Darlan da Silva Cândido

**Análise da biogênese de microRNAs na
cardiomiopatia chagásica crônica**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Ludmila Rodrigues
Pinto Ferreira

São Paulo

2017

Darlan da Silva Cândido

**Análise da biogênese de microRNAs na
cardiomiopatia chagásica crônica**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Ludmila Rodrigues
Pinto Ferreira

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cândido, Darlan da Silva

Análise da biogênese de microRNAs na cardiomiopatia chagásica crônica / Darlan da Silva Cândido. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira.

Descritores: 1.Cardiomiopatia chagásica 2.Doença de Chagas 3.MicroRNAs
4.Biogênese de microRNAs 5.Dicer1 proteína, humana 6.Fibrose 7.Estresse oxidativo
8.Aldeído desidrogenase

USP/FM/DBD-345/17

DEDICATÓRIA

“A Deus, ao universo, à minha família, aos meus amigos. A tudo aquilo que faz bem e te centra. À vida”.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Ludmila Ferreira, por te me recebido de braços abertos, por me proporcionar uma das experiências mais enriquecedoras da minha vida, por todo o crescimento científico e pessoal, por cuidar de mim diversas vezes e pela amizade verdadeira. Não poderia te agradecer o suficiente, Lud.

Ao meu co-orientador, Dr. Edecio Cunha-Neto, por acreditar em mim e abrir as portas de seu laboratório a fim de que eu pudesse desenvolver esse projeto encantador. Professor, obrigado de coração por apostar na minha capacidade e por me ensinar tanto.

À minha mãe, Vilma Alves, por ser minha mãe, amiga, minha fã número um e por sempre acreditar em mim e me apoiar. Mesmo que isso signifique estar longe.

À Ligia Akemi e o Dr. Julio Ferreira, por todo o companheirismo e ajuda em contar essa história tão bonita. Em especial a Lígia, por todos os milhares de *westerns*, testes de atividade, risadas constantes, lanches do fisgado, *cookies* da física e pela amizade sincera.

À Andréia Kuramoto (Déia), Victor Debbas e Patrícia Nolasco por toda ajuda com os intermináveis *westerns* para proteínas da biogênese. Em especial a Déia por ser o principal apoio em nosso laboratório e responder pacientemente as minhas centenas de perguntas diárias. Muito obrigado, Déia!

À minha amiga Amanda Cabral, não só pelo apoio na realização deste trabalho, mas por me manter no centro, por dividir as tristezas e as alegrias, por me ensinar a conviver, respeitar e amar ao próximo do jeito que ele é. Essa jornada nem de longe teria sido a mesma sem você, Mands. Sou grato a Deus por ter colocado você no meu caminho. OBS.: Chama minha mãe!

Ao Vagner Carvalho, por ser muito mais que um colega de trabalho, mas um amigo que eu levarei para vida. Obrigado pelas discussões científicas, pelos chás da tarde, pelos almoços no japa, pelas lições sobre trabalhos manuais e por ser esse poço sem fundo de assuntos interessantes. Valeu, Manolo!

Aos membros da minha banca de qualificação, Dra. Bárbara Ianni, Dr. Emmanuel Dias Neto e a Dra. Juliana Monte Real, por trazerem discussões tão enriquecedoras e ajudarem a conceber este trabalho. Em especial a Dra. Juliana pela ajuda técnica e pela convivência sempre tão agradável.

Aos Dr. Frederico Ferreira e Helder Nakaya pelas diversas análises estatísticas, bioinformática e pelas sugestões presentes neste trabalho.

À equipe de transplante do InCor, a Monique Baron e Priscila Camillo Teixeira pelo trabalho árduo de coletar as amostras utilizadas neste trabalho.

Aos companheiros de grupo Ramendra Patty, Marilda Savóia, Almir e Ricardo Zaniratto pelo companheirismo, discussões científicas, apoio e pelos *happy hours*!

A todos os amigos e colaboradores do Laboratório de Imunologia do InCor (LIM 19) pela convivência diária, sorrisos, por todo o crescimento e ajuda. Em especial, a Fernanda Magalhães por sempre trazer felicidade aos meus dias e por ser um exemplo tão bonito de acolhimento. Também, aos amigos do Laboratório de Biologia Vascular, principalmente Tiffany, Percília e Carol por me acolherem em seu convívio fora do laboratório. OBS: Tiff tem os melhores abraços!

Às equipes dos Laboratórios de Integração de Sistemas Biológicos (LISB), Laboratório de Biologia Vascular, Laboratório de Patologia Pulmonar e do Hospital Sírio Libanês por todo o apoio técnico prestado na realização de experimentos.

À professora Dra. Maria de Fátima Oliveira, minha orientadora da graduação em farmácia, por me ensinar muito do que sei e por sempre me apoiar em tudo. Muito obrigado por sempre cuidar de mim.

Ao Dr. Jorge Kalil por todo o apoio a minha jornada, por me receber em seu laboratório e por enriquecer meu trabalho durante a sua disciplina.

À equipe do programa de pós-graduação, Eleni Arruda e Dr. Éspér Georges Kallás, pela prestatividade e resolutividade.

A todos os meus amigos por me darem total apoio na minha jornada, por serem minha família longe de casa, por me darem tanto amor e por serem meus terapeutas voluntários.

A São Paulo, por ser essa dualidade, por me ensinar tanto das formas mais difíceis, por ser o lugar onde eu me perdi para me encontrar. Pelo autoconhecimento e por ver o mundo pela primeira vez. Gratidão eterna à Selva de Pedra.

A Deus, por ser, por existir, por aprender, por mudar, por crescer. Pela vida, pois não há nada mais bonito que viver!

*"It takes courage...to endure the sharp pains
of self-discovery rather than choose to take
the dull pain of unconsciousness that would
last the rest of our lives."*

Marianne Williamson

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras e Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Doença de Chagas.....	19
1.2 Fisiopatologia, tratamento e biomarcadores para a CCC.....	21
1.3 MicroRNAs na CCC.....	25
1.4 Biogênese de miRNAs	29
1.5 Pontos regulatórios da biogênese de miRNAs	33
1.6 Por que estudar a biogênese de miRNAs no miocárdio de pacientes com CCC?.....	35
2 HIPÓTESE	0
3 OBJETIVOS	40
4 METODOLOGIA.....	42
4.1 Delineamento experimental.....	43
4.2 Amostras de miocárdio humano.....	44
4.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR)	46
4.3.1 Extração de RNA.....	46
4.3.2 Quantificação e integridade do RNA.....	47
4.3.2 Transcrição Reversa	49
4.3.4 Eficiência de amplificação	50
4.3.5 Quantificação relativa por PCR em tempo real (qPCR).....	51
4.3.6 Análise da expressão de pré-miRNAs	53
4.4 qPCR array para perfil de miRNAs.....	54
4.5 Análise da expressão proteica	56
4.5.1 Extração Proteica	56
4.5.2 Quantificação Proteica	57

4.5.3 Análise da expressão de proteínas da maquinaria da biogênese de miRNAs por <i>Western Blot</i>	58
4.6 Análises de Bioinformática	59
4.7 Análises estatísticas	60
5 RESULTADOS	63
5.1 Caracterização das amostras	64
5.2. Quantificação relativa da expressão de myomiRs maduros	65
5.2 Quantificação relativa da expressão dos miRNAs primários (pri-miRNAs) de myomiRs	67
5.3 Expressão dos precursores de miRNAs (pré-miRNAs) de myomiRs	69
5.4 Expressão relativa RNAm das miosinas cardíacas	70
5.5 Expressão relativa de proteínas relacionadas à biogênese de miRNAs ..	71
5.6 Perfil da expressão de miRNAs maduros	75
5.7 Análises de Bioinformática	80
6 DISCUSSÃO	83
6.1 Biogênese de microRNAs na CCC	85
6.1.1 O processamento nuclear de miRNAs não está alterado no miocárdio de pacientes com CCC	85
6.1.2 Comprometimento do processamento citoplasmático de miRNAs na CCC: expressão reduzida de Dicer1	88
6.2 Envolvimento dos miRNAs em disfunções associadas a CCC	93
6.3 Potencial mecanismo para redução dos níveis proteicos de Dicer1: papel do estresse oxidativo	99
6.4 Limitações e garantia da qualidade	106
7 CONCLUSÃO	109
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
10 REFERÊNCIAS	115
11 ANEXOS	133
ANEXO A- Aprovação pelo comitê de ética	134
ANEXO B- Dados clínicos referentes aos controles que tiveram amostras incluídas no estudo.	135
ANEXO C- Dados clínicos referentes aos pacientes CCC com amostras incluídas no estudo.	0

