Isabela Cunha Navarro

**Perfil de expressão de microRNAs no miocárdio na
infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* em
camundongos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Alergia e Immunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto

São Paulo

2014

Isabela Cunha Navarro

**Perfil de expressão de microRNAs no miocárdio na
infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* em
camundongos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Alergia e Immunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

© reprodução autorizada pelo autor

Navarro, Isabela Cunha

Perfil de expressão de microRNAs no miocárdio na infecção aguda pelo
Trypanosoma cruzi em camundongos / Isabela Cunha Navarro. -- São Paulo,
2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Edecio Cunha-Neto.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.*Trypanosoma cruzi* 3.MicroRNAs
4.Parasitemia 5.Eletrocardiografia 6.Cardiomiopatia chagásica 7.Camundongos

USP/FM/DBD-265/14

DEDICATÓRIA

À minha linda família, hoje e sempre, por acreditar mais em mim do que eu mesma.

À Bahia, por ter me dado “régua e compasso”.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Edecio Cunha-Neto e à Dra. Ludmila Ferreira, pela orientação e oportunidade de executar este trabalho;

Ao Professor Jorge Kalil, por toda dedicação e apoio, mesmo nos raros momentos de convivência;

Ao Professor Esper Kallás, pelo estímulo constante e organização do nosso programa de pós-graduação;

À Dra. Joseli Lannes e à equipe do Laboratório de Biologia das Interações da FIOCRUZ-RJ, pela excelente recepção e cuidado e por toda ajuda com o experimento de infecção;

Ao Professor Thales de Brito e à MSc. Ana Maria Silva, do Instituto de Medicina Tropical, por toda a prestatividade e simpatia e pela imensa ajuda com as análises histológicas;

À Dra. Juliana Monte Real e ao Dr. Luiz Reis, do Instituto de Ensino e Pesquisa Sírio Libanês, pela confiança ao ceder sua infraestrutura para as análises de expressão gênica;

Ao Dr. Edilberto Postól e a Luiz Mundel, da Unidade de Experimentação Animal do Laboratório de Imunologia do InCor, pelo bom humor cotidiano e pela paciência e ajuda nos primeiros experimentos;

Ao Professor Helder Nakaya, pelo excelente auxílio nas análises estatísticas;

Ao Sr. Jair, Gisele e Sônia, pela seriedade com a qual executam seu trabalho sem perder a simpatia;

A Eleni Arruda, pelo auxílio durante o mestrado e pela organização da pós-graduação;

A Rai, Elaine e toda a equipe técnica do Laboratório de Imunologia do InCor, pelo carinho e cuidado com o nosso trabalho;

Aos amigos Monique, Pri Carmona, Taccy, Carol, Deia, Amanda, Maris, Nanda, Carlo, Rafael, Vinícius, Susan, Ana P., Aline, Nati e Vanessa, por toda a ajuda prestada e pelos sorrisos que tornaram meus obstáculos menores;

A todos os demais colegas do Laboratório de Imunologia do InCor e do LIM-60, pela convivência e pelos momentos de descontração;

Aos meus amigos soteropaulistanos Luiza, Hugo, Gabi, Carol, Diego, Rebeca e Jorge, por serem incríveis e por trazerem cor e leveza aos meus momentos mais difíceis;

A minha irmã Clarissa e meu cunhado Gabriel, pela ajuda imensurável e por sempre me receberem com tanto carinho, conforto e cuidado;

Aos meus pais, irmão e tias, pelo amor e apoio incondicionais, sem os quais nada disto teria sido possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro.

“Não deixes que nada impeça
a tua realização
Que em ti finda, em ti começa:
és tu a tua promessa,
és tu mesmo a solução.”

Daniel Lima, padre pernambucano

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas	16
1.1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> : Ciclo de vida e infecção	16
1.1.2. Epidemiologia	17
1.1.3. Controle e tratamento	17
1.1.4. Formas clínicas	18
1.2. Alterações moleculares na fase aguda da doença de Chagas	20
1.3. Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC)	21
1.4. Modelos experimentais da doença de Chagas	22
1.5. MicroRNAs	23
1.5.1. Aspectos gerais, biogênese e ação	23
1.5.2. Envolvimento de microRNAs em doenças cardíacas e parasitárias	26
2. HIPÓTESE	29
3. OBJETIVOS	31
4. METODOLOGIA	33
4.1. Animais	34
4.2. Parasitas	34
4.3. Infecção e determinação da parasitemia	34
4.4. Eletrocardiograma	35
4.5. Análises Histológicas	35
4.6. Extração de RNA e avaliação de integridade	36
4.7. Transcrição reversa	37
4.8. Detecção de microRNAs por TLDA	38
4.9. Análises estatísticas	38

4.10. Análises bioinformáticas	39
4.11. Delineamento experimental	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Infecção experimental	42
5.2. Análises histológicas	42
5.3. Avaliação eletrocardiográfica	44
5.4. Seleção das amostras e extração de RNA	45
5.5. Perfil de expressão de microRNAs por TLDA	47
5.6. Análises bioinformáticas	58
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÕES	71
8. ANEXOS	73
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Figura		Página
Tabela 1	MicroRNAs com expressão correlacionada a alterações na parasitemia	53
Tabela 2	MicroRNAs com expressão correlacionada a alterações no intervalo QTc	55
Tabela 3	MicroRNAs com expressão correlacionada a alterações na parasitemia e intervalo QTc simultaneamente	57
Figura 1	Evolução da infecção por <i>T. cruzi</i>	19
Figura 2	Biogênese e ação de microRNAs	26
Figura 3	Delineamento experimental	40
Figura 4	Parasitemia e sobrevivência dos animais	43
Figura 5	Análises histológicas do tecido cardíaco	44
Figura 6	Alterações eletrocardiográficas nos animais infectados	45

Figura 7	Critérios de seleção de amostras	46
Figura 8	Caracterização do perfil de microRNAs	48
Figura 9	MicroRNAs com expressão alterada durante todo o curso da infecção	50
Figura 10	Cinética de alteração da expressão de microRNAs, parasitemia e QTc ao longo do tempo	51
Figura 11	MicroRNAs com expressão correlacionada a alterações na parasitemia e QTc	52
Figura 12	Diagrama de Venn com moléculas nodais resultantes das análises de predição de alvos	58
Figura 13	Vias associadas aos alvos preditos para microRNAs diferencialmente expressos em diferentes <i>time points</i>	59
Figura 14	Via construída a partir dos microRNAs com expressão correlacionada a alterações na parasitemia e intervalo QTc	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANF	<i>Atrial natriuretic factor</i>
BNP	<i>Brain natriuretic factor</i>
CCC	Cardiomiopatia Chagásica Crônica
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK-4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CT-1	Cardiotrofina-1
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
dpi	Dias pós infecção
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ESR1	<i>Estrogen receptor 1</i>
ET-1	Endotelina-1
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HNRNPA2B1	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL-	Interleucina
INSR	<i>Insulin receptor</i>
IRAK1	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
Limma	<i>Linear Model for Microarray Data</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

miR-	MicroRNA
MMP-	Metaloproteinase
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
NRC31	<i>Glucocorticoid receptor</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
Pri-microRNA	<i>Primary microRNA</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RISC	<i>RNA-induced silence complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA _m	RNA mensageiro
RT	<i>Reverse transcription</i>
SP	<i>Specificity protein</i>
SRF	<i>Serum transcription factor</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TGF	<i>Transforming growth fator</i>
Th	<i>T Helper</i>
TLDA	<i>Taqman Low Density Array</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	<i>Tumour necrosis factor alpha</i>
TP	<i>Tumour protein</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
β -MHC	<i>Beta-Myosin heavy chain</i>

Navarro I C. Perfil de expressão de microRNAs no miocárdio na infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A doença de Chagas é uma doença crônica causada pela infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*). A sua principal consequência clínica é o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), que acomete 30% dos pacientes. Não foi determinado um indicador de evolução para a CCC ou permanência na forma indeterminada assintomática da doença de Chagas. Diversos trabalhos têm mostrado alterações no perfil de expressão gênica e proteômica ocorridas na fase aguda e crônica da doença de Chagas experimental e humana. Tais alterações advêm da regulação estabelecida em diversos estágios da expressão gênica e podem ser fatores relevantes no prognóstico da doença. Neste contexto, os microRNAs (miRs), podem exercer uma importante função reguladora. Sua ação se dá pela associação a um RNA mensageiro (RNAm) alvo, inibindo sua tradução ou degradando este transcrito. Assim, a hipótese deste trabalho é a de que a infecção aguda por *T. cruzi* modula a expressão de miRs no miocárdio de camundongos. Foi avaliado por qRT-PCR o perfil de expressão de miRs 15, 30 e 45 dias após a infecção. O perfil de expressão de miRs resultante foi suficiente para segregar os grupos de acordo com o tempo da infecção. O número de miRs diferencialmente expressos aumentou com a progressão da infecção. Além disso, seis miRs tiveram sua expressão correlacionada à piora na parasitemia e intervalo QTc dos animais: miR-142-3p, miR-142-5p, miR-145, miR-146b, miR-149 e miR-21. Análises de correlação realizadas com todos os miRs avaliados ressaltaram este mesmo grupo de miRs entre os mais significativamente correlacionados, além de outros 73 correlacionados com a parasitemia, 67 com o intervalo QTc e 16 com ambos os parâmetros simultaneamente. Nas análises *in silico*, TNF- α e ciclina-D1 foram moléculas nodais recorrentes nas redes criadas com alvos dos miRs diferencialmente expressos em todos os tempos avaliados. Na única rede criada com os miRs correlacionados às alterações na parasitemia e intervalo QTc, TNF- α , TGF- β , Rac1 e Src foram as moléculas nodais. Este trabalho apresenta de maneira inédita o envolvimento dos miRs durante a infecção aguda por *T. cruzi*, proporcionando novas perspectivas em relação a potenciais ferramentas terapêuticas e prognósticas.

Descritores: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; microRNAs; Parasitemia; Eletrocardiografia; Cardiomiopatia Chagásica; Camundongos.

Navarro I C. Expression profile of microRNAs in myocardium during acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice [Dissertation] São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Chagas disease is a chronic illness caused by infection with the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Its main clinical outcome is the development of chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), which affects 30% of the patients. The factors that define the progression to CCC or maintenance in the asymptomatic indeterminate form of the disease are still poorly understood. Several studies have presented changes occurred in the gene and proteomic expression profiles in both acute and chronic phases of experimental and human Chagas disease. Such changes result from regulation established at different stages of gene expression and may be relevant for the disease prognosis. In this context, microRNAs (miRs) may play an important regulatory function. miRs act by association to a target messenger RNA (mRNA), inhibiting translation or degrading the transcript. Thus, our hypothesis is that acute infection by *T. cruzi* modulates the expression of microRNAs in the myocardium of mice. The miR expression profile was evaluated by qRT-PCR 15, 30 or 45 days after the infection. This profile was sufficient to segregate the samples according to the time of infection. The number of differentially expressed miRs was higher as the infection progressed. Moreover, six miRs had their expression correlated with worsening of parasitaemia and QTc interval: miR-142-3p, miR-142-5p, miR-145, miR-146b, miR-149 and miR-21. Secondary unbiased correlation analyses showed this cluster of miRs among the most significant and other 73 miRs correlated with parasitaemia, 67 with QTc and 16 with both parameters simultaneously. *In silico* target prediction analyses showed TNF- α and cyclin-D1 as recurrent nodal molecules of the networks created with miRs targets from all time points. The network generated with miRs correlated to changes in parasitaemia and QTc interval showed TNF- α , TGF- β , Rac1 and Src as nodal molecules. This work points out for the first time the involvement of miRs in the acute infection by *T. cruzi*, providing new insights about potential diagnostic and prognostic tools.

Descriptors: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; microRNAs; Parasitemia; Electrocardiography; Chagas Cardiomyopathy; Mice.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas

1.1.1. *Trypanosoma cruzi*: ciclo de vida e infecção

A tripanossomíase americana, popularmente conhecida como doença de Chagas, é uma doença sistêmica e crônica causada por parasitas protozoários da espécie *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) (1).

O *T. cruzi* apresenta ciclo de vida complexo, com múltiplos estágios de desenvolvimento que ocorrem em hospedeiros invertebrados e mamíferos. A infecção do inseto triatomíneo (Hemiptera: Reduviidae) – seu vetor biológico - se dá através do repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. Dentro do organismo do inseto, as formas tripomastigotas sobrevivem e se transformam em epimastigotas com capacidade de reprodução por fissão binária. Estas migram pelo trato gastrointestinal do inseto, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicas, que são liberadas nas fezes durante o repasto sanguíneo. Ao acessar a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, as tripomastigotas infectam células, escapam do vacúolo parasitóforo e, em seu citoplasma, se transformam em amastigotas. As formas amastigotas são capazes de se dividir e, perante estímulos ainda desconhecidos, se transformam em tripomastigotas flageladas (2). A lise da célula, posteriormente, proporciona a propagação da infecção no organismo (1).

Durante a fase aguda da infecção, quaisquer células nucleadas são alvos potenciais da infecção por *T. cruzi*, embora cardiomiócitos, células musculares, endoteliais, adiposas e nervosas sejam preferencialmente parasitadas (3). Os mecanismos de invasão utilizados por este parasita envolvem uma série de receptores da célula hospedeira, como receptores do tipo *toll* (TLRs, do inglês, *toll-like receptors*), receptores de tirosina quinase, TGF, EGF e LDL (do inglês,

transforming growth factor; epidermal growth factor; low density lipoprotein respectivamente). A atividade destes receptores é necessária para o sucesso da ligação e internalização do parasita na célula, pois proporcionam aumento do influxo de cálcio e ativação da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (3, 4).

1.1.2. Epidemiologia

A doença de Chagas é considerada uma das principais doenças negligenciadas do mundo, atingindo principalmente parcelas economicamente desfavorecidas da população. Atualmente, estima-se que há 7 a 8 milhões de pessoas cronicamente infectadas, principalmente na América Latina, onde a doença é naturalmente endêmica (5). No Brasil, estima-se que 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas atualmente, com maior prevalência nas regiões Nordeste e Sudeste do país. (6)

O processo de migração urbana ocorrido na América Latina nas décadas de 70 e 80, no entanto, tem alterado o perfil epidemiológico da doença de Chagas, contribuindo para a urbanização e globalização dos casos. O número de casos diagnosticados tem aumentado em países não endêmicos na região das Américas, Europa, Austrália e Japão (7). Nestes locais, este aumento representa um risco de ocorrência de transmissão do parasita via transfusões, transplantes de órgãos ou infecção congênita. Em alguns bancos de sangue dos Estados Unidos as taxas de contaminação por *T. cruzi* podem variar de 3 a 53%, excedendo, em alguns casos, a prevalência de HIV e hepatites B e C (7).

1.1.3. Controle e tratamento

Pelo fato de não haver uma vacina disponível para prevenção da doença de Chagas, o controle da transmissão pelo vetor é a medida de controle preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O controle se dá através da eliminação do vetor por dedetização, melhora das condições de moradias, utilização de redes em camas e janelas, bem como práticas de higiene no preparo e manuseio de alimentos (8). Atualmente, a transmissão do *T. cruzi* pelo seu vetor biológico foi interrompida em diversas regiões endêmicas, embora tal situação varie bastante a depender do local (7).

O tratamento para a doença de Chagas envolve o uso de medicamentos anti-parasitários, bem como terapia adjuvante para controle dos sintomas cardíacos. No entanto, as drogas anti-parasitárias disponíveis atualmente (Benzonidazol e Nifurtimox) requerem um longo tratamento e acompanhamento, com alto risco de efeitos adversos graves. Além disso, tais drogas são contra-indicadas em casos de gravidez ou falência renal e hepática (8). O tratamento dos sintomas cardíacos segue o recomendado para outras cardiopatias, não havendo medicamentos ou procedimentos exclusivamente desenvolvidos para a cardiopatia chagásica (9).

1.1.4. Formas clínicas

Após período de incubação de 2 a 3 semanas, a fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por alta parasitemia no sangue e tecidos, bem como por intensa ativação do sistema imune (10). A sintomatologia na fase aguda é pouco característica e inclui febre, dores nos músculos e articulações e diarreia, sendo 95% dos casos assintomáticos. Em alguns casos, no local da infecção é possível notar a formação do chagoma na pele ou do sinal de Romaña na mucosa ocular (Figura 1). Nos pacientes sintomáticos, a mortalidade é baixa (5%) e geralmente causada por miocardite e meningocefalite (11).

A fase crônica é caracterizada pelo estabelecimento de uma resposta imune relativamente eficiente e, portanto, por parasitismo reduzido. No entanto, pode ser acompanhada por prognósticos diversos: 60-70% dos pacientes permanecem na forma indeterminada da doença – assintomática, porém com níveis detectáveis de anticorpos séricos contra *T. cruzi* -, ao passo que 30-40% desenvolvem a forma crônica cardíaca (cardiomiopatia chagásica crônica), digestiva ou cardiodigestiva (1, 12). Ainda não foram elucidados os fatores que determinam a manutenção na fase indeterminada ou evolução para a forma crônica da doença de Chagas. No entanto, estudos de seguimento em pacientes chagásicos ou modelos experimentais mostram que a intensidade dos sintomas clínicos (como miocardite, carga parasitária e outras alterações fisiopatológicas) que ocorrem durante as fases iniciais da infecção pode ser positivamente correlacionada com a gravidade da doença cardíaca observada na fase crônica (13, 14).

Figura 1. Evolução da infecção por *T. cruzi*. A fase aguda tem sintomatologia pouco característica, com exceção da formação do chagoma ou sinal de Romaña no local da infecção, tendo mortalidade de apenas 5%. 60 a 70% dos pacientes evoluem para a forma crônica indeterminada e assintomática, enquanto 30 a 40% dos pacientes desenvolvem a forma cardíaca ou digestiva da doença. Os fatores que determinam a evolução e estabelecimento da forma cardíaca ou digestiva ainda são desconhecidos. Fotografias retiradas de Rassi & Marin-Neto, 2010. Fonte: Elaborada pelo autor.

1.2. Alterações moleculares na fase aguda da doença de Chagas

A despeito da sua oligossintomatologia, a fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por diversas alterações moleculares no hospedeiro. Na cardiomiopatia chagásica, a hipertrofia tem sido geralmente considerada uma característica da fase crônica - consequência indireta da inflamação persistente e do dano miocárdico (15). Estudos demonstraram, no entanto, aumento do tamanho de cardiomiócitos *in vitro* e aumento da expressão de genes para as proteínas contráteis após 48 horas de infecção com o *T. cruzi* (16). Também foi vista expressão aumentada do peptídeo vasoativo endotelina-1 (ET-1) e do fator hipertrófico cardiotrofina-1 (CT-1) no coração de ratos, bem como redução na contratilidade de ambos os ventrículos em camundongos 10 a 15 dias após a infecção com *T. cruzi* (17, 18). Além disso, o fato de diversas citocinas com atividade hipertrófica, incluindo IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , serem rapidamente induzidas no coração de animais infectados com o *T. cruzi*, sugere que a hipertrofia de cardiomiócitos é, provavelmente, uma característica estabelecida ainda na fase aguda e que se mantém na fase crônica da doença (16, 19, 20).

Outros trabalhos já descreveram modificações precoces ocorridas na expressão gênica de camundongos (21) ou cardiomiócitos agudamente infectados pelo *T. cruzi* e sugerem que tais alterações são estimuladas pelo próprio parasita na fase aguda (22). Trabalhos realizados pelo nosso grupo relataram um perfil proteômico cardíaco diferenciado em hamsters infectados agudamente por *T. cruzi* e apresentando sintomas, em relação àqueles assintomáticos. Foi detectada expressão alterada de proteínas estruturais, contráteis e de resposta ao stress, além de alterações na produção de IL-10 e TNF- α , diretamente associadas ao maior parasitismo cardíaco (23). Análises de expressão gênica por *microarrays* indicaram expressão seis vezes aumentada do gene SLPI, um importante modulador da resposta inflamatória e do remodelamento cardíaco, em camundongos infectados por 30 dias (24). Ademais, foi demonstrado que a infecção aguda por *T. cruzi* induz

um aumento na expressão de metaloproteinases, diretamente associado à maior mortalidade neste contexto; a utilização de inibidores destas proteases foi capaz de amenizar a doença (25).

É possível que a presença de um mecanismo adequado de regulação - de preferência ainda na fase inicial da doença de Chagas - seja um fator crucial para a distinção dos indivíduos que controlam a infecção sem desenvolver dano tecidual importante, daqueles que evoluem para a fase crônica grave, com inflamação intensa, necrose e fibrose reativa (26). Tomando em conjunto estas evidências, nota-se a importância do estudo da regulação das modificações moleculares e fisiológicas ocorridas na fase aguda da doença de Chagas, com o intuito de melhor compreender a sua patogênese, ainda tão pouco esclarecida.

