA, MH.; TATTO, E.; OBARA, MT.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, WN. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(4):653-5.

NUNES, MP; COLOSIMO, EA; REIS, RC; BARBOSA, MM; da SILVA, JL; BARBOSA, F; BOTONI, FA; RIBEIRO, AL; ROCHA, MO. Different prognostic impact of the tissue Doppler-derived E/e_o ratio on mortality in Chagas cardiomyopathy patients with heart failure. *J. Heart Lung Transplant.*, 2012; 31:634–641.

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

PAGE-MCCAW, A1.; EWALD, AJ.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; v.8, n.3, p.221-233.

PARKS, W. C.; WILSON, CL.; LOPEZ-BOADO, YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2004; v.4, n.8, p.617-29.

PILLAY, J.; KAMP, VM.; VAN HOFFEN, E.; VISSER, T.; TAK, T.; LAMMERS, JW.; ULFMAN, LH.; LEENEN, LP.; PICKKERS, P.; KOENDERMAN, L. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. 2012; 3;122(1):327-36.

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 collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int. J. Cardiol*. 2011; 18;151(1):18-33.

PUGA, I.; COLS, M.; BARRA, CM.; HE, B.; CASSIS, L.; GENTILE, M.; COMERMA, L.; CHORNY, A.; SHAN, M.; XU, W.; MAGRI, G.; KNOWLES, DM.; TAM, W.; CHIU, A.; BUSSEL, JB.; SERRANO, S.; LORENTE, JA.; BELLOSILLO, B.; LLORETA, J.; JUANPERE, N.; ALAMEDA, F.; BARÓ, T.; DE HEREDIA, CD.; TORÁN, N.; CATALÀ, A.; TORREBADELL, M.; FORTUNY, C.; CUSÍ, V.; CARRERAS, C.; DIAZ, GA.; BLANDER, JM.; FARBER, CM.; SILVESTRI, G.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; CALVILLO, M.; DUFOUR, C.; NOTARANGELO, LD.; LOUGARIS, V.; PLEBANI, A.; CASANOVA, JL.; GANAL, SC.; DIEFENBACH, A.; ARÓSTEGUI, JL.; JUAN, M.; YAGÜE, J.; MAHLAOU, N.; DONADIEU, J.; CHEN, K.; CERUTTI, A. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol.* 2011; 25;13(2):170-80.

REIS, DD.; JONES, EM.; TOSTES, SJr; LOPES, ER.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, DG.; MCCURLEY, TL. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 May;48(5):637-44.

REZENDE, JM. & MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In CASTRO, L. P. & COELHO, L. C. V. Gastroenterologia. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda. 2004, p.325-392.

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.* 2001; 23(2):93-101.

ROCHA, MO; TEIXEIRA, MM; RIBEIRO, AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2007; 5:727–743.

ROY, S.; SAMANTA, K.; CHAKRABORTI, T.; CHOWDHURY, A.; CHAKRABORTI, S. Role of TGF- β and TNF- α in IL-1 β mediated activation of proMMP-9 in pulmonary artery smooth muscle cells: Involvement of an aprotinin sensitive protease. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 1;513(1):61-9.

RUTSCHOW, S.; LI, J.; SCHULTHEISS, HP.; PAUSCHINGER, M. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res.* 2006; 15;69(3):646-56.

SARAIVA, RM.; WAGHABI, MC.; VILELA, MF.; MADEIRA, FS.; SPERANDIO DA SILVA, GM.; XAVIER, SS.; FEIGE, JJ.; HASSLOCHER-MORENO, AM.; ARAUJO-JORGE, TC. Predictive value of transforming growth factor- β 1 in Chagas disease: towards a biomarker surrogate of clinical outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 2013; 107(8):518-25.

SARÉN, P.; WELGUS, HG.; KOVANEN, PT. TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J. Immunol.*, 1996; 157:4159.

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.* 2009; 104 Suppl 1:246-51.

SCHMUNIS, GA.; YADON, ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010; 115(1-2):14-21.

SCHÖNBECK, U.; MACH, F.; LIBBY, P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol.* 1998; 1;161(7):3340-6.

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: Rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47:211-42..