ANEXO D- Medicamentos em uso por pacientes com CCC	1
ANEXO E - Análise da qualidade das extrações e integridade do RNA.....	2
ANEXO F- Representação gráfica dos géis de eletroforese capilar das amostras utilizadas no estudo	0
ANEXO G – Eficiência dos primers para HPRT1 e hsa-miR-1 nas amostras do estudo.....	0
ANEXO I – Imagens dos Western blots para biogênese de miRNAs	2
ANEXO J – Resultado s preliminares para possível mecanismo da redução de Dicer1	3
ANEXO K – Atividades realizadas durante o mestrado.....	4
ANEXO L – Artigos Publicados durante o Mestrado.....	6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biogênese dos miRNAs.	32
Figura 2 - Fluoxograma representativo do delineamento experimental do estudo de avaliação da biogênese de miRNAs.....	44
Figura 3 - Representação gráfica da expressão relativa dos miR-1, 133b, 133a, 133a-5p, 208a, 208a-5p, 208b, 208b-5p, 499, 499-5p.	66
Figura 4: Representação gráfica da expressão relativa dos pri-miR-1, 133b, 133a1, 133a2, 208a, 208b e499a.....	68
Figura 5 - Representação gráfica da expressão de pré-miRNA-1 em pacientes com CCC e controles	69
Figura 6 – Representação gráfica da expressão de mRNA das miosinas cardíacas em pacientes com CCC e Controles.....	70
Figura 7 - Representação gráfica da expressão relativa (fold change), de proteínas na etapa nuclear da biogênese canônica de miRNAs.	72
Figura 8 - Representação gráfica da expressão relativa (<i>fold change</i>) de proteínas na etapa citoplasmática da biogênese canônica de miRNAs	74
Figura 9 - Representação gráfica da biogênese de microRNAs na CCC	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de primers utilizados nos ensaios individuais de qPCR para mRNA de proteínas da biogênese de miRNAs.	52
Tabela 2 - Relação de primers utilizados nos ensaios individuais de qPCR para análise de pri-miRNAs de myomiRs.....	52
Tabela 3 - Relação de primers utilizados nos ensaios individuais de qPCR para análise de myomiRs maduros	53
Tabela 4 - Relação de anticorpos utilizados no método de western blot para análise da expressão relativa de proteínas da biogênese de miRNAs.....	59
Tabela 5 - Médias de idade, fração de ejeção e composição quanto ao sexo para os grupos em estudo.....	64
Tabela 6 – Lista de miRNAs maduros diferencialmente expressos no miocárdio de pacientes com CCC quando comparados a amostras controle. A lista está alinhada em ordem decrescente de expressão relativa.....	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4-HNE	<i>4-hydroxynonenal</i>
AKT	Proteína kinase B
ALDH2	Aldeído desidrogenase 2
ANP	Peptídeo natriurético atrial
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
BSA	Albumina bovina sérica
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CCC	Cardiomiopatia Chagásica Crônica
CCND1	Ciclina D1 (Cyclin D1)
CD8+	<i>Lymphocyte cluster of differentiation 8 positive</i>
CDI	Cardiopatia Dilatada Idiopática
Cdk9	Ciclina dependente de quinase 9
cDNA	DNA complementar (complementary DNA)
CI	Cardiopatia Isquêmica
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4</i>
CXCL	<i>Chemokine (C - X - C motif) - ligand</i>
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano
DDVE	Dilatação diastólica do ventrículo esquerdo
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
ERK	<i>Extracellular signal - regulated kinase</i>
EROs	Espécie reativa de oxigênio
EXP5	Exportina 5
FASL	Fas ligante
GATA4	GATA binding protein 4
GDP	Guanosina difosfato
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3B</i>
GTP	Guanosina trifosfato
Hand2	<i>Heart and neural crest derivatives expressed 2</i>
HDAC1	Histona desacetilase 1
Igf1	Fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
KCNN4	<i>Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily N Member 4</i>
KCNJ2	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2</i>
KCNA4	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 4</i>
SCN2B	<i>Sodium channel subunit beta-2</i>

MDA	Malondialdeído
MEF2	<i>Myocyte enhanced factor 2</i>
miRs ou miRNAs	MicroRNAs
MYH6	<i>myosin, heavy polypeptide 6 (α)-myosin heavy chain)</i>
MYH7	<i>myosin, heavy polypeptide 7 (beta (β)-myosin heavy chain)</i>
MYOD1	<i>Myogenic differentiation 1</i>
myomiRs	MicroRNAs enriquecidos em músculo
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
PACT	Proteína ativadora de PKR
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PKR	Proteína kinase R
Pp3cb	Calcineurina
PRF1	Perforina 1
qPCR	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real time Polymerase chain reaction</i>
Ran-GTP	<i>Ras-related nuclear protein)</i>
RasGAP	Proteína ativadora da RASGTPase
Rheb	Homólogo da Ras enriquecido no cérebro
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RISC	<i>RNA - induced silence complex</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNUs	RNAs nucleolares
rRNA 18S	RNA ribossomal 18S
rRNA 28S	RNA ribossomal 28S
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMAD	Proteínas mediadoras de sinalização intracelular
Srf	<i>Serum response factor</i>
T. cruzi	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TGF-B	<i>Transforming growth factor Beta</i>
TIMP1/2	Inibidor de metalopeptidase 1 e 2
TLDA	<i>Taqman Low Density Array</i>
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
TRBP	<i>TAr RNA binding protein</i>
UNG	<i>Uracil-N-glicosilase</i>
UTR	Região não traduzida (Untranslated region)
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9

Cândido DS. Análise da biogênese de microRNAs na cardiomiopatia chagásica crônica [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) é a principal complicação decorrente da infecção pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Trata-se de uma cardiomiopatia dilatada, caracterizada por um intenso infiltrado inflamatório, fibrose, dilatação das câmaras cardíacas, hipertrofia de cardiomiócitos e anormalidades de condução. Sua fisiopatologia é complexa e ainda não se consegue explicar porque apenas 30% dos pacientes infectados desenvolvem essa complicação. Nesse contexto, nosso laboratório descreveu pela primeira vez uma redução na expressão de microRNAs (miRNAs) enriquecidos em músculo (*myomiRs*) no miocárdio de pacientes com CCC. Sabendo-se que disfunções na biogênese de miRNAs em modelos animais levam ao desenvolvimento de cardiomiopatia do tipo dilatada com redução da expressão de *myomiRs*, hipotetizou-se que a CCC em humanos estaria associada a um prejuízo na biogênese de miRNAs no miocárdio. Dessa forma, amostras de ventrículo esquerdo de miocárdio de pacientes com CCC (n=16) e controles não-cardiomiopatas (n=6) foram utilizadas para avaliar: 1) a expressão gênica e proteica da maquinaria da biogênese de miRNAs (Drosha, Exportina-5, RAN, Dicer1, TRBP, PACT e Argonauta2), por qPCR e *western blotting*, respectivamente; 2) a expressão do transcrito primário (pri-miRNA), precursor (pré-miRNA) e miRNA maduro de *myomiRs* (miR-1, -133a, -133b, -208a, -208b, e -499); 3) o perfil de miRNAs diferencialmente expressos em CCC utilizando *qPCR array*; e 4) a interação dos miRNAs diferencialmente expressos com disfunções características da CCC (fibrose, miocardite, arritmia e hipertrofia) por meio de análises de bioinformática. Nossos resultados apontam para uma não-alteração nas etapas nucleares da biogênese de miRNAs (transcrição, edição e transporte), já que não foram encontradas alterações na expressão de pri- e pré-miRNAs de *myomiRs*, bem como dos componentes protéicos da biogênese, Drosha, Exportina-5 e RAN. Entretanto, observou-se uma disfunção na segunda etapa de edição da biogênese, citoplasmática, caracterizada por uma redução de 2/3 nos níveis protéicos de Dicer1, a qual não foi acompanhada por uma redução na expressão de seu RNA mensageiro. Evidenciou-se ainda, uma redução na expressão de 97,5% dos miRNAs maduros diferencialmente expressos no miocárdio de pacientes com CCC, incluindo *myomiRs*. As análises *in silico* revelaram haver participação dos miRNAs diferencialmente expressos em disfunções associadas a CCC, com destaque para a fibrose miocárdica, nodo central da rede. Experimentos adicionais preliminares sugeriram o acúmulo de adutos de 4-hidroxi-2-nonenal, decorrente do estresse oxidativo e de uma menor atividade da enzima aldeído desidrogenase 2, como uma possível causa para as alterações encontradas. Este é o primeiro estudo a caracterizar a biogênese de microRNAs em uma cardiomiopatia. Além disso, demonstrou-se que uma redução global do perfil dos miRNAs maduros diferencialmente expressos, decorrente uma disfunção na enzima Dicer1, está associada a eventos patológicos característicos da CCC. Estes mecanismos apresentam relevância biológica e terapêutica, podendo ser possivelmente compartilhados com cardiomiopatias de outras etiologias.