1.3. Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC)

A CCC é uma cardiomiopatia dilatada na qual a inflamação de baixa intensidade, porém incessante, leva a destruição tissular progressiva e fibrose extensa no coração (26). Manifesta-se por arritmias ventricular e atrial, falência cardíaca e tromboembolia e é responsável por 21.000 óbitos por ano, sendo a principal causa de falência cardíaca na América Latina (27).

Aparentemente, o desenvolvimento da CCC é um processo imunologicamente induzido, visto que em camundongos *nude* – deficientes na produção de linfócitos T - a infecção por *T. cruzi* leva a alto parasitismo tecidual sem, todavia, causar inflamação cardíaca (28). A especificidade desta resposta imune, no entanto, ainda não foi claramente estabelecida. Desde a descrição da doença de Chagas, em 1909, evidências já indicavam não haver uma correlação clara entre parasitemia e intensidade da miocardite (Vianna, 1911 *apud* (28)). A detecção de um antígeno de *T. cruzi* que induz a produção de anticorpos com reatividade cruzada contra a miosina cardíaca em pacientes chagásicos levou à elaboração

de uma hipótese indicando um possível papel de autoantígenos nesta patogenia (29). No entanto, a presença, mesmo que escassa, de DNA e componentes do parasita, bem como a detecção de células T CD8⁺ específicas para *T. cruzi* no tecido cardíaco (30), levam a crer que também há participação da resposta imune direcionada ao parasita (31). Em suma, a etiologia da CCC aparentemente tem caráter multifatorial, estando envolvidos processos como disautonomia cardíaca, distúrbios microcirculatórios, mecanismos imunopatológicos, bem como a inflamação dependente da presença parasitária (26).

Pacientes com CCC têm pior prognóstico quando comparados àqueles com outras cardiomiopatias dilatadas não relacionadas à infecção por *T. cruzi* (32, 33). Análises de expressão gênica por *microarray* e de PCR em Tempo Real sugerem que diferentes perfis são observados no tecido cardíaco de pacientes com CCC, quando comparados com portadores de outras cardiomiopatias dilatadas (19). Corroborando com estes achados, resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que há expressão aumentada de IL-18, bem como de quimiocinas e seus receptores em pacientes com CCC, comparados a pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática (34). Tais evidências indicam que vias biológicas distintas estão envolvidas nestas doenças. Provavelmente, determinadas peculiaridades da CCC advêm da interação entre parasito e hospedeiro.

1.4. Modelos experimentais da doença de Chagas

Em geral, em modelos murinos de infecção aguda por *T. cruzi*, um padrão de doença é observado: intensa miocardite, elevado parasitismo e curta sobrevida em linhagens suscetíveis ou miocardite leve com baixo parasitismo e sobrevida mais longa em camundongos resistentes. Nos diversos modelos utilizados para estudo da fase crônica, graus variados de sintomas cardíacos são observados. Por

exemplo, camundongos BALB/c infectados com a cepa Colombiana por até 18 meses apresentam infiltrado inflamatório e fibrose (35). Em camundongos C-129 infectados com a cepa Brasil é detectado remodelamento cardíaco e aumento das dimensões ventriculares (36), enquanto prolongamento do intervalo QT é detectado no eletrocardiograma de camundongos BALB/c infectados com as cepas Brasil ou Talahuén. Neste modelo, o prolongamento do intervalo QT foi diretamente correlacionado à intensidade da inflamação cardíaca (37).

Alguns autores já demonstraram que cães, coelhos e hamsters podem desenvolver cardiomiopatia dilatada após infecção crônica por *T. cruzi* (38-40). Entretanto, lesões cardíacas significativas semelhantes às lesões humanas observadas na CCC são pouco reprodutíveis, além de que estes animais são de difícil manipulação e os experimentos são mais longos e de alto custo.

No modelo utilizado no presente trabalho, 80% dos animais infectados sobrevivem à fase aguda e desenvolvem a infecção crônica – 90 dias após a infecção, com raros parasitas circulantes detectáveis. A partir dos 30 dias de infecção são observadas diversas alterações eletrocardiográficas, como bradicardia e prolongamento dos intervalos PR e QTc. No tecido cardíaco é possível detectar nesta fase um intenso infiltrado inflamatório, com presença predominante de células T CD8⁺. Aos 90 dias de infecção, 100% dos animais infectados apresentam cardiomegalia e anormalidades no eletrocardiograma, como atraso na condução do impulso elétrico, além de arritmia e bloqueios atrioventriculares de 1º e 2º graus. Além disso, pode-se detectar um pico no nível de CK-MB (do inglês, *creatine kinase MB*) 90 dias após a infecção, a qual se mantém elevada durante toda a fase crônica (41).

1.5. MicroRNAs

1.5.1. Aspectos gerais, biogênese e ação

Muitas evidências têm indicado que o número de transcritos não codificadores de proteínas em genomas eucariotos é maior, quanto maior for o nível de complexidade do organismo (42). Pondo em cheque o dogma central da Biologia Molecular - que propunha um fluxo unidirecional de expressão da informação genética -, tais achados sugerem uma nova maneira de se interpretar o funcionamento dos genomas. Aparentemente, há pelo menos dois níveis interrelacionados de informação genética sendo expressos em organismos complexos: aquele que é traduzido em componentes celulares e uma extensa rede de RNAs com função reguladora (42). Neste contexto, os microRNAs têm sido apontados como parte indispensável da regulação de diversos fenômenos biológicos, como o desenvolvimento, o advento evolutivo da complexidade morfológica em vertebrados, a homeostasia e muitas doenças, como câncer e doenças autoimunes (43-48).

Os microRNAs foram descritos primeiramente em *Caenorhabditis elegans* (49) e são moléculas com 22 a 24 nucleotídeos, capazes de regular a expressão de genes alvo, através do seu anelamento ao RNA mensageiro (RNAm). Estão regularmente agrupados em *clusters* e são transcritos no núcleo, a partir de sequências localizadas nas regiões intergênicas ou intragênicas do genoma. Podem estar contidos em íntrons ou éxons de transcritos codificadores e uma minoria pode ser encontrada em regiões não codificantes do genoma (*gene deserts*) ou nas extremidades 3'-UTR (do inglês, 3'-*Untranslated Region*) (50). A transcrição dos microRNAs é feita pela RNA polimerase II ou III, formando um longo transcrito denominado microRNA primário ou pri-microRNA (do inglês, *primary microRNA*) (51). O pri-microRNA formado é, então, processado pelo complexo constituído pela RNase III *Drosha* e seu co-fator, DGCR8 (do inglês, *DiGeorge Syndrome critical region gene 8*), que o cliva, formando o pre-microRNA. Este último, um microRNA de fita dupla em forma de grampo com cerca de 70 nucleotídeos, é exportado do núcleo para o citoplasma pelo complexo da Exportina-5. No citoplasma, o pre-microRNA é processado por outra RNase III, a *Dicer*, gerando um duplex microRNA: microRNA* (51-53). Em seguida, uma destas fitas (microRNA maduro)

associa-se à proteína Argonata, formando a estrutura principal do complexo multiproteico miRISC (do inglês, *miRNA-induced silence complex*) (54) (Figura 2). A repressão da tradução se dá pelo anelamento do microRNA à região *seed* do RNAm alvo, geralmente na sequência 3'-UTR. Os mecanismos envolvidos no silenciamento gênico mediado por microRNAs ainda são controversos. Atualmente, acredita-se que em mamíferos a degradação do RNAm após deadenilação é o principal meio de ação dos microRNAs. No entanto, o miRISC pode atuar em outros estágios do processo de tradução: inibição da elongação da tradução, degradação proteica concomitante à tradução e finalização prematura da tradução (55).

Em mamíferos, aproximadamente 30% dos genes estão sob possível regulação de um microRNA; tais associações entre microRNA e RNAm, uma vez adquiridas, tendem a ser conservadas evolutivamente (56), o que reforça sua importância biológica. Estudos funcionais indicam que estas moléculas estão envolvidas na maioria dos processos celulares e, portanto, alterações em sua expressão estão associadas à gênese de muitas doenças (54).

Figura 2: Biogênese e ação de microRNAs. O pri-microRNA é fruto da transcrição de um determinado gene e tem conformação estrutural de grampo. Após ser processado pelo complexo *Drosha/DGCR8*, o pre-microRNA é enviado ao citoplasma pela enzima exportina-5 e, em seguida, é processado pelo complexo *Dicer*, resultando numa molécula dupla-fita de RNA. Uma das fitas do microRNA maduro associa-se ao complexo multiproteico RISC e se liga ao RNAm alvo, reprimindo sua tradução ou degradando este transcrito. Fonte: Elaborada pelo autor.

1.5.2. Envolvimento de microRNAs em doenças cardíacas e infecciosas

Trabalhos recentes indicam que a expressão de microRNAs está fortemente relacionada ao desenvolvimento cardíaco normal, bem como a sua homeostase. Em artigo publicado em 2012, Jayawardena e colaboradores obtiveram sucesso numa tentativa de reprogramar fibroblastos cardíacos de maneira a transformá-los em cardiomiócitos, apenas utilizando transfecção de microRNAs. Estes mesmos microRNAs foram capazes de induzir tal transformação em miocárdio murino isquêmico *in vivo*, indicando que estas moléculas participam ativamente do desenvolvimento cardíaco (57). Em 2008, Chen e colaboradores demonstraram que a deleção tecido-específica do gene codificador da enzima *Dicer*, envolvida na

biogênese de microRNAs, em linhagens miocárdicas e vasculares de camundongos resulta no desenvolvimento acelerado de cardiomiopatia dilatada, falência cardíaca e letalidade pós-natal (58). Indicando a importância dos microRNAs em doenças cardiovasculares, Van Rooij e colaboradores observaram que a deleção do microRNA-208 (miR-208) protege camundongos da hipertrofia cardíaca e fibrose induzidas por bandagem da artéria aorta (59). Já a expressão aumentada por transgênese deste mesmo microRNA, levou ao desenvolvimento de hipertrofia em camundongos com 4 meses de idade (60). Os miRs-1 e 133 – que compartilham o mesmo transcrito primário - são também frequentemente associados a diferentes situações envolvendo hipertrofia cardíaca, tendo ambos sua expressão diminuída nestes casos (61, 62). Atualmente, há uma vasta gama de evidências associando outros acometimentos cardíacos à expressão diferencial de microRNAs (46).

Além disso, há um número crescente de evidências indicando a participação de microRNAs em infecções de etiologias diversas. Células epiteliais infectadas por *Cryptosporidium parvum* têm sua capacidade de adesão intercelular alterada e isto está associado à expressão reduzida do miR-221, que regula a tradução de ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) (63). Na infecção por diferentes cepas de *Plasmodium berghei*, foi visto que há uma expressão diferencial de microRNAs no cérebro de camundongos portadores de malária cerebral, em comparação àqueles portadores da forma não cerebral da doença; no coração destes animais – um órgão não afetado pela doença – não houve diferença no perfil de expressão (64). Já em modelo experimental de infecção por *Plasmodium chabaudi*, foi detectada uma reprogramação da expressão de microRNAs no fígado (65). Em trabalho publicado por LaMonte e colaboradores, foi visto que a resistência de portadores de anemia falciforme a malária está associada a uma expressão diferencial de microRNAs nos eritrócitos portadores dos alelos para esta doença. Observou-se que microRNAs destes eritrócitos são capazes de impedir a tradução de transcritos do parasita, regulando negativamente o seu crescimento (66). A relação contrária também já foi observada: microRNAs codificados pelo vírus Epstein-Barr são capazes de se associar à região 3'-UTR do transcrito para o inflamassoma NLRP3

(do inglês, *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) em macrófagos humanos. O microRNA viral pode ser ativamente secretado via exossomos por linfócitos B infectados, de maneira a atingir células não infectadas, reduzindo a produção de IL-1 β (67). Já na infecção por *Leishmania donovani*, a metaloproteinase parasitária gp63 é capaz de degradar a *Dicer 1* do hospedeiro, reduzindo a expressão do miR-122, com concomitante redução dos níveis séricos de colesterol – um fator de piora da infecção (68). Estes achados são fortes exemplos da interação patógeno-hospedeiro e de como os microRNAs estão envolvidos diretamente neste processo. É esperado que qualquer mudança no padrão de microRNAs do hospedeiro indique um mecanismo de defesa da célula ou uma estratégia de indução do parasita, a fim de garantir sua sobrevivência. Assim, o estudo destas possibilidades representa um novo panorama para a compreensão das infecções parasitárias.

2. HIPÓTESE

Hipótese

A infecção aguda pelo *T. cruzi* leva a uma expressão diferencial de microRNAs no miocárdio de camundongos.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar o perfil de expressão de microRNAs cardíacos durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* em camundongos.

Objetivos Específicos:

1. Caracterizar o perfil de expressão de microRNAs no tecido cardíaco de camundongos durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*;
2. Determinar grupos de microRNAs com padrão de expressão alterado relevante no contexto da infecção;
3. Eleger possíveis genes alvo para os principais microRNAs encontrados, a partir de análises preditivas *in silico*;
4. Estudar as possíveis consequências associadas à regulação destes genes alvo, a partir da predição de redes de moléculas associadas.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL, Rio de Janeiro, Brasil), foram mantidos com suprimento de dieta equilibrada para roedores e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIOCRUZ) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP), com ciência da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Projeto nº 390/13 – Anexo A).

4.2. Parasitas

Formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil) foram obtidas de sangue colhido do plexo orbital de camundongos previamente infectados, em solução anticoagulante de citrato de sódio a 3,8%.

4.3. Infecção e determinação da parasitemia

Os camundongos foram inoculados intraperitonealmente com PBS (do inglês, *Phosphate buffered saline*) ou 100 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. Após 15, 30 ou 45 dias de infecção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram seus corações coletados. As amostras de ventrículo foram fixadas em solução de *RNA/later*® (Ambion, Austin, TX, EUA) e mantidas a - 80°C até o momento da extração de RNA. A parasitemia dos animais foi determinada pelo método descrito por Brener no dia do sacrifício (69).

4.4. Eletrocardiograma

Na véspera da eutanásia, os animais foram tranquilizados com uma dose intraperitoneal de Diazepan (10mg/kg), imobilizados e os eletrodos foram cuidadosamente inseridos subcutaneamente em derivação DII. Os traçados foram gravados durante 2 minutos com um sistema digital (*Power Lab 2/20*) conectado a um bioamplificador a 2mV/seg (*PanLab Instruments*, Barcelona, Espanha). Os filtros foram padronizados entre 0,1 e 100 Hz e os traçados foram analisados com o software Scope v3.6.10 (*PanLab Instruments*, Holliston, MA, EUA). Foram mensurados os batimentos cardíacos (batimentos por minutos, bpm), a duração dos intervalos PR, QRS, QT e da onda P em milissegundos (ms). Os valores do intervalo QT corrigido (QTc) em unidade de tempo foram obtidos a partir da seguinte equação: $QT_0 = QTc \times RR_{100}^y$; onde RR_{100} é o intervalo RR normalizado ($RR_{100} = RR_0/100ms$) e o expoente y é determinado a partir da inclinação da reta da relação linear entre o valor logarítmico do QT e o valor de RR_{100} .

4.5. Análises Histológicas

Seções do coração foram analisadas quanto à presença de infiltrado inflamatório e ninhos de amastigotas. Para tanto, corações inteiros foram coletados e fixados em solução tamponada de formol 10%, imediatamente após o sacrifício dos animais. Foram, então, cortados longitudinalmente em seu maior eixo e os cortes resultantes foram desidratados, inclusos em parafina, cortados em micrótomo (3-4 μ m) e corados com hematoxilina e eosina. Para a detecção *in situ* de antígenos do parasita, os cortes foram desparafinizados e, após bloqueio da peroxidase endógena, incubados com anticorpos policlonais anti-*T. cruzi* e anticorpos secundários biotinilados anti-IgG associados ao complexo avidina-biotina-peroxidase, sendo o substrato cromogênico a diaminobenzidina. As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico *Olympus CX41* (*Olympus Optical*, EUA) e fotografadas com auxílio do *software Axio Vision 4.8* (*Carl Zeiss Vision*, Hallbergmoos, Alemanha).

4.6. Extração de RNA e avaliação de integridade

As amostras de ventrículo foram maceradas em tubos contendo esferas de cerâmica e 0,5mL de Tampão de Lise (*mirVana™ microRNA Isolation Kit*, Ambion, Austin, TX, EUA), agitados por três ciclos de 15 segundos (*Precellys® 24*; *Bertin Technologies*, Versailles, França). Foi extraído o RNA total do tecido, pois os controles endógenos das placas TLDA são RNAs nucleolares maiores que microRNAs que, portanto, seriam perdidos se fosse utilizado o protocolo para obtenção da fração enriquecida para microRNAs. O RNA total foi obtido utilizando-se o kit *mirVana™ microRNA Isolation Kit* (*Ambion*, Austin, TX, EUA), que se baseia na extração orgânica com solução de fenol:clorofórmio. A fase aquosa de cada alíquota foi recuperada, misturada a etanol 100% e o RNA total foi imobilizado em coluna de fibra de vidro; após três lavagens com tampões específicos fornecidos com o kit, o RNA foi eluído em 100 μ L de água livre de nucleases a 95°C (*Nuclease-free Water*, *Ambion*, Austin, TX, EUA). A quantificação de RNA foi feita em

espectrofotômetro (*Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*; *NanoDrop Technologies*, Delaware, EUA), com base na relação da absorbância A260nm:A280nm e da leitura a A320nm. O grau de pureza relativo à presença de contaminantes proteicos foi obtido pelo cálculo do quociente A260nm:A280nm, onde uma razão compreendida entre 1,8 e 2,0 é o indicador de qualidade. A integridade das amostras foi analisada no equipamento *2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*, Inc, EUA), em matriz de gel aplicado nos capilares do chip, contendo uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular. A ligação dos fluoróforos aos marcadores e ao RNA resulta em fluorescência que é quantificada, permitindo a separação do rRNA 18S e 28S e a atribuição de um score de integridade (RIN; do inglês, *RNA integrity number*), que varia de 1 a 10. Foram consideradas suficientemente íntegras as amostras com RIN igual ou maior que 7. As amostras foram aliquotadas e acondicionadas a -80°C até o momento do uso.

4.7. Transcrição Reversa (RT)

Para a reação de transcrição reversa, foram utilizados dois pools de *primers* (A e B) com sequências de bases complementares às dos microRNAs a serem estudados (*TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* e *Megaplex™ RT Primers*, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Num volume final 15µL, a reação foi feita com 1000ng de RNA total, *Megaplex™ RT Primers*, dNTPs, a enzima transcriptase reversa *MultiScribe™*, tampão do kit, MgCl₂, inibidor de RNases e água livre de nucleases. O tubo contendo a reação foi incubado no gelo por 5 minutos e, em seguida, colocado no termociclador (*Veriti® 96-Well Thermal Cycler*, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), com potência a 60%, sob as seguintes condições de corrida: 40 Ciclos (16°C por 2 min., 42°C por 1 min., 50°C por 1 seg.), seguidos de 85°C por 5 min. Após a reação, o cDNA foi mantido a -20°C até o uso.

4.8. Detecção de microRNAs por TLDA

Foram utilizadas placas de 384 poços com canais microfluídicos para ensaios de baixa densidade (*TaqMan® Low Density Array 384-well microfluidic cards; Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), nas quais cada poço contém uma sonda individual previamente imobilizada. Neste caso, o ensaio escolhido contém duas placas (A e B) contendo um total de 641 sondas específicas para microRNAs de roedores (*TaqMan® Array Rodent MicroRNA A+B Cards Set v3.0, Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), além de 3 controles internos. O cDNA foi diluído 75x em água e 450 µL do produto diluído foi acrescentado a 450 µL do reagente TaqMan 2x Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG) (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). 100 µL desta mistura foram utilizados em cada fileira do cartão. Os cartões foram centrifugados e selados e a reação de amplificação foi feita no equipamento *7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

Os dados foram analisados no software *SDS v2.3* e os valores de Ct foram calculados usando o software *RQ Manager v1.2.1 (Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), com a seguinte programação: *baseline* automático; *threshold*: 0,3.

4.9. Análises Estatísticas

O teste t de Wilcoxon foi utilizado para detectar significância estatística na avaliação do eletrocardiograma. Tais análises foram feitas com o software *GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software*, La Jolla, CA, EUA), sendo $p < 0,05$.