SELA-PASSWELL, N.; ROSENBLUM, G.; SHOHAM, T.; SAGI, I. Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: can it pave the path for selective inhibition? *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803(1):29-38.

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; 305(4):341-52

SILVEIRA, AC. & DIAS, JCP. O controle da transmissão vetorial. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; v.44, n.2, pp.52-63.

ŚLEBIODA, TJ; KMIEĆ, Z. Tumour necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:325129.

SNOEK-VAN BEURDEN, PAM & VON DEN HOFF, JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, 2005; v.38, n.1, p.73-83.

SOUSA, GR.; GOMES, JAS.; FARES, RC.; DAMÁSIO, MP.; CHAVES, AT.; FERREIRA, KS.; NUNES, MC.; MEDEIROS, NI.; VALENTE, VA.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, MO. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PLoS One.* 2014; 6;9(3):e87082.

SOUZA, PE.; ROCHA, MO.; ROCHA-VIEIRA, E.; MENEZES, CA.; CHAVES, AC.; GOLLOB, KJ.; DUTRA, WO. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun.*, 2004; 72(9):5283-91.

SOUZA, PE.; ROCHA, MO.; MENEZES, CA.; COELHO, JS.; CHAVES, AC.; GOLLOB, KJ.; DUTRA, WO. *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.* 2007; 75(4):1886-94

SPINALE, FG.; COKER, ML.; BOND, BR.; ZELLNER, JL. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovascular Research.* *Cardiovasc Res.* 2000; 46(2):225-38.

SPINALE, FG. Matrix metalloproteinase: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ. Res.*, 2002; v.90, n.5, p.520-530.

SUNDSTRÖM, J.; EVANS, JC.; BENJAMIN, EJ.; LEVY, D.; LARSON, MG.; SAWYER, DB.; SIWIK, DA.; COLUCCI, WS.; SUTHERLAND, P.; WILSON, PW.; VASAN, RS. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004; Jun 15;109(23):2850-6.

TAFURI, WL. Patogênese. In: Cançado JR, Chuster M (ed.) *Cardiopatia Chagásica*. Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte, 1985, p. 1-9.

TANOWITZ, HB.; MACHADO, FS.; JELICKS, LA.; SHIRANI, J.; DE CARVALHO, AC.; SPRAY, DC.; FACTOR, SM.; KIRCHHOFF, LV.; WEISS, LM. Perspective on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2009; v.51, n.6, p.524-539.

TECCHIO, C.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. Front Immunol.* 2014; 21;5:508.

TEIXEIRA, MM.; GAZZINELLI, RT.; SILVA, JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends parasitol.* 2002; 18(6):262-265.

THOMAS, CV.; COKER, ML.; ZELLNER, JL.; HANDY, JR.; CRUMBLEY, AJ.; RD, SPINALE, FG. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1998; 5;97(17):1708-15.

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*. 1998; 28(6):1597–1606.

TILLACK, K.; BREIDEN, P.; MARTIN, R.; SOSPEDRA, M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol.*, 2012; 1;188(7):3150-9.

VAN TASSELL, BW.; RALEIGH, JM.; ABBATE, A. Targeting interleukin-1 in heart failure and inflammatory heart disease. *Curr Heart Fail Rep.* 2015; 12(1):33-41.

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*, 2006; v.69, n.3, p.604-613.

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*. 2009; 24;126(4):418-29.

VITELLI-AVELAR, DM.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; PINTO DIAS, JC.; GONTIJO, ED.; FARIA, AM.; ELÓI-SANTOS, SM.; MARTINS-FILHO, AO. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol*. 2008; 68(5):516-25.

WANG J & ARASE H. Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci*. 2014; 1319:66-81.

WHO – World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. March 2014. Available at: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Accessed: Jan: 01/2015.

WRIGHT, KM & FRIEDLAND JS. Regulation of monocyte chemokine and MMP-9 secretion by proinflammatory cytokines in tuberculous osteomyelitis. *J Leukoc Biol*. 2004; 75(6):1086-92.

WYNN, TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214(2):199-210.

XIONG, H.; PAMER, EG. Monocytes and infection: Modulator, messenger and effector. *Immunobiology*, 2015; 220(2):210-214.

YU, Q & STAMENKOVIC, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes* 2000; 14(2):163-76.