Descritores: cardiomiopatia chagásica; doença de Chagas; microRNAs, biogênese de microRNAs; dicer1 proteína, humana; fibrose; estresse oxidativo; aldeído desidrogenase

Cândido DS. Analysis of microRNA biogenesis in chronic chagas disease cardiomyopathy [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC) is the most severe complication of the infection by the haemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. This dilated cardiomyopathy is characterized by an intense inflammatory infiltrate, fibrosis, dilation of cardiac chambers, cardiomyocyte hypertrophy and conduction abnormalities. Its pathophysiology is complex and why only 30% of patients experience this complication remains an open question. In this regard, our laboratory described for the first time a reduction in the expression of muscle-enriched microRNAs (*myomiRs*) in human CCC myocardium. Knowing that biogenesis dysfunction and *myomiR* reduced expression have been associated to the development of dilated cardiomyopathy in animal models, we hypothesized that an impairment of myocardial microRNA biogenesis would be associated to CCC. Hence, left ventricle tissue samples from CCC patients (16) and non-cardiomyopathy donors (6) were used to analyze: 1) mRNA and protein expression, by qPCR and *western blotting*, of canonical microRNA biogenesis machinery (Drosha, Exportin-5, RAN, Dicer1, TRBP, PACT, AGO2); 2) primary transcript (pri-miR), precursor (pre-miR) and mature microRNA expression of *myomiRs* (miR-1, -133a, -133b, -208a, -208b, e -499); 3) mature microRNA profile using *qPCR array*; and 4) the interaction between differentially expressed mature microRNAs and hallmark CCC dysfunctions (fibrosis, myocarditis, hypertrophy and arrhythmia) using bioinformatics tools. Our results point to a non-dysfunction of biogenesis nuclear steps (transcription, editing and transport), since expression of pri-, pre-microRNAs, Drosha, Exportin-5 and Ran are similar between CCC patients and controls. However, we observed an alteration in the cytoplasmic editing step, characterized by a 2/3 reduction in Dicer1 protein levels. In addition, a major downregulation of differentially expressed mature microRNAs (97,5%) was noticed. In silico analysis revealed an association between differentially expressed microRNAs and CCC hallmarks, particularly fibrosis, a central node in the network. Additional preliminary data suggest 4-hydroxi-2-nonenal myocardial accumulation, resulting from oxidative stress and aldehyde dehydrogenase 2 lower activity, as a possible cause for the alterations here described. This is the first study to conduct a comprehensive analysis of microRNA biogenesis machinery in a cardiomyopathy. Moreover, we have shown a major reduction in the expression of mature microRNAs, due to lower Dicer1 protein levels, to be associated to CCC hallmark dysfunctions. These mechanisms are biologically and therapeutically relevant, and may be shared with cardiomyopathies from different etiologies.

Descriptors: Chagas cardiomyopathy; Chagas disease; microRNAs; microRNA biogenesis; Dicer1 protein, human; fibrosis; oxidative stress; aldehyde dehydrogenase

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada por um protozoário hemoflagelado, o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que é transmitido ao hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos pertencentes a sete ordens diferentes) por um inseto vetor (hospedeiro invertebrado), hematófago da família *Reduviidae* (Ribeiro et al., 2015). Desde sua descoberta, por Carlos Chagas em 1909 até nos dias atuais, a doença de Chagas continua sendo um sério problema econômico e de saúde, com 8-10 milhões de infectados em 21 países da América latina, os quais são considerados endêmicos devido a incidência de transmissão pelos insetos vetores (Clayton, 2010; Petherick, 2010). No Brasil, estima-se que 1,9-4,6 milhões de indivíduos estejam infectados com *T. cruzi*, o que representa aproximadamente 1,0-2,4% da população do país (Dias et al., 2015). Esta doença pode também ser transmitida por transfusão de sangue, transplante de órgãos, via placentária e via oral e por isso atualmente, há incidência de casos de doença de Chagas em países não endêmicos como Estados Unidos, Canadá, países do oeste Europeu (ex. Espanha, França e Suíça) e mais recentemente na Oceania (Austrália e Nova Zelândia), devido ao crescente número de imigrantes latino-americanos e à ausência de diagnóstico para a doença nos bancos de sangue destes países (Coura; Vinas, 2010).

A infecção, uma vez adquirida, é de longa duração, com três estágios distintos: fases aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda normalmente é acompanhada de sintomas semelhantes à de uma gripe: estado febril que dura cerca de quatro a oito semanas e manifestações locais como o sinal de Romãna, que se trata de um edema bi palpebral unilateral ou o chagoma de

inoculação, dependendo do local de penetração do *T. cruzi*, conjuntivas ou pele respectivamente (Prata, 2001; Nunes et al., 2013). Apesar da inflamação aguda focal, o *T. cruzi* não se detém aí, cai na circulação, indo parasitar aleatoriamente em qualquer órgão, pois as formas tripomastigotas do *T. cruzi* são capazes de se ligar, e penetrar ativamente, *in vivo* e *in vitro*, numa grande variedade de células hospedeiras (Nagaiyothi et al., 2012). Na fase crônica, quando ocorre um declínio no parasitismo, os sobreviventes podem passar por um longo período assintomático (10 a 30 anos), denominado forma indeterminada, mas cerca de 30 a 40% dos pacientes assintomáticos evoluem para as formas sintomáticas crônicas da doença com aproximadamente 10% dos indivíduos apresentando a forma digestiva da doença (caracterizada por acometimento do trato gastrointestinal, como megacólon e megaesôfago) e os restantes desenvolvem a Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) (Cunha-neto; Chevillard, 2014).

Em 9 de Junho de 2006, o Brasil se tornou o primeiro país a receber o certificado de eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, entregue ao Ministério de Saúde Brasileiro pela Organização Pan Americana de Saúde. Este certificado é resultado dos esforços para o controle da transmissão pelo barbeiro no Brasil, o qual resultou na queda da incidência da infecção por *T. cruzi* entre crianças, apontando para uma transmissão acidental (Massad, 2008).