A expressão de microRNAs foi calculada pelo “Método do Ciclo do Limiar de Fluorescência” (*Threshold Cycle Method*) (70), através da expressão relativa, representada por $2^{-\Delta Ct}$, onde: $\Delta Ct = Ct$ do gene de interesse – Ct do gene endógeno (71). As análises estatísticas do perfil de expressão de microRNAs foram feitas com auxílio do *software Integromics Real-Time PCR StatMiner™* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se o método de normalização global, seguido do teste paramétrico Limma (do inglês, *Linear Model for Microarray Data*) e do FDR (do inglês, *False Discovery Rate*) Benjamini-Hochberg, sendo $p < 0,05$ (72, 73). O agrupamento hierárquico e a análise de PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*) foram feitas com base no desvio padrão, utilizando-se a correlação de Pearson e Z score.

As análises de correlação iniciais foram feitas entre os valores de Ct e parasitemia ou duração do intervalo QTc, utilizando-se o *software GraphPad Prism 5.04* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), sendo $p < 0,05$. Para as demais análises de correlação, foi utilizado o pacote estatístico R (*R Development Core Team*, Viena, Áustria – www.R-project.org), cruzando os valores de Ct de todos os microRNAs avaliados no ensaio, independentemente de significância estatística, com os valores de parasitemia e duração do intervalo QTc, sendo $p < 0,01$.

4.10. Análises Bioinformáticas

Foi utilizado o *software Ingenuity Pathway Analysis v8.0-2602* (IPA, Ingenuity® Systems, Redwood City, CA, EUA - www.ingenuity.com) para análises *in silico* do perfil de expressão de microRNAs encontrado.

Primeiramente, foi feita uma análise de predição de alvos, sendo selecionados apenas aqueles experimentalmente observados e/ou fortemente preditos nas seguintes bases de dados: *TarBase*, *TargetScan*, *Ingenuity Expert Findings* e *miRecords*. A partir da lista gerada com estes genes, foi feita uma *core analysis*

considerando relações diretas e indiretas, experimentalmente observadas e/ou fortemente preditas em humanos, ratos ou camundongos. Foram geradas redes com número máximo de 35 moléculas. Estas análises foram realizadas com as bases de dados disponíveis em julho de 2013.

As análises com os microRNAs correlacionados foram realizadas sem predição de alvos, ou seja, as redes foram formadas com os microRNAs e as moléculas foram selecionadas pelo próprio *software*, seguindo as mesmas premissas acima descritas. Estas análises foram realizadas com as bases de dados disponíveis em junho de 2014.

4.11. Delineamento Experimental

Figura 3. Delineamento experimental do trabalho. Camundongos C57BL/6 foram inoculados intraperitonealmente com PBS ou 100 tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Colombiana e sacrificados 15, 30 ou 45 dias após a infecção. Para determinação da eficiência da infecção, foram analisadas a carga parasitária, histologia do tecido cardíaco e traçado eletrocardiográfico. Dos ventrículos destes animais, foi extraído o RNA total. Após reação de transcrição reversa, as amostras foram analisadas por qRT-PCR em placas TLDA quanto ao perfil de expressão de microRNAs. A partir deste perfil, foram realizadas análises *in silico* de predição de genes alvo e formação de redes moleculares.

5. RESULTADOS

5.1. Infecção Experimental

As amostras foram coletadas 15, 30 e 45 dias após inóculo de 100 tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. A parasitemia periférica foi detectável na maioria dos animais 15 dias após a infecção e teve sua maior expressão após 30 dias. Como observado em trabalhos anteriores, aos 45 dias de infecção a parasitemia já começou a ser controlada pelo sistema imune do animal, tendo seu pico esperado neste modelo, em média, aos 42 dias (41). A mortalidade, como previsto, foi baixa, com apenas um óbito antes da finalização do experimento (Figura 4).

5.2. Análises Histológicas

Nas análises histológicas foi possível observar a presença de infiltrado inflamatório e ninhos de amastigotas no tecido cardíaco da maioria dos animais (Figura 5). O infiltrado foi mais intenso na região átrio ventricular (Figura 5A), podendo ser difuso ou focal nos ventrículos. Foi possível ainda notar a ocorrência de necrose de fibras cardíacas, caracterizada por núcleos picnóticos ou ausentes, além da intensa coloração por eosina – consequência da redução da acidez posterior à cariólise. Além disso, puderam-se observar regiões com intensa vacuolização e lise de miócitos (Figura 5B).

Figura 4. Parasitemia e sobrevivência dos animais. Os animais foram infectados com 100 tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana de *T. cruzi* e tiveram sua parasitemia avaliada pelo método de Brenner 15, 30 ou 45 dias após a infecção. Em A, cada ponto representa a média dos grupos, sendo as barras horizontais o erro padrão (n = 12 animais/grupo).

Figura 5. Análises histológicas do tecido cardíaco. Imagens representativas das características histológicas dos animais infectados, após coloração com hematoxilina e eosina (A e B) ou marcação com anticorpos anti-*T. cruzi* (C e D). As setas indicam a presença de infiltrado inflamatório atrioventricular (A; 45 dpi; 2,5x), vacuolização de miócitos, miocardite e necrose de fibra (B; 30 dpi; 40x) e ninhos de amastigotas com infiltrado inflamatório (C e D; 30 dpi, 10x e 20x). VD = ventrículo direito; VE = ventrículo esquerdo.

5.3. Avaliação Eletrocardiográfica

As análises eletrocardiográficas foram realizadas na véspera dos dias de eutanásia, a fim de reduzir a influência do stress, bem como da anestesia utilizada. Foi possível detectar alterações eletrocardiográficas a partir dos 30 dias de infecção, quando se pode notar um prolongamento da onda P e dos intervalos PRS e QTc, resultando em bradicardia nos animais infectados (Figura 6A). Neste momento da infecção já ocorrem bloqueios atrioventriculares de 1º (45% dos animais) e 2º (30%) graus e arritmia (50%), sendo que 72% dos animais são afetados por algum tipo de disfunção cardíaca. Ao contrário do que ocorreu com a parasitemia – que aos 45 dias já havia entrado em remissão -, os sintomas cardíacos permaneceram

Resultados

presentes neste momento da infecção, além de atingirem um número ainda maior de animais (90%): 60% dos animais apresentam arritmia e 50% apresentam bloqueio atrioventricular de 2º grau.

Figura 6. Alterações eletrocardiográficas nos animais infectados. Na véspera da eutanásia, os animais foram anestesiados com uma dose de diazepam (10mg/kg), os eletrodos foram inseridos por via subcutânea em derivação DII e o traçado foi analisado por 2 minutos. Em A são demonstrados os parâmetros eletrocardiográficos avaliados. Em B, imagens representativas da ocorrência de bloqueio atrioventricular de 2º grau (30 dpi) e arritmia (45 dpi). Média $\pm$ erro padrão (n = 12 animais/grupo). Teste t de Wilcoxon, p < 0,05

5.4. Seleção das amostras e extração de RNA

Foram selecionadas 4 amostras por grupo para a determinação do perfil de expressão de microRNAs. A seleção foi feita com base em critérios de

homogeneidade e representatividade, em relação à parasitemia e ao intervalo QTc. Para tanto, foi calculado o intervalo percentil 97,5% do intervalo QTc dos animais não infectados e consideraram-se afetados aqueles animais infectados que apresentavam intervalo QTc acima ou abaixo dos valores limite do intervalo. Aos 15 dias de infecção, apenas um dos animais se encaixava neste critério e, neste caso, a parasitemia positiva e representativa do grupo foi utilizada como critério de seleção (Figura 7). Para o grupo controle, foram selecionados aleatoriamente quatro animais não infectados em todos os tempos avaliados. Desta forma, foram selecionadas 16 amostras (Anexo B).

Figura 7. Critérios de seleção de amostras. Foi calculado o intervalo percentil 97,5% do intervalo QTc de animais não infectados. Foram considerados afetados aqueles animais com intervalo QTc acima do limite estabelecido. Como segundo critério, observou-se a parasitemia, homogeneidade e representatividade das amostras.

Para garantir que as amostras de RNA obtidas estavam puras e íntegras, foram combinadas análises das razões 260/280, 260/230 e do RIN. A razão 260/280 informa o grau de contaminação proteica e deve estar próxima de 2, enquanto a

razão 260/230 informa a presença de outros contaminantes, como fenol, carboidratos e EDTA, devendo estar entre 2 e 2,2. O RIN é a razão entre o RNA das subunidades ribossomais 28S, 18S e 5S e é considerado aceitável um valor acima de 7, para experimentos de qRT-PCR. De acordo com tais análises, foram obtidas amostras de RNA de boa qualidade, com valores médios de RIN = 8,4, razão 260/280 = 2,1 e razão 260/230 = 1,72 (Anexo C). Garantir a pureza e integridade das amostras antes de realizar um experimento de RT-qPCR para detecção microRNAs é primordial, visto que pouco se sabe acerca dos fatores que controlam a degradação destas moléculas (74).

5.5. Perfil de expressão de microRNAs

Analisando as reações de qRT-PCR, foi possível detectar amplificação em todas as placas corridas, sendo que as placas “A” apresentaram número maior de microRNAs amplificados em relação às placas “B”, como esperado, visto que as placas A avaliam microRNAs mais comumente expressos.

Partindo das análises estatísticas acima explicitadas, sendo $p < 0,05$, foram encontrados 19 microRNAs diferencialmente expressos aos 15 dpi, 66 aos 30 dpi e 103 aos 45 dpi. Destes, 17 foram expressos durante toda a infecção (Figura 8A).

O *software Real-Time StatMiner* foi utilizado para avaliar o agrupamento das amostras por similaridade da expressão de microRNAs. Para isso, foi feito um *heat map* de agrupamento hierárquico com base na correlação de Pearson. Pode-se observar na figura 8 que as amostras se agrupam no dendrograma de acordo com o tempo de infecção. O grupo controle encontra-se mais próximo do grupo infectado por 15 dias, enquanto o grupo infectado por 45 dias encontra-se em um clado a parte de todos os outros (Figura 8B). A análise de PCA confirmou o agrupamento observado das amostras em relação ao tempo de infecção. As amostras de camundongos controle ou infectados por 15 ou 30 dias se distribuem no eixo do

segundo componente (eixo Y), o qual apresenta menor variabilidade em relação ao primeiro componente (eixo X), onde se encontram distribuídas as amostras infectadas por 45 dias (Figura 8C).

É possível ainda notar alguns grupos de microRNAs que têm sua expressão invertida com o curso da infecção, estando pouco expressos nos animais controle e com expressão aumentada com o passar do tempo, e vice-versa.

Figura 8. Caracterização do perfil de expressão de microRNAs. (A) Diagrama de Venn com o número de microRNAs diferencialmente expressos em cada tempo avaliado. (B) Agrupamento hierárquico baseado na correlação de Pearson. Cada linha representa um miRNA e cada coluna uma amostra. A escala de cor mostrada ilustra o nível de expressão relativa (ΔCt) dos miRNAs em todas as amostras, onde vermelho e verde representam expressão acima ou abaixo da média após normalização global, respectivamente. (C) *Principal Component Analysis* baseado no desvio padrão, de acordo com a correlação de Pearson e Z score. Cada quadrado representa um animal e cada elipse representa um grupo experimental, conforme cores na legenda do agrupamento hierárquico (B).

Outro fato interessante a ser observado é o de que 90% dos microRNAs com expressão modificada aos 15 dpi se mantêm alterados durante todo o processo, indicando que estas alterações precoces são, de fato, relevantes e se mantêm no contexto biológico da infecção. Para melhor avaliar este grupo de moléculas, foram selecionados apenas os microRNAs que se mantiveram alterados durante toda a infecção (Figura 9). Dentro deste grupo, pôde-se observar que 52% dos microRNAs seguem uma mesma cinética: têm sua expressão alterada aos 15 dpi, este efeito é maximizado aos 30 dpi e, aos 45 dpi, tendem a retornar à sua expressão inicial (15 dpi) (Figura 10). Esta mesma dinâmica também foi observada para a parasitemia e QTc do grupo de animais avaliados neste experimento, de maneira que foi avaliada a possibilidade de existência de correlação entre tais parâmetros e a expressão destes microRNAs. Utilizando a correlação de Pearson, com $p < 0,05$, foram encontrados 6 microRNAs com expressão significativamente correlacionada a alterações no QTc e na parasitemia: miR-146b, miR-21, miR-142-3p, miR-142-5p positivamente correlacionados e miR-149 e miR-145 negativamente correlacionados (Figura 11).

A fim de evitar que tais achados fossem consequência do viés da observação da cinética de expressão, análises secundárias de correlação foram realizadas. Desta vez, foram cruzados os dados de expressão de todos os microRNAs avaliados, independente da cinética de expressão ou significância estatística, com os valores de parasitemia e intervalo QTc. Foi possível notar que o cluster de microRNAs previamente detectado está presente entre os microRNAs mais fortemente correlacionados na segunda análise, confirmando a relevância deste achado. Além desses 6 microRNAs, outros 73 se mostraram correlacionados com a parasitemia (Tabela 1), 67 com o intervalo QTc (Tabela 2) e 16 com ambos os parâmetros simultaneamente (Tabela 3), sendo $p < 0,01$.

Figura 9. MicroRNAs com expressão alterada durante todo o curso da infecção. Cada ponto representa a média do grupo (n = 4 animais/grupo), sendo a linha pontilhada a expressão do grupo controle (não infectados), normalizada para 1.

Resultados

Figura 10. Cinética de alteração da expressão de microRNAs, parasitemia e QTc ao longo do tempo. Cada ponto representa a média dos grupos ($n = 4$ animais/grupo). Em A, a linha pontilhada representa a expressão do grupo controle, normalizada para 1.

Figura 11. MicroRNAs com expressão correlacionada a alterações na parasitemia e QTc. Cada ponto representa um animal, sendo os pontos azuis a correlação com o intervalo QTc e os vermelhos com a parasitemia. A linha representa a regressão linear, com correlação de Pearson, sendo $p < 0,05$.

Resultados

Tabela 1. MicroRNAs com expressão correlacionada a alterações na parasitemia

MicroRNA	R	p-valor
mmu-miR-142-5p	0.95	$1.88.10^{-8}$
mmu-miR-146a	0.944	$3.84.10^{-8}$
mmu-miR-142-3p	0.934	$1.21.10^{-7}$
mmu-miR-21	0.931	$1.71.10^{-7}$
mmu-miR-155	0.918	$5.35.10^{-7}$
rno-miR-146b	0.903	$1.63.10^{-6}$
rno-miR-20b	0.895	$2.76.10^{-6}$
mmu-miR-146b	0.894	$3.13.10^{-6}$
mmu-miR-222	0.884	$5.46.10^{-6}$
mmu-miR-21	0.884	$5.63.10^{-6}$
mmu-miR-30e	-0.881	$6.70.10^{-6}$
mmu-miR-145	-0.878	$7.79.10^{-6}$
mmu-miR-130b	0.874	$9.85.10^{-6}$
mmu-miR-203	0.871	$1.14.10^{-5}$
mmu-miR-503	-0.87	$1.20.10^{-5}$
mmu-miR-204	-0.867	$1.37.10^{-5}$
mmu-miR-126-3p	-0.863	$1.66.10^{-5}$
hsa-miR-15b	0.861	$1.85.10^{-5}$
mmu-miR-322	-0.86	$1.89.10^{-5}$
mmu-miR-690	0.86	$1.92.10^{-5}$
mmu-miR-342-3p	0.857	$2.26.10^{-5}$
mmu-miR-126-5p	-0.853	$2.73.10^{-5}$
mmu-miR-139-5p	-0.847	$3.44.10^{-5}$
mmu-miR-26a	-0.844	$4.02.10^{-5}$
mmu-miR-192	-0.842	$4.31.10^{-5}$
mmu-miR-195	-0.841	$4.49.10^{-5}$
mmu-miR-26b	-0.839	$4.80.10^{-5}$
hsa-miR-875-5p	0.827	$7.71.10^{-5}$
hsa-miR-149	-0.826	$8.10.10^{-5}$
mmu-miR-143	-0.815	0.00012
rno-miR-1	-0.815	0.00012
hsa-miR-30a-3p	-0.814	0.000123
mmu-miR-210	0.81	0.000142
mmu-miR-182	0.805	0.00017
mmu-miR-1971	0.803	0.000178
mmu-miR-15b	0.798	0.000213
mmu-miR-499	-0.794	0.00024

Resultados

mmu-miR-328	-0.788	0.000288
mmu-miR-320	-0.784	0.000323
mmu-miR-20b	0.77	0.000479
mmu-miR-345-5p	-0.768	0.000511
mmu-miR-30b	-0.765	0.000549
mmu-miR-30b	0.761	0.000619
hsa-miR-30e-3p	-0.757	0.000686
mmu-miR-805	-0.745	0.000925
mmu-miR-1839-5p	0.735	0.00119
mmu-miR-133b	-0.734	0.00121
mmu-miR-652	0.732	0.00127
mmu-miR-409-3p	0.718	0.00175
mmu-miR-130b	0.714	0.0019
mmu-miR-342-5p	0.712	0.00196
mmu-miR-208	-0.711	0.00204
rno-miR-664	-0.71	0.00206
mmu-miR-135a	-0.71	0.00207
mmu-miR-449a	0.703	0.00239
mmu-miR-185	-0.697	0.00271
mmu-miR-187	-0.694	0.00285
mmu-miR-362-3p	0.693	0.00293
mmu-miR-1	-0.692	0.00298
mmu-miR-218	-0.68	0.00374
mmu-miR-30a	-0.68	0.00378
mmu-miR-335-3p	-0.677	0.00399
mmu-miR-137	-0.669	0.0046
mmu-miR-467b	0.668	0.00465
hsa-miR-744	-0.665	0.00495
mmu-miR-494	0.665	0.00498
mmu-miR-133a	-0.66	0.0054
hsa-miR-27a	0.657	0.00568
mmu-miR-322	-0.653	0.00607
mmu-miR-494	-0.646	0.00682
mmu-miR-331-3p	-0.641	0.0075
mmu-miR-152	-0.64	0.00763
mmu-miR-125b-5p	-0.636	0.00814
mmu-miR-24	-0.634	0.00842
mmu-miR-2138	0.631	0.0087
mmu-miR-101a	-0.629	0.00901
mmu-miR-685	0.626	0.00955

A análise de correlação de Pearson foi realizada com o valor de Ct de todos os microRNAs avaliados cruzados com valores de parasitemia e intervalo QTc, utilizando o pacote estatístico R, sendo $p < 0,01$. Em cinza estão destacados os microRNAs significativamente correlacionados na análise anterior.

Resultados

Tabela 2. MicroRNAs com expressão correlacionada a alterações no intervalo QTc

MicroRNA	R	p-valor
hsa-miR-149	-0.926	2.76.10⁻⁷
mmu-miR-320	-0.873	1.01.10 ⁻⁵
hsa-miR-30a-3p	-0.871	1.11.10 ⁻⁵
mmu-miR-21	0.868	1.32.10⁻⁵
mmu-miR-142-5p	0.855	2.47.10⁻⁵
hsa-miR-30e-3p	-0.85	3.00.10 ⁻⁵
mmu-miR-139-5p	-0.849	3.19.10 ⁻⁵
mmu-miR-503	-0.849	3.20.10 ⁻⁵
mmu-miR-142-3p	0.84	4.71.10⁻⁵
mmu-miR-126-3p	-0.82	0.000101
mmu-miR-322	-0.818	0.000109
mmu-miR-30b	0.807	0.000156
mmu-miR-335-5p	-0.807	0.000158
mmu-miR-146b	0.803	0.000181
mmu-miR-30b	-0.802	0.000189
mmu-miR-30c	-0.8	0.000199
rno-miR-146b	0.797	0.00022
mmu-miR-147	0.794	0.000237
mmu-miR-187	-0.79	0.000272
mmu-miR-155	0.784	0.000328
mmu-miR-204	-0.782	0.000345
mmu-miR-145	-0.781	0.000354
mmu-miR-15b	0.772	0.000457
rno-miR-345-3p	-0.77	0.000482
mmu-miR-652	0.768	0.000506
mmu-miR-345-5p	-0.766	0.000536
mmu-miR-192	-0.759	0.000648
mmu-miR-200a	0.753	0.000765
mmu-miR-34b-3p	0.752	0.000775
mmu-miR-30e	-0.752	0.000783
mmu-miR-186	-0.751	0.000797
mmu-miR-328	-0.738	0.00111
mmu-miR-133a	-0.736	0.00116
mmu-miR-342-3p	0.733	0.00125
mmu-miR-342-5p	0.731	0.00129
mmu-miR-222	0.727	0.00141
mmu-miR-9	-0.725	0.00148

Resultados

mmu-miR-805	-0.722	0.0016
hsa-miR-378	-0.721	0.00163
mmu-miR-146a	0.719	0.00168
mmu-miR-210	0.712	0.00198
mmu-miR-130b	0.712	0.00199
mmu-miR-195	-0.698	0.00266
mmu-miR-499	-0.692	0.00297
rno-miR-1	-0.688	0.00321
mmu-miR-143	-0.684	0.00346
mmu-miR-494	0.679	0.00382
hsa-miR-143	-0.672	0.00437
mmu-miR-34c	0.671	0.0044
mmu-miR-331-3p	-0.671	0.00443
rno-miR-7	-0.67	0.0045
hsa-miR-15b	0.668	0.00472
mmu-miR-26b	-0.667	0.00475
mmu-miR-337	0.665	0.00498
mmu-miR-2146	-0.662	0.00521
rno-miR-664	-0.661	0.00527
mmu-miR-322	-0.659	0.00546
mmu-miR-466	0.654	0.00603
mmu-miR-133b	-0.65	0.00643
mmu-miR-130a	0.649	0.00656
rno-miR-204	-0.645	0.00699
mmu-miR-215	0.644	0.00713
mmu-miR-376a	0.643	0.00726
hsa-miR-213	-0.638	0.00784
mmu-miR-7b	0.634	0.00841
mmu-miR-1971	0.631	0.00881
mmu-miR-2138	0.631	0.00881
mmu-miR-362-3p	0.628	0.00919
rno-miR-20b	0.625	0.00966
mmu-miR-467a	0.625	0.00968
mmu-miR-690	0.624	0.00972
hsa-miR-27a	0.624	0.00979

A análise de correlação de Pearson foi realizada com o valor de Ct de todos os microRNAs avaliados cruzados com valores de parasitemia e intervalo QTc, utilizando o pacote estatístico R, sendo $p < 0,01$. Em cinza estão destacados os microRNAs significativamente correlacionados na análise anterior.

Resultados

Tabela 3. MicroRNAs com expressão correlacionada a alterações na parasitemia e intervalo QTc simultaneamente

MicroRNA	R	p-valor
mmu-miR-376a	0.874	0.000201
mmu-miR-146b	0.872	0.000216
mmu-miR-696	-0.845	0.000547
mmu-miR-29a	0.839	0.000649
hsa-miR-149	-0.819	0.00111
mmu-miR-21	0.814	0.00128
mmu-miR-342	0.779	0.00281
mmu-miR-34b	0.777	0.00296
mmu-miR-542	-0.777	0.00297
mmu-miR-15b	0.776	0.00298
mmu-miR-142-3p	0.773	0.00321
mmu-miR-142-5p	0.767	0.00358
mmu-miR-224	0.765	0.00375
mmu-miR-222	0.751	0.00489
mmu-let-7c	0.747	0.00523
mmu-miR-187	-0.747	0.00526
mmu-miR-1954	0.728	0.00727
mmu-miR-30c	-0.724	0.0078
mmu-miR-2146	-0.722	0.00805
mmu-miR-335-5p	-0.714	0.00911
mmu-miR-2138	0.712	0.00943
mmu-miR-145	-0.707	0.0101

A análise de correlação de Pearson foi realizada com o valor de Ct de todos os microRNAs avaliados cruzados com valores de parasitemia e intervalo QTc, utilizando o pacote estatístico R, sendo $p < 0,01$. Em cinza estão destacados os microRNAs significativamente correlacionados na análise anterior.

5.6. Análises de bioinformática

O software *Ingenuity Pathway Analysis* permite examinar interações entre microRNAs e RNAm alvos preditos por ferramentas bioinformáticas e/ou demonstrados experimentalmente, sendo possível selecionar o nível de confiança da predição, o contexto biológico, o tipo de célula ou tecido e a doença a qual o microRNA está possivelmente associado.

Primeiramente, foi feita uma análise de predição de alvos associados aos microRNAs diferencialmente expressos em cada ponto da infecção. Foram selecionados apenas alvos testados experimentalmente e/ou com predição altamente confiável. Ao analisar as principais redes formadas com os alvos preditos, foi possível notar que TNF- α (do inglês, *tumour necrosis fator alpha*) e ciclina-D1/CDK-4 (do inglês, *cyclin-dependent kinase 4*) foram moléculas nodais recorrentes em todos os tempos analisados (Figuras 12 e 13).

Figura 12. Diagrama de Venn com moléculas nodais resultantes das análises de predição de alvos. Foram preditas vias de associação entre as moléculas alvo dos microRNAs diferencialmente expressos em cada tempo. CCND1 = *cyclin D1*; ESR1 = *estrogen receptor 1*; HNRNPA2B1 = *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1*; INSR = *insulin receptor*; IFN = *interferon gamma*; NRC31 = *glucocorticoid receptor*; SP1/SP3 = *specificity protein 1/3*; TNF = *tumour necrosis factor alpha*; TP53 = *tumour protein p53*

Figura 14. Via construída a partir dos microRNAs com expressão correlacionada a alterações na parasitemia e intervalo QTc. Os microRNAs estão coloridos de acordo com sua expressão (vermelho: aumentada; verde: diminuída). Figura produzida no software IPA (www.ingenuity.com).

6. DISCUSSÃO

O estudo da fase aguda humana da doença de Chagas é fortemente limitado pela escassez de amostras, visto que, devido a sua branda sintomatologia, a maior parte dos casos não chega a conhecimento clínico (75). Por este motivo, grande parte do conhecimento acumulado na área até o momento advém de modelos experimentais (76). Neste trabalho, para o estudo da fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*, foi utilizado um modelo já bem estabelecido, onde se utiliza baixo inóculo de parasitas (100 tripomastigotas) em uma linhagem resistente à infecção (C57BL/6) (41). Em linhas gerais, foi possível detectar intenso infiltrado inflamatório no miocárdio, parasitemia considerável, presença de alterações eletrocardiográficas, porém com baixa taxa de mortalidade - características similares à fase aguda sintomática humana (77).

O infiltrado de células mononucleares observado nas amostras (Figura 5) é uma característica marcante da fase aguda da doença de Chagas, sendo formado principalmente de macrófagos e linfócitos T ativados. Estas células são essenciais no controle do parasitismo tecidual, no entanto podem levar células cardíacas e neurônios a lise (11). A intensidade da inflamação presente no tecido cardíaco é um importante fator a ser avaliado durante a infecção por *T. cruzi*, visto que na cardiomiopatia chagásica crônica, a inflamação de baixa intensidade, porém incessante, leva a destruição tissular progressiva e fibrose extensa no coração – culminando em arritmias, tromboembolia e falência cardíaca (26). Além disso, estudos em modelos animais já demonstraram que as alterações eletrocardiográficas vistas na fase aguda da infecção estão correlacionadas ao processo inflamatório agudo (37). Um exemplo disto é o fato de que as alterações eletrocardiográficas vistas na fase aguda da doença de Chagas em muito se assemelham às encontradas em outras miocardites agudas (78).

Apesar da maioria dos modelos estabelecidos para fase aguda da infecção por *T. cruzi* em camundongos detectar acometimento histológico como visto neste trabalho, poucos são os que demonstram a ocorrência de cardiopatia – a principal

consequência clínica da infecção em humanos. A maioria dos estudos restringe-se a avaliar a inflamação tecidual no miocárdio e aqueles que avaliam função cardíaca nem sempre detectam graus consideráveis de alterações (37). Alguns autores acreditam que o eletrocardiograma de fase aguda da doença de Chagas em pacientes tem nítido valor prognóstico, uma vez que, entre os que apresentam traçado eletrocardiográfico normal nessa fase, apenas 30% desenvolvem alterações na fase crônica. Em contrapartida, 61% dos que apresentam alguma alteração na fase aguda desenvolvem a CCC (79). No presente trabalho, 90% dos animais infectados apresentaram sinais de acometimento 45 dias após a infecção (Figura 6). Além disso, trabalhos já publicados utilizando este mesmo modelo indicam que 80% dos animais infectados desenvolvem a fase crônica da infecção (41), indicando que o modelo aqui utilizado é uma boa opção para o estudo de alterações moleculares resultantes / causadoras da cardiopatia – um importante aspecto a ser avaliado tendo em vista a compreensão da patogênia humana.

Outro aspecto positivo do presente trabalho é o estudo dos microRNAs, considerando o fato de que estas moléculas são altamente conservadas evolutivamente e apresentam comportamentos análogos em diversas espécies distintas (80). Em alguns casos, é possível extrapolar os achados em camundongos e propor que microRNAs com relevância biológica em um dado modelo experimental podem exercer papéis relevantes também no sistema biológico humano. Apesar dos pontos acima destacados, vale ressaltar que sempre existem limitações na utilização de modelos experimentais para o estudo de doenças humanas. Desta forma, as análises devem ser feitas sempre de maneira cautelosa.

Perfis de expressão de microRNAs tem sido reconhecidos como “assinaturas fenotípicas” muito relevantes em doenças cardíacas, sendo, em alguns casos, mais informativos do que ensaios de expressão contendo milhares de genes codificantes (81). As alterações ocorridas na expressão de microRNAs do hospedeiro refletem o papel destas moléculas durante a infecção e podem representar importantes aspectos da patogênese da doença. Em trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo, foi demonstrado pela primeira vez que um *cluster* de microRNAs

músculo-específicos tem sua expressão alterada no miocárdio de pacientes chagásicos crônicos (82). Análises *in silico* indicam que tais microRNAs parecem estar envolvidos na regulação de genes com expressão alterada nestas mesmas amostras (19). Na infecção aguda por *T. cruzi*, o perfil de expressão de microRNAs foi suficiente para segregar as amostras em clados de acordo com o tempo de infecção, indicando que as alterações detectadas, de fato, representam as consequências do quadro infeccioso naquele dado momento (Figura 8). Foi possível notar, ainda, que o número de microRNAs com expressão alterada aumenta consideravelmente com a evolução da infecção (Figura 8). Pode-se inferir que as alterações moleculares ocorridas face à infecção se mantêm e continuam a ocorrer, a despeito do aparente controle da parasitemia visto aos 45 dpi. Tais modificações podem estar relacionadas à resposta imune estabelecida para o combate da infecção, bem como a danos ocorridos a longo prazo, como consequência da interação parasito-hospedeiro.

Outro fato interessante é que 90% dos microRNAs que têm sua expressão modificada nos primeiros momentos da infecção (15 dpi) mantêm-se alterados até o último tempo analisado (Figura 8). Tais alterações, ainda que precoces, podem representar uma “assinatura básica” de modificações induzidas pelo parasita numa tentativa de modular o ambiente celular ao seu favor, bem como induzidas pelo próprio hospedeiro como uma resposta para manutenção da homeostase. Por este motivo, este grupo de microRNAs foi estudado em maior detalhe (Figura 9).

A busca por correlações foi uma maneira utilizada neste trabalho para filtrar a grande quantidade de dados em achados potencialmente relevantes no contexto biológico estudado. Para tanto, foram selecionados a parasitemia e a duração do intervalo QTc como parâmetros clínicos a serem correlacionados com a expressão dos microRNAs. Parasitemia e intervalo QTc são parâmetros relevantes na infecção por *T. cruzi*. A carga parasitária da fase aguda é um fator que influencia o prognóstico da fase crônica (13), enquanto que o prolongamento do intervalo QTc é considerado um importante preditor de mortalidade (83). A análise da expressão de um grupo de microRNAs com cinética semelhante à observada na parasitemia e

intervalo QTc dos animais (Figura 10) levou à determinação de correlações entre a expressão de seis destas moléculas e tais alterações patológicas: miR-146b, miR-21, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-145 e miR-149 (Figura 11). Além disso, análises secundárias de correlação - utilizando dados de expressão de todos os microRNAs avaliados, independentemente da significância estatística - confirmaram a presença desse *cluster* de microRNAs entre os mais fortemente correlacionados, o que reforça a relevância biológica desse achado (Tabelas 1, 2 e 3).

Uma revisão do que já foi descrito até o momento sobre estes seis microRNAs traz uma série de possíveis motivos para a ocorrência de tais correlações. O miR-146b, por exemplo, já foi descrito como um inibidor da tradução das proteínas IRAK1 (do inglês, *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) e TRAF6 (do inglês, *TNF receptor-associated factor 6*), tendo um papel regulador na resposta induzida via TLR's (84). Sendo um gene dependente de NF- κ B (do inglês, *Nuclear factor kappa B*), o miR-146b age numa alça de *feedback* negativo, reduzindo a expressão de moléculas adaptadoras chave na resposta pró-inflamatória, que culmina com a translocação de NF- κ B para o núcleo. Este mesmo microRNA também está envolvido na redução da resposta inflamatória por outras vias, como a da MAPK (do inglês, *Mitogen-activated protein kinase*) (85), donde se pode concluir que o aumento da sua expressão tem forte impacto sobre a resposta anti-parasitária. No contexto da infecção por *T. cruzi*, a ligação de moléculas do parasita a TLRs poderia levar à maior expressão do miR-146b que, por sua vez, reduz a expressão de IRAK1 e TRAF6, dentre outras moléculas, impedindo a expressão de genes pró-inflamatórios e coestimulatórios. Corroborando com isto, a expressão reduzida de TRAF6 já foi descrita como um fator de piora na parasitemia de animais infectados por *T. cruzi* e tratados com aspirina (86).

O miR-21 tem sido descrito como um importante fator no desenvolvimento de fibrose, com resultados muitas vezes contraditórios (87). Nas amostras do presente trabalho, no entanto, não foi detectada a presença de fibrose no tecido cardíaco (dados não mostrados). Por outro lado, Roy e colaboradores demonstraram que um importante alvo do miR-21 é a proteína PTEN (do inglês, *Phosphatase and tensin*

homolog), que, em expressão reduzida, leva ao aumento da metaloproteinase-2 (MMP-2) (88). Corroborando com o achado da expressão aumentada do miR-21 neste modelo experimental, dados não publicados do nosso grupo indicam que no tecido cardíaco de pacientes chagásicos crônicos a expressão proteica de MMP-2 está aumentada. Outro importante alvo descrito para o miR-21 é a IL-12 (89). A análise do transcriptoma de camundongos miR-21^{-/-} desafiados com OVA indica um proeminente aumento da expressão de vias associadas a IL-12/IFN- γ , sendo o miR-21 uma molécula chave na sinalização por IFN- γ e consequente polarização de linfócitos T (90). A polarização da resposta Th1 é sabidamente importante no controle da infecção aguda por *T. cruzi*, o que pode esclarecer a correlação existente entre a alta parasitemia e a alta expressão do miR-21. Camundongos *knockout* para IL-12 são altamente suscetíveis à infecção, apresentando alta parasitemia e mortalidade (91).

O miR-145, que apresenta correlação negativa com o QTc e parasitemia dos animais, já foi descrito como um importante regulador da hipertrofia cardíaca. Sua alta expressão reduz os níveis do fator de transcrição pró-hipertrófico GATA6, resultando em menores níveis de ANF, BNP e β -MHC (do inglês, *Atrial natriuretic factor*; *Brain natriuretic factor*; *Beta-Myosin heavy chain*) (92). Tais moléculas são normalmente expressas durante o desenvolvimento fetal cardíaco e, em situações de hipertrofia, têm sua expressão sabidamente recapitulada (93). Desta forma, uma possível consequência da expressão reduzida do miR-145 neste modelo é o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca – uma característica marcante da cardiopatia chagásica. Em acordo com esta hipótese, estudos já demonstraram a expressão de fatores hipertróficos, como cardiotrofina-1, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ (16, 17, 19, 20), bem como ocorrência de hipertrofia na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (16). Além disso, a hipertrofia cardíaca é um importante fator de risco para o prolongamento do intervalo QTc – alteração detectada nos animais infectados (94).

O miR-149 tem sido geralmente descrito em cânceres, embora sua importância na osteoartrite também já tenha sido discutida. A expressão deste microRNA é reduzida perante estímulo com IL-1 β e TNF- α , ao tempo que alguns

dos seus alvos descritos são estas mesmas citocinas pró-inflamatórias, além da IL-6 (95). O miR-142-3p/-5p também já foi descrito como repressor da expressão de IL-6, assim como do seu receptor – a glicoproteína 130. Durante uma situação de hipertrofia cardíaca, a expressão destes microRNAs leva a apoptose e disfunção cardíaca, pois sua expressão reduzida é um mecanismo adaptativo necessário para mediar sinais de sobrevivência via IL-6/STAT3 (96, 97). Na infecção por *T. cruzi*, esta citocina também já foi descrita como um fator anti-apoptótico essencial na proteção de cardiomiócitos, através da ativação de STAT3 (98). Além disso, o miR-142 tem sua expressão regulada pela atividade de p300 e MAPK e inibe a expressão de múltiplos componentes da via TNF- α /NF- κ B, inibindo a produção de NO – uma via crucial durante a fase aguda da infecção (97).

A análise do padrão global de expressão de microRNAs durante toda a infecção foi feita com ferramentas de bioinformática, devido à grande quantidade de dados. Foram selecionados alvos experimentalmente observados ou com predição bastante confiável para a geração de redes de interação molecular. Nas análises feitas a partir de microRNAs diferencialmente expressos nos tempos de infecção avaliados, TNF- α e ciclina-D1 foram moléculas nodais recorrentes nas redes, indicando que possivelmente estão envolvidas em todo o curso da infecção aqui estudada (Figuras 12 e 13). Coletivamente, o silenciamento de vias induzido por um determinado grupo de microRNAs é fruto da interação específica entre parasito e hospedeiro, resultando na modulação de componentes importantes da resposta imune (99). As ciclinas do tipo D são moléculas envolvidas no ciclo celular e, portanto, fazem parte de diversas vias de proliferação. Sua ação se dá pela ativação de CDK-4/6 e progressão da fase G1 para S (síntese) (100). Enquanto a expressão de ciclina no coração adulto é, em geral, baixa, sua transcrição encontra-se reativada durante a hipertrofia, assim como a de outros genes do desenvolvimento fetal cardíaco. Sua alta expressão neste caso, no entanto, não está necessariamente atrelada à proliferação de miócitos (101). No contexto da infecção por *T. cruzi* em camundongos, foi descrito um aumento acentuado na expressão de ciclina-D1, mediado por aumento na estabilidade desta proteína (102, 103). O papel

do TNF- α na doença de Chagas é controverso. Sua expressão é necessária para o controle da parasitemia na fase aguda, ao passo que em infecções realizadas com linhagens de camundongos resistentes ou suscetíveis, a mortalidade está diretamente associada à presença de TNF- α sérico (104). Além disso, a severidade da cardiopatia chagásica está associada a um desequilíbrio imune que favorece IFN- γ e TNF- α em lugar da IL-10 (105). O TNF- α tem sido constantemente associado à patogênese de outras doenças cardiovasculares, sendo, inclusive, explorado como alvo terapêutico (106). Tomadas em conjunto, tais informações indicam que as análises *in silico* a partir do perfil de expressão de microRNAs ressaltou moléculas que estão envolvidas tanto na resposta imune ao parasita, quanto no consequente dano cardíaco causado.

Na análise feita a partir dos seis microRNAs com expressão correlacionada às alterações na parasitemia e intervalo QTc, apenas uma rede molecular foi gerada, sendo TNF- α , TGF- β , Rac1 e Src as moléculas nodais (Figura 14). Além do seu reconhecido papel como citocina anti-inflamatória, o TGF- β também está envolvido no desenvolvimento, fisiologia e doenças do coração. Na doença de Chagas, esta citocina pode estar envolvida em diversos aspectos: invasão de células cardíacas, ciclo intracelular do parasita, inflamação, resposta imune, fibrose, remodelamento cardíaco e condução do impulso elétrico no coração (107). A infecção de células epiteliais pelo *T. cruzi* é dependente da presença de receptores de TGF- β , os quais são estimulados pelo próprio parasita, a fim de aumentar sua capacidade de invasão (108). Em modelo experimental, o bloqueio de TGF- β reduz o dano cardíaco e restaura os parâmetros eletrocardiográficos, reduzindo a mortalidade (109). Rac1 é uma GTPase que está diretamente envolvida na regulação da NADPH oxidase e, consequentemente, na geração de espécies reativas de oxigênio. Além disto, essa enzima tem atividade pró-hipertrófica (110). Src é uma tirosina quinase essencial para a infecção de células pelo *T. cruzi*. A interação entre *T. cruzi* e cardiomiócitos leva à expressão aumentada de Src e a invasão do parasita é impedida pela utilização de inibidores específicos para tirosina quinases (111). Tomadas em conjunto, estas moléculas estão envolvidas em múltiplos aspectos da infecção por

T. cruzi, tendo funções cruciais que foram ressaltadas pelas análises de bioinformática deste trabalho. Sendo a doença de Chagas uma doença multifatorial, é coerente o estudo de alvos centrais, que estejam envolvidos nos diversos âmbitos de sua patogênese. A modulação destes componentes pelos microRNAs aqui estudados podem influenciar a evolução da infecção.