1.2 Fisiopatologia, tratamento e biomarcadores para a CCC

A CCC é a manifestação clínica mais importante da fase crônica da doença de Chagas. Se trata de uma cardiomiopatia inflamatória dilatada, manifestando-se por meio de anormalidades na condução do coração, podendo ser acompanhada por bloqueios parciais ou totais, arritmia, tromboembolismo e insuficiência cardíaca (Rodrigues-Zanella et al., 2015). A evolução da CCC é acompanhada de hipertrofia dos cardiomiócitos, com dilatação das câmaras cardíacas, miocardite difusa e fibrose. Alguns trabalhos demonstraram que a CCC possui um prognóstico pior do que outras etiologias não inflamatórias, como a cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) e cardiomiopatia isquêmica (CI) (Morilla; Romero, 2015). A patogênese da CCC não está completamente elucidada e ainda é alvo de controvérsia possuindo um curso clínico diverso sendo um desafio a identificação dos pacientes que estão sob o risco de morrer. Não existem tratamentos eficazes para a fase crônica da doença de Chagas. Duas drogas que foram introduzidas no final de 1960 têm sido indicadas no tratamento da doença, são elas: benzonidazol (Rochagan[®] e Radanil[®], Roche; *N*-benzil-2-nitroimidazol acetamida) e nifurtimox (Lampit[®], Bayer; 5-nitrofurano 3-metil-4-5'-nitrofurfurylideneamine, tetrahydro-4H-1,4-tiazine-1,1-dioxide). Embora sua eficácia na fase aguda da doença seja aceitável, a taxa de cura durante a fase crônica varia de acordo a distribuição geográfica, idade do paciente e dose prescrita (Morilla& Romero, 2015). Atualmente, os estudos sobre o benefício do tratamento com benzonidazol na CCC têm sido realizados e foi mostrado que a droga possui alta frequência de efeitos colaterais tais como: dermatite por hipersensibilidade,

intolerância digestiva, polineurite, hepatite tóxica e depressão da medula óssea. Enquanto que para o Nifurtimox foi visto alta incidência de distúrbios do sistema nervoso central, como principal efeito collateral (Matta et al., 2012). Recentemente, o *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis* (BENEFIT), estudo randomizado multicêntrico para avaliar a efetividade do tratamento com benzonidazol na redução de desfechos clínicos negativos, concluiu após 5 anos de seguimento que apesar de reduzir significativamente a parasitemia avaliada através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), o mesmo não se traduziu em redução de desfechos clínicos de deterioração cardíaca.

O transplante cardíaco ainda é a única forma de tratamento capaz de alterar o curso clínico da doença (Fiorelli et al., 2011). Por muito tempo acreditou-se que o transplante cardíaco em pacientes com CCC deveria ser evitado, já que o uso de imunossupressores gerava uma grande apreensão sobre uma possível reativação da infecção. Na verdade, o transplante cardíaco na CCC apresenta baixo índice de reativação e sobrevida maior do que cardiomiopatias de outras etiologias (Bocci & Fiorelli, 2001). Com as mudanças realizadas na prescrição de imunossupressores, os casos de reativação caíram de 2,3 episódios por paciente para 0,28. Atualmente, o transplante cardíaco é bastante frequente em pacientes com CCC, representando 26,2% (107/409) de todos os transplantes cardíacos realizados pelo Instituto do Coração da Universidade de São Paulo entre 1985 e 2010, tornando o Brasil o país com maior experiência nessa modalidade (Fiorelli et al., 2011). A mortalidade para pacientes com CCC após o transplante é menor do que para pacientes cardiomiopatas de outras etiologias, estando a sobrevida estimada em 83%,

76%, 62% e 43% em 1, 2, 6 e 10 anos, respectivamente (Baccal & Bocci, 2008). Apesar dos diversos avanços, algumas complicações pós-transplante ainda devem ser cuidadosamente observadas como rejeição do enxerto, neoplasia e vasculopatias.

Além da busca por tratamentos eficazes, a busca por candidatos a biomarcadores de diagnóstico, progressão, eficácia do tratamento e cura para a CCC tem sido constante. Recentemente, estes biomarcadores foram agrupados nas seguintes categorias: biomarcadores plasmáticos, fenotípicos, antigênicos, genéticos e de manejos. Marcadores plasmáticos são os mais estudados devido a maior facilidade de obtenção de amostras e a baixa invasividade. Alguns exemplos são: o fator transformador do crescimento (TGF- β), peptídeos natriuréticos dos tipos A e B (ANP e BNP), pro BNP N-terminal, troponina I, metaloproteinase-2 (MMP-2) e seus inibidores teciduais 1 e 2 (TIMP 1 e 2), dentre outros. Entretanto, apesar destes marcadores estarem algumas vezes mais elevados em pacientes com CCC do que em pacientes com outras cardiomiopatias, a inespecificidade ainda é um problema recorrente (Pinho et al., 2016). Um exemplo de marcador fenotípico seria um comprometimento da função de células T reguladoras, as quais perderiam a capacidade de balancear as respostas efectoras, portanto, facilitando o desenvolvimento da CCC decorrente de um dano exacerbado ao miocárdio (Cardillo et al., 2015). Quanto a marcadores antigênicos, Nagarkatti et al. descreveram um aptâmero o qual consegue distinguir camundongos infectados de não infectados, não possui reatividade cruzada com antígenos de *Leishmania donovani* e antígenos próprios, além de ser detectável nas fases aguda e crônica da doença (De Araujo et al., 2015). Entretanto, estes estudos

ainda precisam ser realizados em humanos. Marcadores genéticos ainda são escassos, um exemplo seria as associações feitas por no grupo entre os genótipos CCL2rs2530797A/A e TIRAPrs8177376A/A e uma maior susceptibilidade a CCC, bem como CCR5rs3176763C/C e uma possível proteção para o desenvolvimento da cardiomiopatia (Frade et al., 2013). Em adição, nosso grupo identificou um grupo de 27 transcritos gênicos em sangue total, em sua maioria associados a resposta citotóxica NK/CD8+, os quais conseguem diferenciar pacientes cardiomiopatas com fração de ejeção preservada, de pacientes com fração reduzida (Ferreira et al, 2017). Também identificamos um RNA longo não codificante (do inglês, *long non-coding RNA*) o qual possui expressão aumentada no miocárdio de pacientes e camundongos infectados com *T. cruzi* quando comparado a pacientes com cardiomiopatia dilatada (Frade et al., 2016).

Apesar do grande número de estudos abordando o tema e de diversos candidatos a biomarcadores terem sido investigados, nenhum deles foi adequadamente validado. Dessa forma ainda não existe um consenso quanto a utilização destes biomarcadores no seguimento de pacientes com CCC (Pinho et al., 2016).

Dessa forma, a ausência de um tratamento alternativo para a CCC demonstra que nosso conhecimento sobre sua patogênese ainda é muito limitado e que novas estratégias de estudo são necessárias para descoberta de biomarcadores de progressão da doença assim como novos tratamentos para a CCC.

1.3 MicroRNAs na CCC

Nos últimos anos tem-se visto que não apenas os genes codificadores de proteína desempenham um papel importante em diferentes processos^{13, 14} (Eulalio; Hutzinger; Izaurralde, 2008). Um novo mecanismo envolvendo regulação pós transcricional desempenhada por pequenos RNAs não codificadores, denominados microRNAs (miRNAs ou miRs) tem atraído a atenção da comunidade científica pelas evidências de que estas moléculas apresentam papel fundamental. MiRNAs são uma classe abundante de moléculas de RNA de fita simples que contêm em média 22 nucleotídeos que possuem uma função regulatória de aproximadamente 50% de todos os genes em humanos. Sua descoberta aconteceu em 1993 por Lee e colaboradores durante a análise da expressão dos genes responsáveis pelo desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Lee; Fainbaum; Ambros, 1993). Eles demonstraram que o gene *lin-4* não era traduzido em proteína, mas originava dois pequenos RNAs que se ligavam em sequências localizadas na região 3' não traduzida (3' UTR) do RNAm *lin-14*, inibindo sua tradução. A hipótese inicial foi de que esse mecanismo de regulação gênica era restrito ao *C. elegans*. Naquele momento era impossível prever a importância e o impacto que essa descoberta teria em todos os aspectos da biologia celular. Em 2000, foi identificado o miRNA *let-7*, também importante no desenvolvimento do *C. elegans*, mas foi visto que sua expressão estava presente e conservada em uma variedade de organismos, incluindo humanos, fortalecendo a hipótese de que os miRNAs desempenham um papel na regulação gênica em todas as espécies (Pasquinelli et al., 2000).

Com o passar do tempo, um número crescente de trabalhos tem demonstrado que os miRNAs são peças chave em diversos processos biológicos assim como em patologias (Van Rooij, 2011). Recentemente calcula-se que o genoma humano codifique mais de 3000 miRNAs dos quais mais de 1000 já foram identificados. Os genes codificadores de miRNA representam aproximadamente 2-3% do genoma humano e cada um dos miRNAs possui centenas de alvos conservados (Bartel, 2004). A identificação de miRNAs expressos em tipos específicos de células cardíacas levou ao descobrimento de importantes funções regulatórias dos miRNAs durante a diferenciação e ciclo celular de cardiomiócitos e durante diferentes estágios da hipertrofia cardíaca no adulto (Van Rooij et al., 2006; Chen et al., 2006; Lagos-Quintana et al., 2002). O desenvolvimento embrionário do coração envolve interações complexas entre vários tipos celulares de diferentes linhagens: cardiomiócitos, células endocárdicas e vasculares, fibroblastos e células do tecido de condução do coração.