O estudo de microRNAs em doenças infecciosas representa uma rica ferramenta. Por um lado, o estabelecimento de uma “assinatura biológica” de microRNAs pode ser muito relevante para a compreensão da patogênese de doenças parasitárias. Na infecção por *Toxoplasma gondii*, por exemplo, os microRNAs miR-155 e miR-146a delinearam um perfil de resistência à infecção cerebral (112). Na doença de Chagas, a determinação de biomarcadores de prognóstico auxiliaria no reconhecimento precoce de pacientes crônicos ou indeterminados. Neste contexto, os microRNAs com expressão correlacionada à parasitemia e ao intervalo QTc apresentados neste trabalho são opções com potencial de serem exploradas. Por outro lado, microRNAs exercem um amplo espectro de implicações dentro de um contexto biológico, podendo afetar vias diversas simultaneamente, de maneira que a modulação de sua expressão é de grande potencial terapêutico. Apesar disto, os efeitos em vias e moléculas indesejadas (*off targets*) é um fator a ser cuidadosamente avaliado. Considerando esta dificuldade, outras abordagens mostram-se muito úteis, como, por exemplo, o estudo *in silico* das vias potencialmente afetadas por um perfil alterado de microRNAs. Desta forma, é possível selecionar quais alvos daquele perfil são, de fato, interessantes, preservando a expressão normal de outros alvos.

No presente trabalho, foi demonstrada pela primeira vez a capacidade do *T. cruzi* de modular a expressão de microRNAs do hospedeiro na fase aguda da infecção. A expressão alterada de microRNAs, em alguns casos, foi relacionada a alterações patológicas resultantes da infecção, como parasitemia e intervalo QTc. Além disso, TNF- α , ciclina-D1, TGF- β , Rac1 e Src apresentaram-se como fatores potencialmente afetados pela expressão alterada de microRNAs na fase aguda da

infecção por *T. cruzi*, abrindo uma ampla gama de possibilidades para futuros estudos.

7. CONCLUSÕES

- 121 microRNAs foram diferencialmente expressos durante a infecção: 19 aos 15 dpi, 66 aos 30 dpi e 103 aos 45 dpi;

- 90% dos microRNAs com expressão alterada aos 15 dpi se mantiveram alterados durante todo o curso da infecção;

- Na análise de agrupamento hierárquico e PCA as amostras se segregaram de acordo com o tempo de infecção: o grupo controle foi alocado num clado ao lado do grupo 15 dpi, enquanto o grupo 45 dpi se agrupou num clado a parte dos demais;

- Seis microRNAs tiveram sua expressão correlacionada a alterações na parasitemia e intervalo QTc: miR-146b, miR-21, miR-142-3p e miR-142-5p positivamente e miR-145 e miR-149 negativamente;

- Em análise de correlação com todos os microRNAs avaliados, outros 73 microRNAs tiveram sua expressão correlacionada à parasitemia, 67 com o intervalo QTc e 16 com ambos os parâmetros simultaneamente;

- Nas análises *in silico* de predição de alvos, TNF- α e ciclina-D1/CDK4 foram moléculas nodais recorrentes nas redes geradas com alvos de microRNAs diferencialmente expressos em todos pontos da infecção;

- Nas análises *in silico* com os seis microRNAs correlacionados uma única rede foi gerada, sendo TNF- α , TGF- β . Rac1 e Src as moléculas nodais.

8. ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética **CIÊNCIA**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **20.09.13** tomou ciência do Projeto nº **390/13** intitulado **“Perfil de expressão de microRNAs no miocárdio na infecção aguda pelo Trypanosoma cruzi em camundongos”**, vinculado à pós-graduação do Departamento de Clínica Médica, que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz, onde o projeto será executado.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Edécio Cunha Neto

Pesquisador(a) Executante : Isabela Cunha Navarro

CEP-FMUSP, 20 de Setembro de 2013.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética em Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Coordenadoria de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

ANEXO B – Caracterização das amostras utilizadas

Tabela 1. Caracterização das amostras selecionadas para experimento de determinação do perfil de expressão de microRNAs.

Grupo	Amostra	QTc (ms)	Parasitemia (parasitos/ml)
Controle	1	74,5	-
	2	74,68	-
	3	70,1	-
	4	75,12	-
15 dpi	5	79,22	1,99 ⁵
	6	85,61	8,09 ⁴
	7	80,21	9,96 ⁴
	8	87,24	6,22 ³
30 dpi	9	110,3	7,47 ⁵
	10	93,32	9,71 ⁵
	11	95,09	7,84 ⁵
	12	105,2	1,15 ⁶
45 dpi	13	87,47	5,6 ⁵
	14	86,57	4,73 ⁵
	15	98,62	2,24 ⁵
	16	102,3	3,30 ⁵

ANEXO C – Análise de qualidade e integridade das amostras utilizadas

Tabela 2. Análise de qualidade e integridade das amostras de RNA utilizadas para o experimento de determinação do perfil de expressão de microRNAs.

Grupo	Amostra	260/230nm	260/280 nm	RIN
Controle	1	1,93	2,14	8,3
	2	1,76	2,1	8,1
	3	2,16	2,14	8,7
	4	1,68	2,1	8,6
15 dpi	5	1,37	2,07	8,5
	6	1,29	2,03	8,3
	7	1,74	2,03	8,6
	8	1,63	2,1	8,9
30 dpi	9	1,7	2,1	9,1
	10	1,73	2,13	9,2
	11	2,16	2,13	9,2
	12	1,74	2,11	9
45 dpi	13	1,89	2,13	8,9
	14	1,91	2,1	8,8
	15	2,1	2,12	8,7
	16	2,05	2,1	9

Perfil densitométrico das amostras de RNA utilizadas para o experimento de determinação do perfil de expressão de microRNAs. As bandas representam o RNA das subunidades ribossomais 28S, 18S e 5S, as quais foram utilizadas para determinação do RIN. Figura gerada pelo software 2100 Expert Software.

ANEXO D – Artigos publicados durante o mestrado

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijcard

MicroRNAs *miR-1*, *miR-133a*, *miR-133b*, *miR-208a* and *miR-208b* are dysregulated in Chronic Chagas disease Cardiomyopathy

Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira^{a,b,c}, Amanda Farage Frade^{a,b,c}, Ronaldo Honorato Barros Santos^d, Priscila Camillo Teixeira^{a,b,c,1}, Monique Andrade Baron^{a,b,c}, Isabela Cunha Navarro^{a,b,c}, Luiz Alberto Benvenuti^e, Alfredo Inácio Fiorelli^d, Edimar Alcides Bocchi^d, Noedir Antonio Stolf^d, Christophe Chevillard^f, Jorge Kalil^{b,c}, Edecio Cunha-Neto^{a,b,c,*}

^a Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil

^b Division of Clinical Immunology and Allergy, University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil

^c Institute for Investigation in Immunology (iii), INCT, 05403-001, São Paulo, Brazil.

^d Division of Surgery, Heart Institute (InCor), University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil

^e Division of Pathology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil

^f INSERM, U906, Aix-Marseille University AMU, Faculté de Médecine, Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2013

Received in revised form 25 April 2014

Accepted 11 May 2014

Available online xxxx

Keywords:

Chagas disease

Trypanosoma cruzi

miRNA

Heart

ABSTRACT

Background/methods: Chagas disease is caused by an intracellular parasite, *Trypanosoma cruzi*, and it is a leading cause of heart failure in Latin America. The main clinical consequence of the infection is the development of a Chronic Chagas disease Cardiomyopathy (CCC), which is characterized by myocarditis, hypertrophy and fibrosis and affects about 30% of infected patients. CCC has a worse prognosis than other cardiomyopathies, like idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM). It is well established that myocardial gene expression patterns are altered in CCC, but the molecular mechanisms underlying these differences are not clear. MicroRNAs are recently discovered regulators of gene expression, and are recognized as important factors in heart development and cardiovascular disorders (CD). We analyzed the expression of nine different miRNAs in myocardial tissue samples of CCC patients in comparison to DCM patients and samples from heart transplant donors. Using the results of a cDNA microarray database on CCC and DCM myocardium, signaling networks were built and nodal molecules were identified.

Results: We observed that five miRNAs were significantly altered in CCC and three in DCM; importantly, three miRNAs were significantly reduced in CCC as compared to DCM. We observed that multiple gene targets of the differentially expressed miRNAs showed a concordant inverse expression in CCC. Significantly, most gene targets and involved networks belong to crucial disease-related signaling pathways.

Conclusion: These results suggest that miRNAs may play a major role in the regulation of gene expression in CCC pathogenesis, with potential implication as diagnostic and prognostic tools.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease is caused by an infection with the parasite *Trypanosoma cruzi* naturally transmitted through hematophagous reduviid bugs or by blood transfusions, organ transplants and congenitally. The disease is endemic in Latin America with an estimated 8 to 10 million people infected, but has become a worldwide concern, because it has been detected in non-endemic countries in North America (Canada and the United States), Western Pacific Region (mainly Australia and Japan), and more recently in Europe [1]. The main clinical consequence of infection by the parasite is the development of a

Chronic Chagas disease Cardiomyopathy (CCC), an inflammatory dilated cardiomyopathy that comprises a wide range of life threatening manifestations, including cardiac hypertrophy, fibrosis, heart failure, arrhythmias, heart blocks, sudden death, thromboembolism, and stroke. About 30% of infected patients develop CCC 5 to 30 years after initial infection, and have a worse prognosis than patients with other cardiomyopathies, such as dilated cardiomyopathy (DCM) [2]. Our group has shown that the myocardial gene expression profiles in CCC patients are profoundly different from those of both heart donors and DCM patients as assessed with the 10,386 element cDNA microarray Cardiochip [3]. Although the gene expression profiling provided evidence for strong IFN- γ signaling in the CCC myocardium, the determinants of gene expression of the majority of differentially expressed genes remained unknown. MicroRNAs (miRNAs or miRs) are noncoding single stranded RNA molecules of 18–26 nt in length capable of silencing the gene expression by inhibiting either protein translation

* Corresponding author at: Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor), Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, Bloco II, 9^o, Andar, São Paulo 05403-900, Brazil.

E-mail address: edecunha@usp.br (E. Cunha-Neto).

¹ Present address: F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland.

from mRNA transcripts through imperfect base pairing with their 3' untranslated region (UTR) or by inducing mRNA decay [4]. Over the past decade, the central role of miRNAs has been established in numerous biological and pathological processes, including cell differentiation, apoptosis and carcinogenesis across different species, from *Drosophila* to humans [5–7]. The heart-specific deletion of Dicer or DCGR8, enzymes both required for the synthesis of miRNA during embryonic development and in adult mice, results in embryonic-lethality and dilated cardiomyopathy [8]. It has been shown that the dysregulated expression pattern of miRNAs and consequently their dysregulated expressed gene targets will contribute to a resultant disease phenotype [9–11]. The possible role of miRNAs in the pathogenesis of CCC has not been approached yet. We hypothesized that miRNAs could play a dominant role in regulating gene and protein expression in CCC myocardial tissue. We have chosen to analyze nine miRNAs: (miR-1, miR-133a-2, miR-133b, miR-208a, miR-208b, miR-214-3p, miR-146a-5p, miR-155-5p and miR-150-5p), that had previously been described as playing important roles in CD, to test our hypothesis that there is a dysregulated miRNA expression in the CCC myocardium. We therefore estimated and compared the expression levels of these nine individual miRNAs using real-time quantitative PCR (qPCR) assays in human myocardial samples of end-stage CCC to DCM and control human myocardial samples from heart transplant donors (CONT). An *in silico* analysis was performed to delineate networks and central nodal molecules of the differentially expressed miRNAs and their potential gene targets observed in CCC [3]. We have also experimentally validated the expression of cyclin D1 (CCND1), a miR-1 target [12].

2. Materials and methods

2.1. Patients

Human left ventricular free wall heart tissue was obtained from end-stage heart failure patients at the moment of heart transplantation. The patients belonged to three diagnostic groups: 10 CCC (at least 2 positive results in 3 independent anti-*T. cruzi* serology tests—ELISA immunoassay, indirect immunofluorescence assay and indirect hemagglutination test), 6 DCM (idiopathic dilated cardiomyopathy in the absence of ischemic disease, negative serology for Chagas disease) and 4 CONT, left ventricular free wall samples obtained from healthy hearts of organ donors, which were not used for transplantation due to size mismatch with available recipients (Table 1). All Chagas disease patients underwent standard electrocardiography and echocardiography. Echocardiography was performed in the hospital setting using an Acuson Sequoia model 512 echocardiographer with a broad-band transducer. The left ventricular dimensions and regional and global function evaluations were performed using a 2 dimension and M mode approach, in accordance with the recommendations of the American Society of Echocardiography. Patients with CCC presented heart conduction abnormalities (right bundle branch block and/or left anterior division hemiblock) [2]. The characteristics of patients and normal donors whose samples were used in this study are described in Table 1. This protocol was approved by the Institutional Review Board of the University of the São Paulo School of Medicine and written informed consent was obtained from the patients.

2.2. Sample preparation

All samples were cleared from pericardium and fat, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Individual 5 mm sections of paraffin-embedded tissue of frozen myocardial fragments were applied to microscope slides. Slides were subjected to hematoxylin–eosin. Standard hematoxylin–eosin staining was performed for evaluation of the intensity and location of the inflammatory infiltrate. Slides were evaluated and scored for the intensity of myocarditis and fibrosis and for the presence or absence of hypertrophy [13].

2.3. Isolation of total RNA enriched with miRNAs

MiRNA-enriched total RNA was isolated from 50 mg of tissue from each heart sample by mechanical disruption with the Precellys 24-bead-based homogenizer (Bertin Technologies) using 3 cycles of 15 s with pause of 20 s each at 6,000 rpm. The samples were homogenized in 500 μl of lysis buffer from the mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin) and following the manufacturers' protocol. The concentration of RNA extracted was measured using NanoDrop-1000 (Thermo Scientific) and tested for UV/Vis ratios and the integrity was analyzed on a Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA). Samples with RIN value <6.5 were not used in our analysis.

Table 1
Clinical characteristics of the study subjects.

Etiol. ^a	Patient #	Sex	Age	EF (%) ^b	Fibrosis ^c	Hypertrophy ^d	Myocarditis ^c
CCC	1	M	28	21	2+	Y	2/3+
	2	F	55	36	2+	Y	2+
	3	M	58	29	2+	Y	2+
	4	M	57	29	1+	Y	2/3+
	5	F	60	20	2+	Y	3+
	6	F	61	15	1+	Y	1+
	7	F	50	23	2/3+	Y	3+
	8	M	32	12	2/3+	Y	3+
	9	M	34	25	1+	Y	2+
	10	M	59	17	2+	Y	3+
DCM	11	M	55	25	3+	Y	0
	12	M	56	16	2+	Y	0
	13	M	36	14	1+	Y	0
	14	F	58	17	2+	Y	0
	15	F	53	27	1+	Y	0
	16	M	61	27	3+	Y	0
CONT	17	M	22	ND	0	N	0
	18	M	46	ND	0	N	0
	19	M	17	ND	0	N	0
	20	M	28	ND	0	N	0
	21	M	45	ND	0	N	0

M: Male.

F: Female.

ND: not done Y: Yes N: No.

CONT: heart donors; DCM: idiopathic dilated cardiomyopathy; CCC: Chronic Chagas cardiomyopathy.

^a Etiol.: etiology.

^b EF: ejection fraction (reference value: 55%).

^c Rated by histopathology (0: absent, 1+: mild, 2+: moderate, 3+: intense).

^d Cardiomyocyte hypertrophy was characterized by enlarged cells with prominent, hyper chromatic nuclei.

2.4. Analysis of mRNA and miRNA expression by real-time reverse transcriptase (RT)-PCR

Quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) assays were performed using a TaqMan microRNA assay kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) for the mature microRNAs (S1 Table) and using SYBR Green (Applied Biosystems) for the CCND1. The following primers were designed using Primer Express software version 3.0 (Applied Biosystems): CCND1 (GenBank accession no. **NM_053056.2**): (F) 5'-GCCGAGAAGCTGTG CATCTAC-3', (R) 5'-TCCACTTGAGCTTGTTCCACAG and GAPDH (GenBank accession no. **M33197**): (F) 5'-TGGTCTCTCTGACTTCAACA-3', (R) 5'-AGCCAAATTCGTGTGCATACC-3'. RT reactions of mature microRNAs contained 100 ng of enriched miRNA total RNA, 50 nM stem-loop RT primer, 10 $\times$ RT buffer, 100 mM each dNTPs, 50 units/ μl of MultiScribe reverse transcriptase, and 20 units/ μl of RNase inhibitor. Reaction mixtures (15 μl) were incubated in a thermocycler (Applied Biosystems) for 30 min at 16°C , 30 min at 42°C , and 5 min at 85°C and then maintained at 4°C . Real-time PCR was performed in a 10 μl PCR mixture containing 1.33 μl of RT product, 2 $\times$ TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.2 μM TaqMan probe, 15 μM forward primer, and 0.7 μM reverse primer. For qRT-PCR reactions a small nuclear RNA, RNU44 was used for normalization. For the CCND1 mRNA, 5 μg total RNA were reverse transcribed using Super-script II™ reverse transcriptase (Invitrogen) and mRNA expression was analyzed also by real-time quantitative RT-PCR with SYBR Green I PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 250 nM of sense and anti-sense primers using the GAPDH mRNA for normalization. The reactions were done in an ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). For the CCND1 SYBR Green assay, standard curves were generated for the primers set to determine their efficiency, and dissociation curves were generated to detect non-specific amplification products and primer-dimers. A set of "no RT" controls were performed with each batch of RNA, and no template controls were included with each experiment. A threshold cycle (Ct) was observed in the exponential phase of amplification, and quantification of relative expression levels was performed using standard curves for target genes and the endogenous control. Reactions were performed in duplicate and Ct values were averaged for the replicates and negative controls were included to detect contamination. The expression was calculated as the mean $\pm$ s.d. for each group as individual data points and the following formula was used: relative expression (fold change over CONT samples) by the 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$ method, where Ct is the threshold cycle as previously described [14].

2.5. Target prediction

We used the software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity® Systems, Redwood City, CA—www.ingenuity.com), and the tool called "target filter" which relies on three popular algorithms (TargetScan, TarBase and miRecords), to identify putative

targets and targets within lists of differentially expressed genes from our microarray analysis of the five differentially expressed miRNAs for CCC and three for DCM samples.

2.6. Network pathway analysis

IPA Network maintains a graphical database of networks of interacting genes (Ingenuity Knowledge Base, IKB). Two lists of miRNAs and their target mRNAs, differentially expressed in CCC and DCM compared to CONT, were uploaded in the IPA and analyzed based on the content of date 2013–10. The significance of the association between each list and the pathway was measured by Fisher's exact test. As a result, a *P*-value was obtained, determining the probability that the association between the genes in our data set and the network generated can be explained by chance alone. Molecules are represented as nodes, and the biological relationship between two nodes is represented as an edge (line). All edges are supported by at least one reference from the literature, from a textbook, or from canonical information stored in the IKB.

2.7. Statistical analysis

Groups were compared by a non-parametrical test (Mann–Whitney Rank Sum Test) with GraphPad Prism ® software (version 5.0; GraphPad). Results were expressed as medians and interquartile ranges. *P*-values were considered significant if <0.05 .

3. Results

3.1. Muscle-specific miRNAs are downregulated in CCC

We have assessed the expression levels of nine miRNAs that had previously been described as playing important roles in CD: miR-1, miR-133a-2, miR-133b, miR-208a, miR-208b, miR-214-3p, miR-146a-5p, miR-155-5p and miR-150-5p. From those, five miRNAs: miR-1, miR-133a-2, miR-133b, miR-208a, and 208b were significantly downregulated in CCC samples as compared to CONT ($p = 0.0007$). Three of them (miR-133b, miR-208a and miR-208b) were significantly reduced in DCM samples as compared to controls. Importantly, miR-1, miR-133a-2 and miR-208b were significantly less expressed among CCC than DCM samples (Fig. 1A to E). Levels of the other four miRNAs analyzed: miR-214-3p, miR-146-5p, miR-155-5p and miR-150-5p were not significantly different between groups (Fig. 2: A to D). However, the difference in expression of these miRNAs did not reach statistical significance; miR-155 showed a trend toward higher expression in CCC compared with CONT samples (Fig. 2C).

Fig. 1. Individual mature miRNAs: A) miR-133a, B) miR-133b, C) miR-1, D) miR-208a and E) miR-208b were measured in human myocardial samples from heart transplant donors (CONT = 5), or end-stage CCC ($n = 10$) and DCM ($n = 6$). We used TaqMan MicroRNA single assays (Applied Biosystems®) and the samples were normalized to RNU44. The expression was calculated as the mean $\pm$ s.d. for each group as individual data points using the relative expression (fold change over CONT) by the 2-DD Ct method, where Ct is the threshold cycle. Groups were compared by a non-parametrical test (Mann–Whitney Rank Sum Test) with GraphPad Prism ® software (version 5.0; GraphPad). Results were expressed as medians and interquartile ranges. *P*-values were considered significant if <0.05 .