Até agora um papel funcional no desenvolvimento do coração tem sido atribuído aos miRNAs que são expressos especificamente e abundantemente pelos músculos esqueléticos e cardíaco, denominados myomiRs, que incluem os miRNAs: miR-1, miR-133, miR-206 e miR-208 (Callis & Wang, 2008). A importância de miRNAs específicos durante doenças cardiovasculares também foi demonstrada através de estudos de deleções genéticas em camundongos submetidos a insultos cardiovasculares. Diferentes miRNAs estão envolvidos em várias patologias do sistema cardiovascular tais como: arritmias (miR-1, miR-133 e miR-208a), fibrose (miR-21, miR-29), remodelamento cardíaco induzido por aumento da pressão arterial (miR-208 e miR-133) e doenças

metabólicas (miR-33) (Kim, 2013; Van Rooij et al., 2008; Albinsson et al., 2011; Van Rooij; Olson, 2007; Care et al., 2007). Tendo como perspectiva a busca por uma melhor compressão da fisiopatologia envolvida no desenvolvimento da CCC e por novos alvos terapêuticos para o seu tratamento, a minha linha de pesquisa principal é a de estudar o envolvimento dos miRNAs em doenças crônicas com ênfase na doença de Chagas. Em estudo publicado em 2014, demonstramos, pela primeira vez, a expressão de miRNAs no tecido cardíaco de pacientes com CCC (Ferreira et al., 2014). Especificamente, foi demonstrado que cinco myomiRs: -1, -133a-2, 133b, 208a, e 208b estão diminuídos significativamente em amostras de pacientes com CCC quando comparados às amostras controle e três: -133b, -208a, -208b estão diminuídos em amostras CDI comparadas às amostras controle. E mais importante, destes miRNAs, os miRNAs: -1, 133a-2 e 208b estão com expressão ainda mais diminuída em amostras CCC quando comparadas às CDI. Um dado importante é que os alvos desses miRNAs são genes cuja expressão alterada se relaciona com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Exemplos disso são a Ciclina D1 (CCND1), Calcineurina (Pp3cb) e a proteína kinase B (AKT), alvos do miR-1 e RhoA, Thrap1 e CTGF que estão envolvidos com a hipertrofia cardíaca, fibrose e remodelamento cardíaco e são alvos do miR-133. A família dos miR-133 compreende os miRs -133a-1, -133a-2 e miR-133b. MiR-133a-1 e miR-133a-2 possuem sequências idênticas, mas são codificados por genes distintos (encontrados no cromossomo 18 humano) ambos diferem do miR-133b apenas por dois nucleotídeos.

Em 2015 nosso grupo publicou um artigo com o perfil de 754 miRNAs no coração de camundongos na fase aguda da infecção com o *T. cruzi*.

Observamos que os mesmos myomiRs: miR-1, miR-133 e miR-208 que previamente demonstramos estarem com expressão diminuída no coração de pacientes na fase crônica da Doença de Chagas, já se demonstraram com a expressão diminuída no coração de camundongos com 15 dias de infecção, e essa diminuição se mantinha por 30 e 45 dias após a infecção com *T. cruzi* (Navarro et al., 2015). Esse myomiRs possuem importantes papéis na função do coração, como o miR-133a que é regulado durante o desenvolvimento da fibra cardíaca pelo fator de transcrição Srf (*Serum response factor*) e foi visto que este regula o processo hipertrófico (Careet al., 2007). Deleção (*knockout*) de um dos genes que codifica miR-133a é bem tolerado em camundongos, enquanto que a deleção de ambos (duplo *knockout*) resulta em letalidade neonatal: o coração do camundongo duplo *knockout* apresenta defeitos nos septos ventriculares, aumento da proliferação dos cardiomiócitos e apoptose, além de uma expressão ectópica dos genes que são alvos do fator de transcrição Srf (Care et al., 2007). Assim como o miR-1 a diminuição de miR-133 através da utilização de *antagomiRs* (inibidores dos miRNAs) foi suficiente para induzir hipertrofia cardíaca e aumento da expressão de genes fetais em camundongos. Enquanto os miR-133 e miR-1 são expressos tanto no músculo cardíaco quanto esquelético, o miR-208 possui sua expressão restrita ao músculo cardíaco. Um alvo importante do miR-208a é o fator de transcrição GATA4, que regula a função do coração pós-natal e da resposta hipertrófica do coração ao estresse patológico. GATA4 é alvo do miR-208a pois possui na sua região 3'UTR (3' *Untranslated Region* /Região 3' não traduzida) uma sequência de ligação para este miRNA. Foi demonstrado que GATA-4 está aumentado em camundongos knockout para miR-208a, e que

esses camundongos tinham problemas de condução cardíaca, com bloqueios atrioventriculares (Callis et al., 2009). Além disso, esses camundongos não possuem a onda P nos eletrocardiogramas, sugerindo que estes possuem fibrilação atrial (Van Rooij, 2012). Esses trabalhos demonstram o quão importante são os miRNAs na regulação de seus alvos e como a sua expressão alterada é responsável por diferentes patologias (Callis & Wang, 2008). A regulação da biogênese de miRNAs é um tema importante que ainda não foi estudado extensivamente. Porém trabalhos recentes têm desvendado a importância e função das várias proteínas que fazem parte da maquinaria da biogênese e as etapas da biogênese que estão disfuncionais durante as diversas patologias (Kim, 2005).

1.4 Biogênese de miRNAs

A biogênese dos miRNAs é um processo governado por muitos pontos regulatórios, compostos por diferentes enzimas e proteínas nucleares e citoplasmáticas (Kim, 2005). A biogênese se inicia no núcleo da célula através da transcrição, e continua no citoplasma onde finalmente o miRNA maduro exerce sua função (Figura 2). A transcrição do gene do miRNA é feita pela RNA polimerase II ou III dando origem a um longo transcrito primário denominado pri-miRNA (de *primary miRNA*). O gene contendo o miRNA a ser transcrito pode estar localizado em exons ou introns de genes codificadores ou não de proteína (Kim, 2005).

Cerca de 30% dos miRNAs estão localizados em introns e exons de genes hospedeiros (*host-genes*) codificadores, localizados na fita senso, e assim podem compartilhar os mesmos promotores destes últimos (Kim, 2005). O pri-miRNA contém aproximadamente duas quilobases, cap na região 5' e poliadenilação. O pri-miRNA formado é então processado pelo complexo constituído por uma RNase do tipo III, denominada Drosha que age juntamente com seu cofator, DGCR8 (do inglês *DiGeorge Syndrome critical region gene 8*), que cliva o pri-miRNA e produz o pré-miRNA (de *precursor miRNA*). A clivagem do pri-miRNA pela Drosha/DGCR8 ocorre exatamente 11 pares de base (pb) de distância da junção basal entre o RNA de fita simples e o de fita dupla, e a 22 pb da junção apical ligada ao loop terminal. O pré-miRNA formado é de fita dupla, em forma de grampo (*hairpin*), com aproximadamente 70 pb e contém na sua extremidade 3' dois nucleotídeos protuberantes/salientes (*overhang*). A enzima Exportina-5 (EXP5) reconhece esse e outros motivos do pré-miRNA e o exporta para o citoplasma através do poro nuclear. Esse mecanismo é dependente da hidrólise de GTP em GDP que é feita pela Ran-GTPase e o seu substrato GTP. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado por um outra RNase tipo III, a Dicer. Este é clivado próximo ao alça (*loop*) terminal dando origem a um duplex miRNA:miRNA*. Em seguida, o duplex se associa ao complexo multiproteico RISC (de "*RNA-induced silence complex*"), que inclui a proteína Argonauta 2 (AGO2), a Dicer, o seu co-fator TRBP (*TAR RNA binding Protein*) e a proteína ativadora de PKR (PACT). Tanto a TRBP quanto a PACT não são necessárias para a atividade de clivagem realizada pela Dicer, mas são importantes para estabilização desta. A fita de miRNA com relativa baixa estabilidade no pareamento de bases em sua extremidade 5' é incorporada ao

RISC, sendo que a outra fita é degradada. Após a seleção da fita simples do miRNA maduro, esta guia o RISC até o RNAm alvo para que haja a regulação pós-transcricional (Kim, 2005).