Fig. 2. Individual mature miRNAs: A) miR-150-5p, B) miR-214-3p, C) miR-155-5p and D) miR-146a-5p were measured in human myocardial samples from heart transplant donors (CONT = 5), or end-stage CCC ($n = 10$) and DCM ($n = 6$). We used TaqMan MicroRNA single assays (Applied Biosystems®) and the samples were normalized to RNU44. The expression was calculated as the mean $\pm$ s.d. for each group as individual data points using the relative expression (fold change over CONT) by the 2- $\Delta\Delta$ Ct method, where Ct is the threshold cycle. Groups were compared by a non-parametrical test (Mann–Whitney Rank Sum Test) with GraphPad Prism® software (version 5.0; GraphPad). Results were expressed as medians and interquartile ranges. P -values were considered significant if <0.05 .

3.2. miRNA putative targets prediction

A data set containing each statistically significant miRNAs and the corresponding values of fold change over CONT for each condition (CCC or DCM) was uploaded into IPA application for miRNA target prediction. Considering that miRNAs with the same seed sequence usually target the same RNAs, the IPA software clusters together the mature

miRNAs that share the same 7-nucleotide seed sequence (nucleotides 2–8 from the 5' end of the mature sequence) into one entity or “node” in order to increase the specificity of targeting information. Two sets out of the five differentially expressed miRNAs analyzed share the same seed sequence (S1 Table), miR-208a with miR-208b and miR-133a-2 with miR-133b. For CCC samples, the software identified a total of 2227 putative target transcripts of the five differentially expressed

Table 2
In silico analysis done using the IPA software © Ingenuity Systems, Inc. MiRNA/mRNA target (expression pairing) in CCC and DCM myocardial tissue as compared with CONT; Cardiochip cDNA microarray [3].

Targets upregulated in CCC						
Symbol	Fold change	Confidence	Gene ID	Symbol	Fold change	Entrez gene name
miR-1	–6.39	High (predicted)	BC000076.2	CCND1	1.8	Cyclin D1
miR-1	–6.39	High (predicted)	M63485	MATR3	1.5	Matrin 3
miR-1	–6.39	Moderate (predicted)	M27166	PDHA1	2.06	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1
miR-1	–6.39	High (predicted)	AF006636	SDCBP	1.52	Syndecan binding protein (syntenin)
miR-1/miR-133a-3p	6.39/–5.638	High (predicted)	L02897	SPTBN1	1.6	Spectrin, beta, non-erythrocytic 1
miR-1	–6.39	High (predicted)	6908	TBP	1.5	TATA box binding protein
miR-1	–6.39	Experimentally Observed	M17733	TMSB10/TMSB4X	1.5	Thymosin beta 10
miR-1/miR-133a-3p	6.39/–5.638	Experimentally Observed	X04588	TPM3	2	Tropomyosin 3
miR-133a-3p	–5.638	High (predicted)	D28475	CLCN6	1.99	Chloride channel, voltage-sensitive 6
miR-133a-3p	–5.638	High (predicted)	Z74615	COL1A1	1.5	Collagen, type I, alpha 1
miR-133a-3p	–5.638	High (predicted)	J04617	EEF1A1	2.1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
miR-133a-3p	–5.638	High (predicted)	M14660	IFT2	2.7	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
miR-133a-3p	–5.638	Moderate (predicted)	M15856	LPL	1.5	Lipoprotein lipase
miR-133a-3p	–5.638	High (predicted)	AF043324	NMT1	1.7	N-myristoyltransferase 1
miR-133a-3p	–11.6	High (predicted)	J03620	DLD	1.8	Dihydrolipoamide dehydrogenase
Targets upregulated in DCM						
miR-133a-3p	–1.9	High (predicted)	D28475	CLCN6	1.54	Chloride channel, voltage-sensitive 6
miR-133a-3p	–1.9	High (predicted)	M69066	MSN	1.6	Moesin
miR-133a-3p	–1.9	Experimentally Observed	M26252	PKM	1.8	Pyruvate kinase, muscle
miR-208a-3p	–7.8	High (predicted)	S54705	PRKAR1A	1.9	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
Targets upregulated in both CCC and DCM						
miR-133a-3p	–1.9	High (predicted)	D28475	CLCN6	1.54	Chloride channel, voltage-sensitive 6
miR-1	–6.39	High (predicted)	NM_053056.2	CCND1	1.8	Cyclin D1

Fig. 3. A) MiR-1 regulatory element in the 3'UTR of CCND1. B) RNA expression of CCND1 by real time RT-PCR in human myocardial samples from heart transplant donors (CONT = 5), or end-stage CCC (n = 10) and DCM (n = 6). We used SYBR Green (Applied Biosystems®) and the samples were normalized to GAPDH. The expression was calculated as the mean $\pm$ s.d. for each group as individual data points using the relative expression (fold change over CONT) by the 2-DD Ct method, where Ct is the threshold cycle. Groups were compared by a non-parametrical test (Mann-Whitney Rank Sum Test) with GraphPad Prism® software (version 5.0; GraphPad). Results were expressed as medians and interquartile ranges. P-values were considered significant if <0.05 .

miRNAs in CCC: miR-1, miR-133a-2, miR-133b, miR-208a and miR-208b, where 1665 are high predicted and/or had already been experimentally validated as targets. For DCM we identified 1231 putative targets of the two differentially expressed miRNAs in DCM (miR-133a and miR-208a) and from those 872 were high predicted and/or previously experimentally validated as targets. The next step was identifying upregulated target genes of the downregulated miRNAs (expression pairing) within the list of differentially expressed genes in CCC and DCM myocardium as assessed with the 10,386 element microarray Cardiochip, previously identified by our group [3]. From a list of 92 genes with upregulated expression specifically in the CCC myocardium, 12 were targets of the concordantly downregulated miRNAs tested; we also found 4 gene targets that were upregulated only in DCM (out of 47). From the list of 31 genes that were differentially expressed in both CCC and DCM [3], we have identified 4 target genes of 2 miRNAs significantly downregulated in CCC (miR-1 and miR-133a) and 1 gene target of miR-133a downregulated in DCM (Table 2).

3.3. CCND1, a miR-1 target, is upregulated in CCC and DCM compared to CONT

From the list of gene targets of the five miRNAs analyzed we tested the expression levels of CCND1, an experimentally validated miR-1 target [12], by qRT-PCR. We have observed a statistically significant upregulation in CCND1 expression both in CCC and DCM ($p = 0.012$ and $p = 0.017$, respectively) as compared to CONT myocardium samples (Fig. 3).

3.4. Altered miRNAs and their predicted targets expressed in CCC and DCM samples are significantly associated to specific pathway networks

IPA was used to identify molecular networks among the lists of differentially expressed genes in CCC and DCM that are also targets of the altered miRNAs. Ingenuity Systems maintains a graphical database of networks of interacting genes (Ingenuity Knowledge Base, IKB). Our IPA analysis used the database as it existed on 2013–10. Genes or gene products are represented as nodes (the term “molecule”, “gene” and

Table 3

Gene networks for CCC and DCM identified by the IPA software analysis. Gene targets and miRNAs were mapped to their corresponding gene objects in the IKB and these focus molecules (in bold) were overlaid onto a global network based on the IKB. The networks were algorithmically scored. IPA networks were sorted and numbered. The single network generated for CCC had a score of 55 (significance with $p = 10^{-55}$) and it is related to “Cardiovascular Disease, Connective Tissue Disorders, Dermatological Diseases”. For DCM the single network generated with a $p = 10^{-18}$ is related to “Dermatological Diseases and Conditions, Hematological Disease, Cardiac infarction”. The arrows up ($\uparrow$) and down ($\downarrow$) represent that the gene showed an upregulation or downregulation in the microarray database [3].

Molecules in the CCC network—“Cardiovascular Disease, Connective Tissue Disorders, Dermatological Diseases”	Score	Focus molecules
Actin, Akt, Alpha catenin, $\downarrow$CCND1, $\uparrow$CLCN6, $\uparrow$COL1A1, $\uparrow$Collagen type I, $\uparrow$DLD, $\uparrow$EEF1A1, ERK, ERK1/2, Growth hormone, Histone h3, $\uparrow$IFT2, I FN Beta, Insulin, Jnk, LDL, $\uparrow$LPL, $\uparrow$MATR3, $\downarrow$mir-208, $\downarrow$miR-1 (and other miRNAs w/seed GGAAUGU), $\downarrow$miR-133a-3p (and other miRNAs w/seed UUGGUCC), $\downarrow$miR-208a-3p (and other miRNAs w/seed UAAGACG), NFkB (complex), $\uparrow$NFkB-TBP, $\uparrow$NMT1, P38 MAPK, $\uparrow$PDHA1, PI3K (complex), $\uparrow$SDCBP, $\uparrow$SPTBN1, $\uparrow$TBP, $\uparrow$TMSB10/TMSB4X, $\uparrow$TPM3	55	18
Molecules in the DCM network—“Dermatological Diseases and Conditions, Hematological Disease, Cardiac infarction”	Score	Focus molecules
ARGLU1, ARL16, BPHL, C19orf44, $\uparrow$CLCN6, COLQ, DHODH, FN3KRP, GLYR1, GRTP1, KCTD3, $\downarrow$miR-133a-3p (and other miRNAs w/seed UUGGUCC), $\downarrow$miR-208a-3p (and other miRNAs w/seed UAAGACG), $\uparrow$MSN, NPRL2, NSMCE1, PHLDA2, $\uparrow$PKM, PPP3CB, $\uparrow$PRKAR1A, PTGIR, RAB5C, RNF145, SEMG1, SEMG2, SH3BGL3, TMEM2, TMEM100, TRUB1, UBC, UTP18, UVSSA, WDR83, YTHDF1, ZNF135	18	6

“node” will be used interchangeably when describing networks); biological relationships between nodes are represented as edges (lines). All edges are supported by at least 1 literature citation or by canonical information stored in the IKB. The list of targets and miRNAs identified was used as a source dataset of differentially expressed genes for IPA to identify molecular networks associated with CCC or DCM (Table 3). Gene targets and miRNAs were mapped to their corresponding gene objects in the IKB and these “focus genes” were overlaid onto a global network based on the IKB. Smaller networks (<35 nodes) containing a significant number of focus genes were algorithmically selected and scored; a score ≥ 2 indicated a probability $p \leq 0.01$ that the focus genes in a network were found together by chance. IPA networks were sorted and numbered, with the highest scoring network labeled as Network 1. Our results indicated that the “Cardiovascular Disease, Connective Tissue Disorders, Dermatological Diseases” was the single network generated for CCC with a level of significance, $p = 10^{-55}$ (Fig. 4 and Table 3). For DCM, the single network generated with a $p = 10^{-18}$ is related to “Dermatological Diseases and Conditions, Hematological Disease, Cardiac infarction” (Fig. 5, Table 3). The combined biological interaction networks in CCC and DCM reveal genes that are central nodes connected to multiple other molecules in the networks. The CCC network has 11 central nodes: p38MAPK, ERK, JNK, PI3K, AKT, CCND1, insulin, IFN beta, Growth hormone, Collagen Type 1 (COL1A1), and NF- κ B. These nodes are important in the network as removal of any of these nodes significantly alters or destroys the network generated by IPA. The network for DCM showed also a central node, Ubiquitin C (UBC) that is connected to all 33 molecules (excluding the miRNAs) from the network. Interestingly, UBC was not included among the genes in the list uploaded into IPA for the analysis, since it is not a target of any of miRNAs analyzed, but it is one of the 47 genes with upregulated expression in DCM myocardial tissue [3].

Fig. 5. *In silico* analysis done using the IPA software © 2000–2012 (Ingenuity Systems, Inc) showing a representative network of molecules that are predicted targets of the altered miRNAs in DCM (miRNAs: miR-133b, miR-208a and miR-208b). The miRNA target molecules from the array list (focus molecules) are represented in graduation of red and green based on their fold change in expression in DCM compared to CONT [3]. The white open nodes indicate proteins not identified in this analysis, but associated with the regulation of some of the proteins identified. A line denotes binding of proteins, whereas a line with an arrow denotes “acts on.” A dotted line denotes an indirect interaction.

4. Discussion

This study provides the first description of miRNA expression dysregulation in diseased myocardium of CCC patients. The most important finding was that five muscle specific miRNAs, miR-1, miR-133a-2, miR-

133b, and the myocardial-specific miR-208a and miR-208b were down-regulated in the CCC myocardium as compared to CONT. Importantly, miR-1, miR-133a-2 and miR-208b were significantly less expressed among CCC than DCM samples. Several microarray studies have revealed signature pattern expression of specific miRNAs that are

Fig. 4. *In silico* analysis done using the IPA software © 2000–2012 (Ingenuity Systems, Inc) showing a representative network of molecules that are predicted targets of the altered miRNAs in CCC (miRNAs: miR-1, miR-133a-2, miR-133b, miR-208a and miR-208b). The miRNA target molecules from the array list (focus molecules) are represented in graduation of red and green based on their fold change in expression in CCC compared to CONT [3]. The white open nodes indicate proteins not identified in this analysis, but associated with the regulation of some of the proteins identified. A line denotes binding of proteins, whereas a line with an arrow denotes “acts on.” A dotted line denotes an indirect interaction.

consistently aberrantly expressed in patients with different types of CD: i.e., miR-1, miR-29, miR-30, miR-133 and miR-150 are found to be downregulated in heart failure patients [10,15], whereas miRNAs: miR-21, miR-23a, miR-125, miR-146, miR-195, miR-199 and miR-214 are upregulated [16]. MiR-1 and miR-133 have an impaired expression in patients with hypertrophic cardiomyopathy and atrial dilation as well as in different murine models of cardiac hypertrophy (i.e., transverse aortic constriction and overexpression of active cardiospecific Akt kinase) [17,18]. Overexpression of miR-133 resulted in inhibition of hypertrophic growth induced by endothelin-1 and phenylephrine and expression inhibition of endogenous miR-133 using a targeted 3' UTR decoy resulted in cell hypertrophy, increased fetal gene expression, protein synthesis, and expression of atrial natriuretic factor (ANF) [19]. Zhang et al. showed that both miR-1 and miR-133 are important inducers of myoblast growth arrest to G1 phase by direct targeting CCND1 and Sp1, respectively, which in turn mediate the effect of miR-133 and miR-1 on cell cycle progression [12]. Callis et al. have shown that transgenic overexpression of miR-208a (encoded within an intron of cardiac muscle myosin heavy chain gene, *Myh6*) in the heart was sufficient to induce hypertrophic growth in mice, resulting in pronounced repression of the miR-208 regulatory targets thyroid hormone-associated protein 1 and myostatin 2, negative regulators of muscle growth and hypertrophy [20]. Furthermore, analysis of mice lacking miR-208a indicated that this miRNA is important for proper cardiac conduction and expression of the cardiac transcription factors homeodomain-only protein and GATA4 and the gap junction protein connexin 40 [20]. We observed that miRNA expression profiles of CCC and DCM had some predictable similarities, like the three miRNAs: miR-133b, miR-208a and miR-208b that were also downregulated in DCM samples compared to CONT. To move beyond the single miRNA or single gene target approach, we analyzed our target scan signatures using IPA, which allows for identification of enriched networks. The IPA ingenuity analysis revealed different gene networks related to each disease condition with different node molecules. These nodes relate to one transcription factor, i.e., the inflammatory transcription factor and a known mediator in cardiac dysfunction, NF- κ B and protein kinases, i.e., mitogen-activated protein kinases (MAPK) including p38MAPK, ERK1/2, c-Jun N-terminal kinases (JNK), phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K), and the protein kinase B (AKT), enzymes that play important roles in signaling pathways leading to cardiac hypertrophy. Although studies have shown that acute activation of Akt is cardio-protective *in vitro* and *in vivo* due to its ability to inhibit apoptosis [21,22], chronic Akt activation in the heart has been shown to be prejudicial [23]. Kumarswamy et al. have shown that Akt activation negatively regulates cardiomyocyte miR-1 expression *in vitro* and in failing hearts *in vivo*, by the phosphorylation of the transcription factor, Forkhead box O3 (FoxO3a) which binds to the miR-1 promoter and is responsible for a decreased miR-1 expression observed in chronic failing hearts. It has also been shown that this decreased miR-1 expression is reversed in sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2a (SERCA2a) treated hearts [24]. This pathway might be also important and should be further investigated in CCC, as the present study results are showing a miR-1 downregulation; significantly, the gene expression corroborates that AKT is upregulated, while SERCA2a is downregulated in the myocardium of CCC patients [3]. CDND1, an important node molecule in the CCC network, is connected to all the other eight nodes. This protein, along with other D-type cyclins (D2 and D3) is a positive cell cycle regulator that plays an important role in controlling proliferation of cardiomyocytes during normal heart development [25]. The central position of CDND1 is in line with earlier studies revealing that this protein is a key element for cardiac hypertrophic growth [26]. Importantly, the expression of D-type cyclins is generally low in the adult heart and is increased in the diseased heart, where their up-regulation may promote cardiac hypertrophy instead of cell proliferation [27]. Accordingly, a previous study has shown that CCND1

expression is upregulated during *T. cruzi* acute infection in mice and that the expression of CDND1 and other types of cyclins like A1, B1 and E1 is increased in heart lysates of mice acutely infected with *T. cruzi* compared with uninfected controls [28]. Here we show that miR-1 controlled CDND1 might also be a key element in CCC. The network generated for DCM showed a central node, the UBC, a polyubiquitin precursor. Ubiquitin is a small, ubiquitously expressed protein that is covalently attached to proteins in linear chains via a specific enzymatic reaction called ubiquitination which is associated with protein degradation, DNA repair, cell cycle regulation, kinase modification, endocytosis, and regulation of other cell signaling pathways. Importantly, inhibition of the cardiac proteasome has been shown to be cardioprotective under some circumstances [29–31]. The concordant expression of miRs and their targets in CCC and DCM heart tissue, as well as the results of the iterative analysis presented here indicates that miRNAs may play an important role in the regulation of gene expression, modulating key pathways resulting in the manifestation of CCC and DCM phenotype. The results presented here will guide further studies on the contribution of miRNAs and their target genes to CCC and DCM pathogenesis and treatment.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.05.019>.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgments

This research was supported by Brazilian Council for Scientific and Technological Development—CNPq (57.3879/2008-7) and the São Paulo State Research Funding Agency—FAPESP (grant numbers 2008/57881-0 ; 2012/08107-6; 2013/50302-3). Authors also received financial assistance from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Aix-Marseille University (Direction des Relations Internationales), USP-COFECUB program, and the ARCUS II PACA Brésil program. LRP is recipient of a CNPq fellowship. ECN and JK are recipients of the Brazilian Council for Scientific and Technological Development—CNPq productivity awards, AFF, MAB, ICN are recipients of a FAPESP fellowship. ECN and CC are recipients of an international program funded by both, the French ANR (Br-Fr-CHAGAS) and the Brazilian FAPESP agencies. CC was a recipient of a temporary professor position supported by the French consulate in Brazil and the University of São Paulo (USP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- [1] Cortez J, Providencia R, Ramos E, et al. Emerging and under-recognized Chagas cardiomyopathy in non-endemic countries. *World J Cardiol* 2012;4:234–9.
- [2] Bocchi EA, Guimaraes G, Tarasoutshi F, et al. Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America. *Heart* 2009;95:181–9.
- [3] Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* 2005;167:305–13.
- [4] Ambros V. MicroRNAs and developmental timing. *Curr Opin Genet Dev* 2011;21:511–7.
- [5] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350–5.
- [6] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 2003;301:336–8.
- [7] Karp X, Ambros V. Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science* 2005;310:1288–9.
- [8] Yang WJ, Yang DD, Na S, et al. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 2005;280:9330–5.
- [9] Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Vet Pathol* 2013 e-pub ahead of print 17 September 2013.
- [10] Hagiwara S, Kantharidis P, Cooper. M E microRNA as Biomarkers and Regulator of Cardiovascular Development and Disease *Curr Pharm Des* 2014;20:2347–70.

- [11] Lau P, Bossers K, Janky R, et al. Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 2013;5:1613–34.
- [12] Zhang D, Li X, Chen C, et al. Attenuation of p38-mediated miR-1/133 expression facilitates myoblast proliferation during the early stage of muscle regeneration. *PLoS One* 2012;7:e41478.
- [13] Nascimento CA, Gomes VA, Silva SK, et al. Left Atrial and Left Ventricular Diastolic Function in Chronic Chagas Disease. *J Am Soc Echocardiogr* 2013;26:1424–33.
- [14] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–8.
- [15] Elzenaar I, Pinto YM, Van Oort RJ. MicroRNAs in Heart Failure: New Targets in Disease Management. *Clin Pharmacol Ther* 2013;94:480–9.
- [16] Vogel B, Keller A, Frese KS, et al. Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure. *Eur Heart J* 2013;34:2812–23.
- [17] Hua Y, Zhang Y, Ren J. IGF-1 deficiency resists cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of microRNA-1 and microRNA-133a. *J Cell Mol Med* 2012;16:83–95.
- [18] Glass C, Singla DK. ES cells overexpressing microRNA-1 attenuate apoptosis in the injured myocardium. *Mol Cell Biochem* 2011;357:135–41.
- [19] Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2007;13:613–8.
- [20] Callis TE, Pandya K, Seok HY, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 2009;119:2772–86.
- [21] Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, et al. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 2000;101:660–7.
- [22] Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem* 1999;274:16349–54.
- [23] Matsui T, Nagoshi T, Hong EG, et al. Effects of chronic Akt activation on glucose uptake in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E789–97.
- [24] Kumarswamy R, Lyon AR, Volkmann I, et al. SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway. *Eur Heart J* 2012;33:1067–75.
- [25] Kang MJ, Kim JS, Chae SW, et al. Cyclins and cyclin dependent kinases during cardiac development. *Mol Cells* 1997;7:360–6.
- [26] Busk PK, Hinrichsen R. Cyclin D in left ventricle hypertrophy. *Cell cycle* 2003;2:91–5.
- [27] Hotchkiss A, Robinson J, MacLean J, et al. Role of D-type cyclins in heart development and disease. *Can J Physiol and Pharmacol* 2012;90:1197–207.
- [28] Nagajyothei F, Desruisseaux M, Bouzahzah B, et al. Cyclin and caveolin expression in an acute model of murine Chagasic myocarditis. *Cell cycle* 2006;5:107–12.
- [29] Yu X, Kem DC. Proteasome inhibition during myocardial infarction. *Cardiovas Res* 2010;85:312–20.
- [30] Predmore JM, Wang P, Davis F, et al. Ubiquitin proteasome dysfunction in human hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circulation* 2010;121:997–1004.
- [31] Schlossarek S, Carrier L. The ubiquitin-proteasome system in cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol* 2011;26:190–5.

Research Article

Induction of IL-12 Production in Human Peripheral Monocytes by *Trypanosoma cruzi* Is Mediated by Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Mucin-Like Glycoproteins and Potentiated by IFN- γ and CD40-CD40L Interactions

Lúcia Cristina Jamli Abel,¹ Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira,^{1,2,3}
Isabela Cunha Navarro,^{1,2,3} Monique Andrade Baron,^{1,2,3} Jorge Kalil,^{1,2,3}
Ricardo Tostes Gazzinelli,^{4,5,6} Luiz Vicente Rizzo,⁷ and Edecio Cunha-Neto^{1,2,3}

¹ Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor), School of Medicine, University of São Paulo, 05403-001 São Paulo, SP, Brazil

² Division of Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, University of São Paulo, 01246-000 São Paulo, SP, Brazil

³ Institute for Investigation in Immunology (III), INCT, 05403-001 São Paulo, SP, Brazil

⁴ Research Center René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵ Laboratory of Immunopathology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, 31270-910 Belo Horizonte, MG, Brazil

⁶ Division of Infectious Diseases and Immunology, Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

⁷ Hospital Israelita Albert Einstein, Avenida Albert Einstein 627-701, 2 Subsolo Bloco A., 05651-901 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Luiz Vicente Rizzo; lvizzo@einstein.br and Edecio Cunha-Neto; edecunha@gmail.com

Received 17 April 2014; Accepted 16 June 2014; Published 9 July 2014

Academic Editor: Christophe Chevillard

Copyright © 2014 Lúcia Cristina Jamli Abel et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), is characterized by immunopathology driven by IFN- γ secreting Th1-like T cells. *T. cruzi* has a thick coat of mucin-like glycoproteins covering its surface, which plays an important role in parasite invasion and host immunomodulation. It has been extensively described that *T. cruzi* or its products—like GPI anchors isolated from GPI-anchored mucins from the trypomastigote life cycle stage (tGPI-mucins)—are potent inducers of proinflammatory responses (i.e., cytokines and NO production) by IFN- γ primed murine macrophages. However, little is known about whether *T. cruzi* or GPI-mucins exert a similar action in human cells. We therefore decided to further investigate the *in vitro* cytokine production profile from human mononuclear cells from uninfected donors exposed to *T. cruzi* as well as tGPI-mucins. We observed that both living *T. cruzi* trypomastigotes and tGPI-mucins are potent inducers of IL-12 by human peripheral blood monocytes and this effect depends on CD40-CD40L interaction and IFN- γ . Our findings suggest that the polarized T1-type cytokine profile seen in *T. cruzi* infected patients might be a long-term effect of IL-12 production induced by lifelong exposure to *T. cruzi* tGPI-mucins.

1. Introduction

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, which affects approximately 15 million people in South and Central America [1, 2]. It is estimated

that about 30% of infected individuals will develop severe chronic forms of the disease, especially the often fatal Chagas disease cardiomyopathy (CCC) [1–4]. Intracellular protozoan parasites are potent stimulators of innate and cell-mediated immunity. The induction of macrophage proinflammatory

cytokines by ligands of innate immunity receptors of *T. cruzi* is considered important in the control of infection and outcome of Chagas disease [5, 6]. It has been extensively described that glycosylphosphatidylinositol-anchored mucins-like glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes (tGPI-mucins) activate murine macrophages *in vitro* to produce the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin- (IL-) 12 as well as nitric oxide (NO) [7, 8]. The bulk of evidence establishes that IL-12 and IL-12 driven Th1 cytokines, the ones involved in delayed-type hypersensitivity, are induced during acute infection with *T. cruzi* in mice, playing an obligatory role in parasite clearance and host survival [9–12]. *T. cruzi* tGPI-mucins were shown to initiate the inflammatory response through an activation of Toll-like receptors TLR2 [7, 13]. Different components from this parasite are capable of activating TLRs in dendritic cells and macrophages, like the unmethylated CpG motifs present in *T. cruzi* genome, were identified as a TLR9 agonist [14]. *T. cruzi* chronically infected Chagas disease patients display a Th1 cytokine profile [15] which is even more pronounced among CCC patients [16, 17]. It has been described that certain infectious agents, like *Mycobacterium tuberculosis*, possess molecules stimulating innate immunity that can shift the systemic cytokine environment and modify clinical immune profiles [18]. Our group and others have previously reported that heart-infiltrating T cells predominantly produce IFN- γ and TNF- α , suggesting that such Th1 T cells play an important pathogenetic role in heart tissue damage in CCC [16, 19–22]. Even though acute *T. cruzi* infection induces IL-12 production in mice, little is known about whether *T. cruzi* or tGPI-mucins exert a similar action in humans. We have previously described the isolation of live *T. cruzi* trypomastigotes outgrowing from a heart biopsy fragment from a CCC patient [23], routinely cultured for the study of outgrowing heart-infiltrating T cells [16, 24]. In order to study whether *T. cruzi* and tGPI-mucins could directly induce the production of the Th1-inducing cytokine IL-12 in human cells, we studied the cytokine profile in naturally infected supernatants of heart-infiltrating mononuclear cells. We also assessed the effect of cocultivation of *T. cruzi* and tGPI-mucins with peripheral blood mononuclear cells and purified monocytes on IL-12 production. Finally, we assessed the role of IFN- γ and CD40L signaling on *T. cruzi* and tGPI mucin-induced IL-12 production.

2. Methods

2.1. Parasites. The Y strain of *T. cruzi* was maintained in fibroblast cultures and was used as parasite source for purification of tGPI-mucins. For the trypomastigote culture, L-929 fibroblasts were initially infected with blood trypomastigotes in a ratio of one parasite per cell. The tissue culture trypomastigotes were continuously passed in L-929 fibroblast cultures. The infected cultures were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% fetal calf serum (FCS) at 33°C in 5% CO₂. After 4 or 5 days of culture, the parasites were collected daily and centrifuged at 40 g at 4°C for 10 min for cellular debris separation, followed by

another centrifugation at 700 g at 4°C for 10 min. The resulting pellet containing live trypomastigotes was used to purify GPI-mucins.

2.2. Purification of tGPI-Mucins. The GPI-mucins were isolated from *T. cruzi* trypomastigotes as described previously [7, 8] using sequential organic extraction followed by hydrophobic-interaction chromatography in an Octyl-Sepharose column (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and elution with a propan-1-ol gradient (5–60%).

2.3. Heart-Infiltrating T Cell Lines. T cell lines were established from endomyocardial biopsy explants from CCC patients as described [16]. Briefly, biopsy tissue was minced and seeded on to 96-well flat bottom plates in the presence of IL-2 and irradiated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) until lymphoblast outgrowth was observed; T cell lines were expanded by restimulation every two weeks with 5 μ g phytohemagglutinin (PHA) and irradiated PBMC. PBMC were obtained from blood of healthy donors and separated by density gradient centrifugation with Ficoll-Hypaque^R. All cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, MEM's nonessential amino acids and MEM's vitamins (all from GIBCO, Grand Island, NY, USA), 50 μ g/mL gentamicin, 10 mM HEPES buffer, and 10% normal human serum (complete medium). This protocol has been approved by the Institutional Review Board of the University of São Paulo School of Medicine and all subjects provided informed consent.

2.4. *T. cruzi* Coculture/GPI Treatment. Ten to 12 days after the last PHA stimulation, heart-infiltrating T cell lines (from four different individuals, in separate experiments) were stimulated in the presence of irradiated PBMC (5×10^5 /well) plus 5 μ g/mL PHA and supernatants were obtained after 48 h incubation. In another set of experiments, culture conditions included variable components: irradiated PBMC, heart-infiltrating T cell lines (from four different individuals), 5 μ g/mL PHA, 5×10^4 Y strain *T. cruzi* trypomastigotes obtained from LLC-MK2 monolayer cell culture, or 10 pmol/mL of *T. cruzi* tGPI-mucins. Blocking/neutralizing monoclonal antibodies against CD28, CD40, and IFN- γ (Pharmingen, La Jolla, CA) were employed in selected experiments.

2.5. Human Monocytes. Human monocytes were obtained by leukapheresis of normal volunteers at the blood bank of National Institutes of Health (Bethesda, MD). After density sedimentation of the mononuclear cells with lymphocyte separation medium (Organon, Teknika, Durham, NC), the monocytes were purified by counterflow centrifugal elutriation, as described previously [25], except that pyrogen-free PBS was used in the elutriation procedure. Monocytes were enriched >90% as determined by morphology, non-specific esterase staining, and flow cytometry. The purification procedure did not activate the monocytes, as shown by the fact that, after overnight incubation at 37°C in suspension, 4% of

FIGURE 1: *T. cruzi* trypanomastigotes outgrowth from endomyocardial biopsies from CCC patients induces the production of T1-type cytokine profile.

the cells were IL-12R positive or spontaneously secreted any of the cytokines measured. After purification, monocytes were left at 4°C overnight and then transferred to 5 mL polystyrene Falcon tubes (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) and cultured for 24 h in the presence or absence of 10 pmol/mL tGPI-mucins, in the presence or absence of 100 units/mL of human IFN-γ (Genetech), as indicated. Culture supernatants were collected 48 h after stimulation for IL-12 determination.

2.6. Cytokine Measurements. Cytokines IFN-γ, IL-4, IL-2, IL-10, IL-12, and TNF-α were measured by double sandwich ELISA using the anti-human cytokine antibody pairs (R&D Systems, Minneapolis).

3. Statistical Analysis

Groups were compared by a nonparametrical test (Mann-Whitney Rank Sum Test) with GraphPad InStat software (version 5.0; GraphPad). Results were expressed as medians and interquartile ranges. *P* values were considered significant if <0.05.

4. Results

4.1. *T. cruzi* Outgrowth from Endomyocardial Biopsies from CCC Patients Induces the Production of T1-Type Cytokine Profile. We routinely cultured T cell lines from endomyocardial biopsies from CCC patients for the isolation of T cell lines. In one of these biopsy explants, highly motile *T. cruzi* trypanomastigotes were observed in some of the seeded wells, indicating that the tissue fragments in those wells probably contained a *T. cruzi* pseudocyst. We therefore compared PHA-stimulated cytokine production in the supernatant from the T cell line established from wells containing live *T. cruzi* parasites (with *T. cruzi* trypanomastigote growth) with the cell line derived from wells of the same biopsy devoid of *T. cruzi* (no *T. cruzi* trypanomastigote growth). Figures 1(a) and 1(b) depict the cytokine profile of the T cell line obtained from the *T. cruzi*-positive wells as compared to the T cell line

FIGURE 2: *T. cruzi*-induced IL-12 production is potentiated by activated T cells. Results come from 4 distinct experiments. Groups were compared by a nonparametrical test (Mann-Whitney Rank Sum Test) with GraphPad InStat software (version 5.0; GraphPad). Results were expressed as medians and interquartile ranges. *P* values were considered significant if <0.05.

of the same sample, obtained from wells where no *T. cruzi* trypanomastigotes were observed. As can be seen, *T. cruzi* trypanomastigotes outgrowth induced the production of IL-12, TNF-α, and IFN-γ, with undetectable levels of IL4. The presence of *T. cruzi* strongly reduced the levels of IL-2 and mildly reduced IL-10 levels.

4.2. *T. cruzi* Trypanomastigotes Induce IL-12 Production by Human PBMC, Which Is Potentiated by Activated T Cells. To further investigate the phenomenon observed in the endomyocardial biopsies wells we assayed cytokine production in supernatants of human PBMC in the presence of living *T. cruzi* and/or PHA-activated T cells. As shown in Figure 2, *T.*

FIGURE 3: tGPI-mucins from *T. cruzi* induce IL-12 production by human monocytes. Results come from 3 distinct experiments. Groups were compared by a nonparametrical test (Mann-Whitney Rank Sum Test) with GraphPad InStat software (version 5.0; GraphPad). Results were expressed as medians and interquartile ranges. *P* values were considered significant if <0.05 .

cruzi trypomastigotes can induce moderate production of IL-12 directly on irradiated PBMC or in cocultures of PBMC and T cells. However, coculture with PHA-activated T cell lines induced a 10- to 100-fold increase in IL-12 production by irradiated PBMC.

4.3. GPI-Mucins from *T. cruzi* Trypomastigotes Induce IL-12 Production by Human Monocytes. We also tested if purified tGPI-mucins could activate isolated PBMC-derived monocytes *in vitro* to produce IL-12. As shown in Figure 3, tGPI-mucins induce significant production of IL-12 by human monocytes, which is further potentiated after IFN γ priming of cells.

4.4. Induction of IL-12 Production by *T. cruzi* or tGPI-Mucins Is Dependent on IFN- γ and CD40-CD40L Interactions. In an attempt to study the mechanisms underlying *T. cruzi*-induced potentiation of IL-12 production by human monocytes, we cocultured these cells with PHA-activated T cell lines, 5×10^4 *T. cruzi* Y strain living trypomastigotes, or tGPI-mucins and added neutralizing/blocking antibodies to human IFN- γ , CD40, and CD28. Results indicated that blocking IFN- γ or CD40 individually caused approximately 50% and 35% of inhibition of IL-12 production, respectively, while anti-CD28 showed negligible inhibition. The combined effect of the three antibodies induced 85% of inhibition, suggesting that most of the IL-12-inducing effects of PHA-activated T cell lines are due to IFN- γ production and CD40-CD40L interactions (Figure 4(a)). Similar results were obtained when tGPI mucin was used as stimulus (Figure 4(b)) suggesting that these molecules may be the effectors in the *T. cruzi*-induced IL-12 production in humans, as has been previously described in mice [8].

5. Discussion

In this paper, we observed that both living trypomastigotes and tGPI-mucins are potent inducers of IL-12 production in human monocytes and that this effect depends on CD40-CD40L interaction and IFN- γ signaling. The finding that spontaneous outgrowth of parasites in culture cells derived from chronically infected myocardium induced the production of T1-type proinflammatory cytokines, like IL-12, TNF α , and IFN γ , is in accordance with data from murine models from other studies [26–30]. These cytokines, which are induced during acute infection with *T. cruzi* in mice, play an obligatory role in parasite clearance and host survival [26, 29]. However, the same immunological pattern may participate in mechanisms of tissue damage in Chagas disease, indicating that protective and pathological responses must share important characteristics in this context [31]. When parasites were deliberately added to cocultures of irradiated PBMC and activated T cell lines, we observed again high levels of IL-12 expression in PBMC, although the *T. cruzi* stimulus itself was capable of inducing some IL-12 expression by PBMC in the absence of activated T cells. This corroborates the findings obtained with cultures with spontaneous outgrowth of *T. cruzi* trypomastigotes, where we had PHA-activated cell lines and *T. cruzi* trypomastigotes. Our results indicate that PBMC-derived monocytes are the cell population responding to tGPI-mucins with *in vitro* IL-12 production. Although we already observed induction of IL-12 production by monocytes using tGPI-mucins as a first signal (microbial stimulus via TLR-2), maximal levels of IL-12 are reached only after a second signal through the presence of IFN- γ , as it has been reported by other studies [32, 33]. The alkylacylglycerolipid component of tGPI-mucins [7] is capable of triggering Toll-like receptors-2 at subnanomolar concentrations [13]. Moreover, macrophages derived from Tlr2 $^{-/-}$ or Myd88 $^{-/-}$ mice are less responsive to tGPI-mucins, further confirming the possible role of the TLR pathway in this process [34]. Our findings that anti-IFN- γ and anti-CD40L neutralizing antibodies were able to significantly reduce IL-12 production indicate this phenomenon is mediated by IFN- γ and CD40-CD40L interactions. This can be explained by the fact that, in this context, T cells are likely to be the major source of IFN- γ and membrane CD40L, activators of macrophages involved in many aspects of parasite control [11, 35]. As previously described by Chaussabel et al. CD40 ligation in *T. cruzi*-infected mice has a protective effect because it is related to upregulation of IL-12 as well as NO by a direct stimulation of INF- γ activated macrophages [36]. Previous studies also showed that the CD40-CD40L signaling pathway mediated protective effect with other pathogens such as *Leishmania* [37], *Schistosoma mansoni* [38], *Cryptococcus neoformans* [39], *Cryptosporidium parvum* [40], and *Pneumocystis carinii* [41]. The enhanced production of IFN- γ , TNF- α , and nitric oxide associated with CD40/CD40L signaling is thought to be responsible for this protective effect. It was shown that IFN γ stimulus also upregulates the transcription factor T-bet [42], which in turn maintains IL-12R β chain expression [43], possibly resulting in a positive feedback loop that, consequently, keeps the shift towards a Th1 response in Chagas

FIGURE 4: Potentiation of IL-12 production induced by (a) live *T. cruzi* trypomastigotes or (b) tGPI-mucins is dependent on IFN- γ and CD40. Irradiated PBMC were incubated with T cell lines, PHA (5 μ g/mL), and different blocking antibodies (anti-IFN- γ , anti-CD40, anti-CD28, and anti-IFN/CD40/CD28). Results come from 4 distinct experiments. Groups were compared by a nonparametrical test (Mann-Whitney Rank Sum Test) with GraphPad InStat software (version 5.0; GraphPad). Results were expressed as medians and interquartile ranges. *P* values were considered significant if <0.05 . Significance bars are shown in comparison with trypo + PHA or tGPI-mucin + PHA.

disease. In summary, our data suggest that the T1-type cytokine profile found in the peripheral blood and among heart-infiltrating T cells is related to previous or ongoing encounters with IL-12 generated as a response to *T. cruzi* GPI-anchored mucin-like glycoproteins.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Lúcia Cristina Jamli Abel and Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira are equally contributing authors.

Acknowledgments

This work has been supported by grants of the Brazilian National Research Council (CNPq), São Paulo State Foundation for Scientific Research (FAPESP), National Institute of Allergy and Infectious Disease (Grant no. IP50AI098461-01), and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas (INCT/Vacinas). LRPf is recipient of a CNPq fellowship; ICN and MAB are recipients of a FAPESP fellowship. LVR, ECN, and JK are recipients of Brazilian Council for Scientific and Technological Development-CNPq productivity award. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the paper.