Figura 1 - **Biogênese dos miRNAs.** O RNA primário, chamado pri-miRNA, é transcrito pela RNA polimerase II. Ainda no núcleo, a RNase Drosha em conjunto com seu cofator DGCR8 cliva o pri-miRNA formando o pré-miRNA, que é exportado do núcleo para o citoplasma pela Exportina 5 através de um gradiente GTP-GDP. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela Dicer em conjunto com seu cofator TRBP formando um duplex miRNA:miRNA*. Este se liga ao RISC e uma das fitas do duplex é degradada. O RISC é formado pelo complexo DICR/TRBP e a proteína Argonata 2.

1.5 Pontos regulatórios da biogênese de miRNAs

A regulação da biogênese de miRNAs tem que ser feita de forma rígida pela célula, para a manutenção das suas funções normais. Podemos dividir a biogênese de miRNAs em três pontos regulatórios: **1.** Transcrição; **2.** Processamento no núcleo e **3.** Processamento no citoplasma. Que são descritos a seguir em detalhe:

1. Transcrição: A transcrição é um ponto regulatório importante na biogênese de miRNAs. Muitas das características dos promotores dos genes de miRNAs são similares aos dos genes codificadores de proteínas, tais como a presença de ilhas de CpG, sequência TATA box, elementos iniciadores e de reconhecimento por fatores de transcrição. Como já foi explicitado, os genes de miRNAs podem ser transcritos tanto pela RNA polimerase II quanto pela III. O início da transcrição pode ser ativado através da ligação dos fatores de transcrição como: MYOD1, NF- κ B p65, p53, c-myc e MEF2. Além disso, a ativação da transcrição também pode ocorrer em resposta a fatores de crescimento, tais como PDGF e TGF- β (Krol, 2010). O controle epigenético também contribui para a regulação dos genes de miRNAs através da metilação das ilhas CpG nos seus promotores. Uma forma simples de avaliarmos se a etapa de transcrição dos genes dos miRNAs está funcional é analisar a produção do produto da transcrição, que são os transcritos primários, ou seja, os pri-miRNAs.

2. Processamento no núcleo: O processamento do pri-miRNA em pré-miRNA, realizado pela enzima Drosha, representa outro ponto de regulação realizado ainda no núcleo da célula. Os níveis totais de Drosha e de DGCR8 na célula são rigorosamente controlados e exercem um papel regulatório fundamental. A proteína DGCR8 tem um papel na estabilidade da Drosha através da interação com seu domínio central, enquanto Drosha controla os níveis de DGCR8 através da clivagem dos *hairpins* presentes em seu RNAm, desta forma induzindo sua degradação. A interação entre as duas proteínas se dá por um mecanismo de autorregulação e é necessário um equilíbrio rígido entre os níveis de ambas para que o processamento dos pri-miRNAs continue acontecendo. Já foi descrito que as proteínas SMAD, induzidas por TGF- β interagem com Drosha a ativando. Por fim, a estabilidade, atividade e localização de Drosha e DGCR8 são ainda influenciadas por modificações pós-traducionais, como fosforilação e acetilação. Para se manter localizada no núcleo, Drosha necessita ser fosforilada pela GSK3B (*glycogen synthase kinase 3B*). Da mesma forma, a desacetilação e fosforilação da DGCR8 pela histona deacetilase 1 (HDAC1) e pela ERK, respectivamente, aumentam sua estabilidade e afinidade por pri-miRNAs (Davis& Hata, 2009).

3. Processamento no citoplasma: Após o processamento no núcleo, o pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela EXP-5 complexada com Ran-GTP. Já foi demonstrado que o *knockdown* da Exportina-5 causa uma redução nos níveis de miRNA maduro no citoplasma, porém não se observa acúmulo de pré-miRNAs no núcleo, indicando que EXP-5 também atua na estabilização do pré-miRNA o protegendo de degradação. EXP-5 reconhece o pré-miRNA

independentemente da sua sequência ou da estrutura do loop. O importante é que a distância entre os dois nucleotídeos protuberantes da extremidade 3' do pré-miRNA até o seu loop esteja correta para que a EXP-5 se ligue eficazmente e realize o transporte apenas dos pré-miRNAs que foram processados corretamente (Van Rooij, 2012). O complexo RISC é multiproteico formado pela Dicer, as proteínas TRBP, PACT e Ago2. Foi visto que apesar das proteínas TRBP e PACT não serem essenciais para a atividade da Dicer, a ausência ou redução dessas proteínas diminui consideravelmente os níveis de miRNAs maduros produzidos, pois ambas as proteínas participam no recrutamento de Ago2. A proteína Ago2 é peça chave no processo de biogênese ajudando também na estabilização da Dicer (Van Rooij, 2012). O knockout de Ago2 em células faz como que haja uma redução da produção de miRNAs maduros além de um acúmulo de pré-miRNAs no citoplasma.

1.6 Por que estudar a biogênese de miRNAs no miocárdio de pacientes com CCC?

As primeiras observações experimentais que confirmaram a importância dos miRNAs e da regulação da sua biogênese para o sistema cardiovascular foram através da deleção da enzima Dicer em camundongos (Da Costa Martins et al., 2008). Camundongos knockout para Dicer apresentaram defeitos e malformação dos vasos sanguíneos durante a embriogênese com letalidade para o embrião. Estudos analisaram o papel da Dicer no coração adulto através da deleção cardio-específica de Dicer em camundongos com três e oito

semanas de idade utilizando um mecanismo de Cre recombinase induzida por tamoxifeno. A deleção de Dicer causou morte prematura em uma semana acompanhada por remodelamento ventricular e um dramático alargamento do átrio no camundongo jovem. Em animais mais velhos (no miocárdio adulto), a deleção de Dicer induziu um alargamento dos dois ventrículos, acompanhada de hipertrofia de cardiomiócitos, desarranjo das miofibrilas, fibrose ventricular e uma forte reativação da expressão dos genes fetais.

Em humanos foi visto que no coração de pacientes com CDI e com falência cardíaca há uma expressão diminuída da Dicer (amostras de biopsias) e interessante quando os pacientes receberam dispositivo de assistência do ventrículo esquerdo havia um aumento da expressão de Dicer, sugerindo uma correlação entre a expressão desta e a gravidade da doença cardíaca (Chen et al., 2008). A deficiência de Ago2 também resulta em letalidade do embrião de camundongos e sua superexpressão aumenta a proliferação celular tanto *in vivo* como *in vitro*. Drosha forma um complexo com DGCR8 e essa interação é necessária para o processamento dos pri-miRNAs. DGCR8 foi originalmente identificado como o gene que está deletado em cerca de 90% dos pacientes com a síndrome DiGeorge, uma síndrome que afeta 1 em cada 3 mil nascimentos (Dpila et al., 1998). As manifestações da doença são variáveis, com 75% dos pacientes apresentando defeitos congênitos no coração. Além disso, a deleção carido-específica de TRBP no coração de camundongos também levou ao desenvolvimento de uma cardiomiopatia do tipo dilatada, levando a um desbalanço entre MYH6 e MYH7 (Ding et al., 2015).

Considerando-se que entre 30-80% de todos os genes humanos podem ser regulados por miRNAs (Lu & Clark, 2012), uma disfunção na biogênese e,

consequentemente, no perfil de miRNAs expressos em determinado tecido, pode ter consequências de grande impacto para a perda de homeostase e, portanto, desenvolvimento/progressão de doenças.

Com base na observação de que há uma diminuição na expressão de myomiRs no coração de pacientes com CCC e em evidências de que alterações na biogênese de miRNAs (modelos *knockdown* e *knockout*) estão associadas a cardiomiopatias, decidimos avaliar a biogênese de miRNAs no miocárdio de pacientes com CCC.

2 HIPÓTESE

Há uma desregulação da biogênese de miRNAs no músculo cardíaco de pacientes com Cardiopatia Chagásica Crônica, a qual está associada a redução na expressão de myomiRs.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a relevância biológica da biogênese de miRNAs para a patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica.

Objetivos Específicos

1) Avaliar a existência de uma disfunção na biogênese de miRNAs no miocárdio de pacientes com CCC, através das seguintes análises:

1.a) Expressão relativa dos pri-miRNAs, pré-miRNAs e miRNAs maduros dos seguintes myomiRs: miR-1, miR-208, miR-133 e miR-499;

1.b) Expressão gênica e proteica das proteínas relacionadas a biogênese de miRNAs: Drosha, DGCR8, Exportina 5, RAN, Dicer1, PACT, TRBP e Argonauta 2;

2) Estudar o impacto de uma possível disfunção da biogênese no perfil de miRNAs maduros no miocárdio de pacientes com CCC;

3) Predizer a relação das alterações biológicas encontradas para o desenvolvimento de disfunções características da CCC: hipertrofia, arritmia, miocardite e fibrose;

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento experimental

Figura 2 - Fluxograma representativo do delineamento experimental do estudo de avaliação da biogênese de miRNAs. RNA e proteínas foram extraídos de 22 amostras da parede lateral do ventrículo esquerdo do miocárdio de pacientes controles (6) e com CCC (16). O RNA foi utilizado para análise da expressão relativa de pri-miRNA, pré-miRNAs e miRNAs maduros de miRNAs específicos do coração, além de RNAm das proteínas envolvidas na biogênese de miRNAs. Além disso, 12 amostras (4 controles e 8 CCC) tiveram o seu perfil de miRNAs determinado através da tecnologia *Taqman® Low Density Array*. Os extratos proteicos foram utilizados para a determinação da expressão relativa de proteínas associadas a biogênese de miRNAs em 15 amostras (5 controles e 10 CCC), bem como para a determinação da atividade enzimática de Dicer1 em 13 amostras (4 controles e 9 CCC). Os dados de perfil de miRNAs maduros foram utilizados para a construção de redes de interação miRNA-RNAm.

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo, o qual utiliza amostras de explante miocárdico de 22 pacientes (6 controles, 16 CCC), previamente coletadas durante a realização de transplantes cardíacos, processadas e armazenadas a -80°C , até posterior realização dos experimentos. Fragmentos de aproximadamente 100mg foram utilizados para extração de proteína e RNA. Ambos os materiais foram quantificados e tiveram sua qualidade avaliada antes da realização dos experimentos de expressão. Para a quantificação relativa da expressão de RNAm, primiRNAs, premiRNAs e miRNAs maduros utilizamos a técnica de qRT-PCR. Para a análise da expressão proteica de moléculas envolvidas na biogênese de miRNAs realizamos a técnica de *Western blot*. O perfil de miRNAs maduros foi determinado utilizando-se placas TLDA (*Taqman Low Density Array*) e subsequentemente integrado a resultados de transcriptômica previamente publicados para a construção de redes de interação miRNA-RNAm. Os dados foram analisados utilizando-se o software Graphpad Prism e a significância estatística foi considerada quando $p < 0.05$. A figura 2 apresenta um fluxograma representativo do delineamento experimental.

4.2 Amostras de miocárdio humano

As amostras de miocárdio utilizadas na realização deste estudo são provenientes da parede lateral do ventrículo esquerdo de dois tipos de pacientes: a) pacientes com CCC que foram submetidos a transplante cardíaco; b) doadores de órgãos cujos corações não foram utilizados para a

realização de transplante cardíaco, posteriormente tendo sido doados ao nosso grupo. Dessa forma, um total de 22 amostras (6 controles e 16 CCC) foram previamente coletadas, transportadas em salina (NaCl 0,9% estéril), processadas em gelo, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. É importante ressaltar que, por estarmos localizados no próprio Instituto do Coração (InCor), o tempo de processamento dessas amostras antes do congelamento é mínimo, o que, em geral, nos assegura uma ótima qualidade do material. As amostras tem sido obtidas através de uma colaboração entre o Laboratório de Imunologia e a equipe de transplantes do Centro Cirúrgico do INCOR-HC, coordenada pelo Prof. Dr. Noedir Stolf, com a aprovação da Comissão Científica do INCORHC (SDC2667/05/087), pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa–CONEP e da Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n852/05) e foram coletadas durante o pós-doutorado das pesquisadoras Dra. Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira (MEMO 217/14, online 12299, SDC 4114/14/094) e Priscila Camillo Teixeira (n 322/03). O presente estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração (SDC 4344/16/010) (Anexo A).

As amostras de CCC foram selecionadas tendo-se como base a uniformidade entre com relação à idade, sexo, fração de ejeção e dilatação do ventrículo esquerdo (DDVE). Essa medida foi tomada como forma de reduzir o viés e aumentar a comparabilidade. As informações sobre as amostras utilizadas encontram-se no anexo B, C e D.

4.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR)

4.3.1 Extração de RNA

Aproximadamente 100mg de tecido foram cortados de cada uma das 22 amostras de miocárdio. Este corte foi feito em um procedimento otimizado para evitar o descongelamento do tecido. Dessa forma, os tecidos foram mantidos em tubos criogênicos dentro de nitrogênio líquido até o momento do corte, quando foram retirados do tubo e envolvidos em papel alumínio. Com a ajuda de um martelo, cada peça foi então quebrada em pedaços menores, os quais foram novamente imersos em nitrogênio e posteriormente pesados.

Os cortes foram colocados em tubos contendo esferas de cerâmica e o equipamento *Precellys* (*Bertin Technologies*) foi utilizado para lise e homogeneização. A lise foi realizada em tampão de lise do kit *mirVana miRNA Isolation Kit* (Ambion, Estados Unidos) a 6500rpm, 3 ciclos de 15 segundos com pausa de 10 segundos entre cada ciclo. Caso o tecido não estivesse completamente homogeneizado, mais uma etapa de 3 ciclos foi realizada.

A extração foi realizada utilizando-se o kit *mirVana* (Ambion, Estados Unidos) e foi dividida em duas etapas, cada uma contendo até doze amostras. Assim, cada extração contou com número semelhante de amostras de cada um dos grupos clínicos (ex. 8 CCC e 3 controles) visando minimizar variações na qualidade do material obtido entre os grupos.

O lisado foi submetido a uma extração orgânica por meio da adição de 1/10 de homogeneato aditivo, seguido de agitação em vórtex e posterior adição de fenol: clorofórmio (volume semelhante ao do lisado), agitação em vórtex por 30-60 segundos e centrifugação em velocidade máxima (10.000g) por 5 minutos

para separação de fases. A fase aquosa foi então cuidadosamente removida e o protocolo de enriquecimento para miRNAs foi seguido. É importante ressaltar que este protocolo nos permite obter duas frações de RNA: 1) RNAs longos depletados de *small RNAs*; e 2) fração enriquecida para *small RNAs*. Assim, a fração 1 foi utilizada para as análises de pri-miRNA, pre-miRNA e RNAm (RNAs longos), enquanto que a fração 2 foi utilizada para a análise da expressão de miRNAs maduros.

Resumidamente, as fases aquosas foram então adicionadas de 1/3 de etanol 100%, agitadas em vórtex, transferidas para colunas contendo filtros de fibra de vidro para isolamento de RNA e centrifugadas por 15 segundos a 10.000xg. Neste ponto, a fração número 1 (RNAs longos) ficou retida no filtro e o filtrado foi coletado para se obter a fração número 2. Mais 2/3 de etanol foram adicionados ao filtrado, o qual foi novamente centrifugado por 15 segundos a 10.000xg e o filtrado foi descartado, mantendo-se o filtro contendo *small RNAs*. Após esta etapa ambos os filtros contendo as duas frações, 1 e 2, passaram pelo mesmo procedimento de lavagem: 700uL de solução de lavagem 1, seguido de centrifugação por 10 segundos; e 2 ciclos de lavagem com 500uL da solução de lavagem 2/3. Água DEPC (Dietilpirocarbonato), (Invitrogen, Estados Unidos), pré-aquecida a 95°C foi utilizada para eluir ambas as frações de suas respectivas colunas. O material foi armazenado a -80°C.

4.3.2 Quantificação e integridade do RNA

As amostras de RNA e miRNA foram quantificadas utilizando-se o aparelho de espectrofotometria NanoDrop™ 2000 (NanoDrop Technologies, Delaware, EUA). A razão de absorbância A260/280 foi utilizada como forma de determinar a qualidade e a pureza das extrações. A razão 260/280 indica principalmente a possível contaminação por material proteico, fenol ou outro contaminante e indica extrações de qualidade quando possui resultado em torno de 2,0 (Thermo Scientific – Technical Bulletin). Tanto as amostras de RNA como miRNA obtiveram pureza excelente para a razão 260/280 (Anexo E).