References

- [1] P. J. Hotez, E. Dumonteil, L. Woc-Colburn et al., "Chagas disease: 'the new HIV/AIDS of the Americas,'" *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 5, Article ID e1498, 2012.
- [2] A. Rassi Jr. and J. Marcondes de Rezende, "American trypanosomiasis (Chagas disease)," *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 26, no. 2, pp. 275–291, 2012.
- [3] F. S. Machado, L. A. Jelicks, L. V. Kirchhoff et al., "Chagas heart disease: report on recent developments," *Cardiology in Review*, vol. 20, no. 2, pp. 53–65, 2012.
- [4] A. M. Bilate and E. Cunha-Neto, "Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 50, no. 2, pp. 67–74, 2008.
- [5] R. T. Gazzinelli and E. Y. Denkers, "Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism," *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, no. 12, pp. 835–906, 2006.
- [6] D. Golgher and R. T. Gazzinelli, "Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease," *Autoimmunity*, vol. 37, no. 5, pp. 399–409, 2004.
- [7] I. C. Almeida, M. M. Camargo, D. O. Procopio et al., "Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents," *The EMBO Journal*, vol. 19, no. 7, pp. 1476–1485, 2000.
- [8] M. M. Camargo, I. C. Almeida, M. E. Pereira, M. A. Ferguson, L. R. Travassos, and R. T. Gazzinelli, "Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages," *The Journal of Immunology*, vol. 158, no. 12, pp. 5890–5901, 1997.
- [9] D. F. Hoft and C. S. Eickhoff, "Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally

- invasive, intracellular pathogen," *Infection and Immunity*, vol. 73, no. 8, pp. 4934–4940, 2005.
- [10] S. E. Graefe, "Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice," *Microbes and Infection*, vol. 5, no. 10, pp. 833–839, 2003.
 - [11] V. Michailowsky, N. M. Silva, C. D. Rocha, L. Q. Vieira, J. Lannes-Vieira, and R. T. Gazzinelli, "Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection," *American Journal of Pathology*, vol. 159, no. 5, pp. 1723–1733, 2001.
 - [12] A. Talvani, C. S. Ribeiro, J. C. Aliberti et al., "Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*," *Microbes and Infection*, vol. 2, no. 8, pp. 851–866, 2000.
 - [13] M. A. Campos, I. C. Almeida, O. Takeuchi et al., "Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite," *The Journal of Immunology*, vol. 167, no. 1, pp. 416–423, 2001.
 - [14] H. D. Gravina, L. Antonelli, R. T. Gazzinelli, and C. Repert, "Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, Article ID e63100, 2013.
 - [15] M. Ribeiro, V. L. Pereira-Chioccola, L. Rénia, A. Augusto Fragata Filho, S. Schenkman, and M. M. Rodrigues, "Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase," *Parasite Immunology*, vol. 22, no. 1, pp. 49–53, 2000.
 - [16] L. C. Abel, "Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection," *Journal of Autoimmunity*, vol. 17, no. 1, pp. 99–107, 2001.
 - [17] J. A. Gomes, L. M. Bahia-Oliveira, M. O. Rocha, O. A. Martins-Filho, G. Gazzinelli, and R. Correa-Oliveira, "Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 3, pp. 1185–1193, 2003.
 - [18] T. Shirakawa, T. Enomoto, S. Shimazu, and J. M. Hopkin, "The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder," *Science*, vol. 275, no. 5296, pp. 77–79, 1997.
 - [19] D. D. Reis, E. M. Jones, and S. Tostes Jr., "Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 48, no. 5, pp. 637–644, 1993.
 - [20] M. M. Reis, L. Higuchi Mde, L. A. Benvenuti et al., "An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens," *Clinical Immunology and Immunopathology*, vol. 83, no. 2, pp. 165–172, 1997.
 - [21] D. B. R. Rodrigues, M. A. dos Reis, A. Romano et al., "In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, Article ID 361730, 7 pages, 2012.
 - [22] E. Cunha-Neto, V. J. Dzau, P. D. Allen et al., "Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy," *American Journal of Pathology*, vol. 167, no. 2, pp. 305–313, 2005.
 - [23] M. M. Teixeira, F. M. da Silva, A. Marcili et al., "Short communication: trypanosoma cruzi lineage I in endomyocardial biopsy from a north-eastern Brazilian patient at end-stage chronic Chagasic cardiomyopathy," *Tropical Medicine & International Health*, vol. 11, no. 3, pp. 294–298, 2006.
 - [24] E. Cunha-Neto, V. Coelho, L. Guilherme, A. Fiorelli, N. Stolf, and J. Kalil, "Autoimmunity in Chagas disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 98, no. 8, pp. 1709–1712, 1996.
 - [25] P. Nguyễn, M. Broussas, P. Cornillet-Lefebvre, and G. Potron, "Coexpression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes purified by leukapheresis and elutriation. Response of nonadherent cells to lipopolysaccharide," *Transfusion*, vol. 39, no. 9, pp. 975–982, 1999.
 - [26] J. C. Aliberti, M. A. Cardoso, G. A. Martins et al., "Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes," *Infection and Immunity*, vol. 64, no. 6, pp. 1961–1967, 1996.
 - [27] S. Frosch, S. Kraus, and B. Fleischer, "*Trypanosoma cruzi* is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages," *Medical Microbiology and Immunology*, vol. 185, no. 3, pp. 189–193, 1996.
 - [28] F. Torrico, H. Heremans, M. T. Rivera, E. van Marck, A. Billiau, and Y. Carlier, "Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice," *The Journal of Immunology*, vol. 146, no. 10, pp. 3626–3632, 1991.
 - [29] F. Cardillo, J. C. Voltarelli, S. G. Reed, and J. S. Silva, "Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by γ interferon and interleukin 10: role of NK cells," *Infection and Immunity*, vol. 64, no. 1, pp. 128–34, 1996.
 - [30] I. A. Abrahamsohn and R. L. Coffman, "*Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection," *Experimental Parasitology*, vol. 84, no. 2, pp. 231–244, 1996.
 - [31] E. Cunha-Neto, L. V. Rizzo, F. Albuquerque et al., "Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 31, no. 1, pp. 133–137, 1998.
 - [32] A. Snijders, P. Kalinski, C. M. Hilken, and M. L. Kapsenberg, "High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals," *International Immunology*, vol. 10, no. 11, pp. 1593–1598, 1998.
 - [33] O. Schulz, A. D. Edwards, M. Schito et al., "CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal," *Immunity*, vol. 13, no. 4, pp. 453–462, 2000.
 - [34] M. A. Campos, M. Closel, and E. P. Valente, "Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88," *Journal of Immunology*, vol. 172, no. 3, pp. 1711–1718, 2004.
 - [35] C. R. Marinho, L. N. Nuñez-Apaza, and K. R. Bortoluci, "Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease," *Microbes and Infection*, vol. 11, no. 13, pp. 1037–1045, 2009.
 - [36] D. Chaussabel, F. Jacobs, J. de Jonge et al., "CD40 ligation prevents *Trypanosoma cruzi* infection through interleukin-12 upregulation," *Infection and Immunity*, vol. 67, no. 4, pp. 1929–1934, 1999.

- [37] W. G. Ferlin, T. von der Weid, F. Cottrez, D. A. Ferrick, R. L. Coffman, and M. C. Howard, "The induction of a protective response in *Leishmania major*-infected BALB/c mice with anti-CD40 mAb," *European Journal of Immunology*, vol. 28, no. 2, pp. 525–531, 1998.
- [38] A. S. MacDonald, E. A. Patton, A. C. La Flamme et al., "Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction," *The Journal of Immunology*, vol. 168, no. 9, pp. 4643–4649, 2002.
- [39] G. H. Chen, J. J. Osterholzer, M. Y. Choe et al., "Dual roles of CD40 on microbial containment and the development of immunopathology in response to persistent fungal infection in the lung," *The American Journal of Pathology*, vol. 177, no. 5, pp. 2459–2471, 2010.
- [40] M. Cosyns, "Requirement of CD40-CD40 ligand interaction for elimination of *Cryptosporidium parvum* from mice," *Infection and Immunity*, vol. 66, no. 2, pp. 603–607, 1998.
- [41] J. A. Wiley and A. G. Harmsen, "CD40 ligand is required for resolution of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice," *Journal of Immunology*, vol. 155, no. 7, pp. 3525–3529, 1995.
- [42] A. A. Lighvani, D. M. Frucht, D. Jankovic et al., "T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 26, pp. 15137–15142, 2001.
- [43] M. Afkarian, J. R. Sedy, J. Yang et al., "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 6, pp. 549–557, 2002.

8. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388-402.
2. Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwire BS, Drew ME, Satoskar AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell Mol Life Sci*. 2013.
3. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2012;34(6):753-70.
4. Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J, et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(2):e953.
5. OMS. Chagas Disease (American trypanosomiasis) fact sheet nº 340: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>; 2013 [cited 2014 22/01].
6. Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*. 2013.
7. OMS. Sixty-Third World Health Assembly. Provisional Agenda item 11.14. Chagas disease: Control and elimination: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-en.pdf. Acesso realizado em 23/01/2014; 2010 [cited 2014 23/01].
8. OMS. Chagas Disease (American trypanosomiasis): http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html; 2014 [cited 2014 11/02].
9. Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL, Cardiology CoCDotIso. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(9):767-76.

10. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e29.
11. Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgrad Med J*. 2006;82(974):788-98.
12. Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(3):287-92.
13. Marinho CR, D'Império Lima MR, Grisotto MG, Alvarez JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun*. 1999;67(1):308-18.
14. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*. 2002;18(6):262-5.
15. Arnaiz MR, Fichera LE, Postan M. Cardiac myocyte hypertrophy and proliferating cell nuclear antigen expression in Wistar rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*. 2002;88(5):919-25.
16. Petersen CA, Burleigh BA. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infect Immun*. 2003;71(8):4441-7.
17. Chandrasekar B, Melby PC, Pennica D, Freeman GL. Overexpression of cardiotrophin-1 and gp130 during experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Immunol Lett*. 1998;61(2-3):89-95.
18. Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA, Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT, et al. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(3):238-46.
19. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuto L, Higuchi ML, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 2005;167(2):305-13.
20. Petersen CA, Krumholz KA, Burleigh BA. Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1beta-dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2005;73(10):6974-80.

21. Garg N, Popov VL, Papaconstantinou J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1638(2):106-20.
22. Manque PA, Probst CM, Probst C, Pereira MC, Rampazzo RC, Ozaki LS, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. *Infect Immun*. 2011;79(5):1855-62.
23. Bilate AM, Teixeira PC, Ribeiro SP, Brito T, Silva AM, Russo M, et al. Distinct outcomes of *Trypanosoma cruzi* infection in hamsters are related to myocardial parasitism, cytokine/chemokine gene expression, and protein expression profile. *J Infect Dis*. 2008;198(4):614-23.
24. Mukherjee S, Nagajyothi F, Mukhopadhyay A, Machado FS, Belbin TJ, Campos de Carvalho A, et al. Alterations in myocardial gene expression associated with experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Genomics*. 2008;91(5):423-32.
25. Gutierrez FR, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, et al. 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(10):1468-76.
26. Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(2 Suppl 3):1-48.
27. OMS. Control of Chagas' Disease: Second Report of the WHO Expert Committee. Geneva, Suíça: Technical Report Series 905; 2002.
28. Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc*. 2001;73(4):547-59.
29. Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac

myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3541-5.

30. Fonseca SG, Moins-Teisserenc H, Clave E, Ianni B, Nunes VL, Mady C, et al. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Microbes Infect*. 2005;7(4):688-97.

31. Bilate AM, Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50(2):67-74.

32. Bestetti RB, Muccillo G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 1997;60(2):187-93.

33. Ayub-Ferreira SM, Mangini S, Issa VS, Cruz FD, Bacal F, Guimarães GV, et al. Mode of death on Chagas heart disease: comparison with other etiologies. a subanalysis of the REMADHE prospective trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(4):e2176.

34. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:252-8.

35. Soares MB, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, de Carvalho AC, et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol*. 2004;164(2):441-7.

36. Goldenberg RC, Jelicks LA, Fortes FS, Weiss LM, Rocha LL, Zhao D, et al. Bone marrow cell therapy ameliorates and reverses chagasic cardiomyopathy in a mouse model. *J Infect Dis*. 2008;197(4):544-7.

37. Eickhoff CS, Lawrence CT, Sagartz JE, Bryant LA, Labovitz AJ, Gala SS, et al. ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. *J Parasitol*. 2010;96(4):758-64.

38. Santos FM, Lima WG, Gravel AS, Martins TA, Talvani A, Torres RM, et al. Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(8):1987-95.

39. Teixeira AR, Figueiredo F, Rezende Filho J, Macêdo V. Chagas' disease: a clinical, parasitological, immunological, and pathological study in rabbits. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(2):258-72.
40. Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Silva AM, Umezawa ES, et al. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbes Infect.* 2003;5(12):1116-24.
41. Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli MaC, Vinagre NF, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002645.
42. Frith MC, Pheasant M, Mattick JS. The amazing complexity of the human transcriptome. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(8):894-7.
43. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853-8.
44. Heimberg AM, Sempere LF, Moy VN, Donoghue PC, Peterson KJ. MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2946-50.
45. Kosik KS. MicroRNAs tell an evo-devo story. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(10):754-9.
46. Abdellatif M. Differential expression of microRNAs in different disease states. *Circ Res.* 2012;110(4):638-50.
47. Quintero-Ronderos P, Montoya-Ortiz G. Epigenetics and autoimmune diseases. *Autoimmune Dis.* 2012;2012:593720.
48. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature.* 2012;482(7385):347-55.
49. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
50. Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. The role of microRNAs in cancer. *Yale J Biol Med.* 2006;79(3-4):131-40.

51. Sotiropoulou G, Pampalakis G, Lianidou E, Mourelatos Z. Emerging roles of microRNAs as molecular switches in the integrated circuit of the cancer cell. *RNA*. 2009;15(8):1443-61.
52. Costa A, Osório C, Dias S. MicroRNA expression profiling in bone marrow: implications in hematological malignancies. *Biotechnol J*. 2009;4(1):88-97.
53. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.
54. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):597-610.
55. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*. 2011;12(2):99-110.
56. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
57. Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, et al. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res*. 2012;110(11):1465-73.
58. Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(6):2111-6.
59. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007;316(5824):575-9.
60. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(9):2772-86.
61. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2007;100(3):416-24.
62. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2007;13(5):613-8.

63. Gong AY, Hu G, Zhou R, Liu J, Feng Y, Soukup GA, et al. MicroRNA-221 controls expression of intercellular adhesion molecule-1 in epithelial cells in response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Int J Parasitol*. 2011;41(3-4):397-403.
64. El-Assaad F, Hempel C, Combes V, Mitchell AJ, Ball HJ, Kurtzhals JA, et al. Differential microRNA expression in experimental cerebral and noncerebral malaria. *Infect Immun*. 2011;79(6):2379-84.
65. Delić D, Dkhil M, Al-Quraishy S, Wunderlich F. Hepatic miRNA expression reprogrammed by *Plasmodium chabaudi* malaria. *Parasitol Res*. 2011;108(5):1111-21.
66. LaMonte G, Philip N, Reardon J, Lacsina JR, Majoros W, Chapman L, et al. Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into *Plasmodium falciparum* inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. *Cell Host Microbe*. 2012;12(2):187-99.
67. Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M, Rainey AA, Pich D, McInnes IB, et al. Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production. *J Immunol*. 2012;189(8):3795-9.
68. Ghosh J, Bose M, Roy S, Bhattacharyya SN. *Leishmania donovani* targets *Dicer1* to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. *Cell Host Microbe*. 2013;13(3):277-88.
69. BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1962;4:389-96.
70. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):995-1001.
71. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
72. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:Article3.

73. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc.*; 1995. p. 289-300.
74. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*. 2010;50(4):237-43.
75. Bern C, Martin DL, Gilman RH. Acute and congenital Chagas disease. *Adv Parasitol*. 2011;75:19-47.
76. Marinho CR, Nuñez-Apaza LN, Bortoluci KR, Bombeiro AL, Bucci DZ, Grisotto MG, et al. Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. *Microbes Infect*. 2009;11(13):1037-45.
77. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(2):92-100.
78. Mady C, Ianni B. A cardiopatia da doença de Chagas. São Paulo: Ed. Roca; 2009.
79. Garzon S, Lorga A, Nicolau J. Eletrocardiografia na cardiopatia chagásica.: *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*; 1994. p. 133-43.
80. Lee CT, Risom T, Strauss WM. Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA Cell Biol*. 2007;26(4):209-18.
81. Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(6):419-29.
82. Ferreira LR, Frade AF, Santos RH, Teixeira PC, Baron MA, Navarro IC, et al. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a and miR-208b are dysregulated in Chronic Chagas disease Cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2014.
83. Haugaa KH, Bos JM, Borkenhagen E, Tarrell RF, Morlan BW, Caraballo PJ, et al. Impact of Left Ventricular Hypertrophy on QT Prolongation and Associated Mortality. *Heart Rhythm*. 2014.
84. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-6.

85. Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol Med*. 2013;5(7):949-66.
86. Mukherjee S, Machado FS, Huang H, Oz HS, Jelicks LA, Prado CM, et al. Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease. *PLoS One*. 2011;6(2):e16959.
87. Bauersachs J. miR-21: a central regulator of fibrosis not only in the broken heart. *Cardiovasc Res*. 2012;96(2):227-9; discussion 30-3.
88. Roy S, Khanna S, Hussain SR, Biswas S, Azad A, Rink C, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res*. 2009;82(1):21-9.
89. Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J Immunol*. 2009;182(8):4994-5002.
90. Lu TX, Hartner J, Lim EJ, Fabry V, Mingler MK, Cole ET, et al. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. *J Immunol*. 2011;187(6):3362-73.
91. Galvão Da Silva AP, Jacysyn JF, De Almeida Abrahamssohn I. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. *Immunology*. 2003;108(2):230-7.
92. Li R, Yan G, Zhang Q, Jiang Y, Sun H, Hu Y, et al. miR-145 inhibits isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy by targeting the expression and localization of GATA6. *FEBS Lett*. 2013;587(12):1754-61.
93. Charron F, Paradis P, Bronchain O, Nemer G, Nemer M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol*. 1999;19(6):4355-65.
94. Kang YJ. Cardiac hypertrophy: a risk factor for QT-prolongation and cardiac sudden death. *Toxicol Pathol*. 2006;34(1):58-66.

95. Santini P, Politi L, Vedova PD, Scandurra R, Scotto d'Abusco A. The inflammatory circuitry of miR-149 as a pathological mechanism in osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2013.
96. Sun Y, Varambally S, Maher CA, Cao Q, Chockley P, Toubai T, et al. Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. *Blood.* 2011;117(23):6172-83.
97. Sharma S, Liu J, Wei J, Yuan H, Zhang T, Bishopric NH. Repression of miR-142 by p300 and MAPK is required for survival signalling via gp130 during adaptive hypertrophy. *EMBO Mol Med.* 2012;4(7):617-32.
98. Ponce NE, Cano RC, Carrera-Silva EA, Lima AP, Gea S, Aoki MP. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. *Med Microbiol Immunol.* 2012;201(2):145-55.
99. Zheng Y, Cai X, Bradley JE. microRNAs in parasites and parasite infection. *RNA Biol.* 2013;10(3):371-9.
100. Busk PK, Hinrichsen R. Cyclin D in left ventricle hypertrophy. *Cell Cycle.* 2003;2(2):91-5.
101. Hotchkiss A, Robinson J, MacLean J, Feridooni T, Wafa K, Pasumarthi KB. Role of D-type cyclins in heart development and disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90(9):1197-207.
102. Bouzahzah B, Yurchenko V, Nagajyothi F, Hult J, Sadofsky M, Braunstein VL, et al. Regulation of host cell cyclin D1 by *Trypanosoma cruzi* in myoblasts. *Cell Cycle.* 2008;7(4):500-3.
103. Nagajyothi F, Desruisseaux M, Bouzahzah B, Weiss LM, Andrade DoS, Factor SM, et al. Cyclin and caveolin expression in an acute model of murine Chagasic myocarditis. *Cell Cycle.* 2006;5(1):107-12.
104. Starobinas N, Russo M, Minoprio P, Hontebeyrie-Joskowicz M. Is TNF alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Res Immunol.* 1991;142(2):117-22.
105. Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis D, et al. 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.

106. Javed Q, Murtaza I. Therapeutic potential of tumour necrosis factor-alpha antagonists in patients with chronic heart failure. *Heart Lung Circ*. 2013;22(5):323-7.

107. Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Bailly S, Feige JJ. The TGF- β pathway as an emerging target for Chagas disease therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(5):613-21.

108. Ming M, Ewen ME, Pereira ME. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*. 1995;82(2):287-96.

109. Waghbi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidas M, Feige JJ, Araújo-Jorge TC, et al. Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(11):4694-701.

110. Ferri N, Contini A, Bernini SK, Corsini A. Role of small GTPase protein Rac1 in cardiovascular diseases: development of new selective pharmacological inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;62(5):425-35.

111. Melo TG, Tucci AR, Nogueira AR, Meirelles MeN, Pereira MC. The involvement of FAK and Src in the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2014;139:49-57.

112. Cannella D, Brenier-Pinchart MP, Braun L, van Rooyen JM, Bougdour A, Bastien O, et al. miR-146a and miR-155 delineate a MicroRNA fingerprint associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain. *Cell Rep*. 2014;6(5):928-37.