O aparelho 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc, EUA) foi utilizado na avaliação da integridade dos RNAs utilizados. Esta tecnologia baseia-se na realização de uma eletroforese capilar e na utilização de fluoróforos que se ligam ao RNA aplicado na matriz do gel. Após realizada a leitura, o aparelho gera eletroferogramas e calcula a integridade das amostras baseando-se na razão entre a intensidade das bandas rRNA 18S e 28S. O resultado é dado na forma de um score que vai de 0 a 10, chamado *RNA Integrity Number*, RIN. Um RIN acima de 5 indica RNA com qualidade boa, suficiente para ser utilizado em reações de PCR, enquanto que um RIN igual ou superior a 8 indica RNA com qualidade excelente e que pode ser utilizado para aplicações mais exigentes, como um *array* (Fleige; Pfaffl, 2006). Como este teste baseia-se na presença de RNAs longos, ele não deve ser realizado nas amostras enriquecidas para RNAs pequenos. Assim, nossas amostras obtiveram RINs excelentes, com média de 7,8, variando entre 6,2 e 9,1 (Anexo E e F).

4.3.2 Transcrição Reversa

Para a análise de RNAm, primiRNAs e premiRNAs, a transcrição reversa foi realizada utilizando-se OligodT e *random primers*. Para esta reação, 0,5uL de oligodT (500ug/mL), 0.5uL de random primers e 1uL de dNTPs (10mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) foram adicionados a 2,5ug de RNA, sendo aquecidos por 5 minutos a 65°C e 2 minutos a 42°C em termociclador (Verit, Applied Biosystems). Em seguida, foram adicionados 4uL de tampão 5x (250mM de tris-HCL, 375mM de KCL e 15mM de MgCL₂, pH 8,3), 2uL de DTT, 1uL de RNase OUT™ e 1uL de Super Script II (200U/uL) e reação prosseguiu a 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos, e 4°C até sua retirada do aparelho e armazenamento a -20°C.

Já para as amostras de miRNA, as reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando-se um pool de primers específicos para cada miRNA, incluindo os controles endógenos RNU44, RNU48 e miR-331. Um pool de 25 primers foi feito utilizando-se 2,5uL cada primer 20X para uma concentração final de 0,05X em 1mL (seguindo protocolo disponibilizado pela Applied Biosystems). A transcrição reversa foi então realizada utilizando-se 6uL do pool de primers, 3uL de amostra (90ng), 0,3uL dNTPs 100mM com DTT, Multiscribe Reverse Transcriptase (50U/uL), 1,5uL de Tampão de transcrição reversa 10X, inibidor de RNase (20U/uL) e água livre de 1,01L nuclease. As amostras foram então colocadas no termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com velocidade máxima de rampa, e com o seguinte ciclo: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C e 4°C até retirado do equipamento e armazenamento a -20°C.

4.3.4 Eficiência de amplificação

Todos os primers utilizados neste estudo são ensaios Taqman (Thermo Fisher Scientific, EUA), tanto para RNAs longos quanto para miRNAs, com excessão dos pré-miRNAs que utiliza a tecnologia LNATM. Dessa forma, não haveria necessidade de se mensurar a eficiência dos primers, já que a *Life Technologies* e a *Exiqon* garantem que todos os primers amplificam com aproximadamente 100% de eficiência. Entretanto, nós decidimos testar a eficiência da amplificação em nossas amostras. Dessa forma, escolhemos o HPRT1 (gene endógeno bastante estável e abundante no coração) para testar a eficiência da amplificação nas amostras de RNA e o miR-1 (miRNA mais abundante no miocárdio) para as amostras enriquecidas para miRNAs. Para a eficiência de amostras de RNA uma diluição seriada de 7 pontos partindo de uma quantidade inicial de 2,5ug de RNA e fator de diluição 2 entre os pontos (2500ng, 1250ng, 750ng, 375ng, 187,5ng, 93,75ng, 31,25ng). O mesmo racional foi utilizado para as amostras de miRNA, porém em uma concentração inicial de 12,5 ng em um fator de 10 (12,5ng, 1,25ng, 0,125ng, 0,0125ng, 0,00125ng, 0,000125ng). Para ambas as análises, 4 amostras foram utilizadas. Para o cálculo da eficiência contruiu-se uma curva utilizando o log da concentração de cada ponto da diluição seriada e a média dos CTs das triplicatas de cada ponto da curva. A inclinação da curva (*slope*) foi utilizada para calcular a eficiência, $E = 10^{(-1/slope)} \times 100$. Para ambas as análises, miRNA (miR-1) e RNA (HPRT1) obtivemos valores de eficiência muito próximos de 100%, 100,88% e 98,11%, respectivamente. Baseando-se nestes resultados,

nossas amostras estão adequadas para o uso nas reações de qPCR (Anexo G).

4.3.5 Quantificação relativa por PCR em tempo real (qPCR)

A determinação da expressão relativa de pri-miRNAs, RNAs e miRNAs foram realizadas utilizando-se a Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR). As reações de qPCR, realizadas em triplicatas, foram montadas em placas de 384 poços (MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate With Barcodes – Thermo Fisher Scientific, EUA) e corridas no termociclador QuantStudio™ 12K Flex (Thermo Fisher Scientific, EUA). Seguindo as recomendações do fabricante, cada reação continha: 10uL de TaqMan Universal Master Mix II no UNG (contendo a enzima AmpliTaq Gold® DNA polymerase, dNTPs, tampão de enzima, MgCL₂, e a referência passiva de fluorescência ROX®) (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1uL do primer específico para o alvo de interesse (20X), 1,33uL da amostra de cDNA e 7,67uL de água livre de nucleases, em um total de 20uL de reação. O termociclador foi programado para a ciclagem padrão do fabricante de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Como normalizadores das reações, foram utilizados como genes endógenos para RNAs longos (pri-miRNA, pre-miRNA e RNA) a média dos genes HPRT1, ACTB e PPIA e para miRNAs o miR-331. Os dados para a escolha dos endógenos encontram-se no anexo H. Levamos em consideração o endógeno ou a combinação de endógenos que apresentasse menor desvio padrão entre todas as amostras e

a menor diferença entre as médias para os dois grupos. Nas tabelas 1, 2 e 3 encontram-se os primers utilizados no presente estudo.

Tabela 1 - Relação de primers utilizados nos ensaios individuais de qPCR para RNAm de proteínas da biogênese de miRNAs.

Primers RNAm	Código
Dicer1	Hs00229023_m1
Drosha	Hs00203008_m1
TARBP2	Hs00998379_m1
PACT	Hs00269379_m1
DGCR8	Hs00256062_m1
AGO2	Hs01085579_m1
XPO5	Hs00382453_m1
Ran	Hs03044733_g1
Endógenos	
HPRT1	Hs02800695_m1
ACTB	Hs01060665_g1
PPIA	

Tabela 2 - Relação de primers utilizados nos ensaios individuais de qPCR para análise de pri-miRNAs de myomiRs

Primers pri-microRNAs	Código
hsa-pri-miR-1-1	Hs03303345_pri
hsa-pri-miR-133a-2	Hs03303121_pri
hsa-pri-miR-133a-1	Hs03303117_pri
hsa-pri-miR-133b	Hs03303651_pri
hsa-pri-miR-208b	Hs03305207_pri
hsa-pri-miR-208a	Hs03302817_pri

Tabela 3 - Relação de primers utilizados nos ensaios individuais de qPCR para análise de myomiRs maduros

Primers microRNAs maduros	Código
hsa-miR-133a-3p	002246
rno-miR-133a5p	464986_mat
hsa-miR-133b- 3p	002247
mmu-miR-208a-5p	462036_mat
hsa-miR-208a-3p	000511
hsa-miR-208b-3p	002290
hsa-miR-208b-5p	466480_mat
hsa-miR-1-3p	002222
hsa-miR-499-5p	001352
hsa-miR-499-3p	002427
Endógenos	
hsa-miR-331	000545

4.3.6 Análise da expressão de pré-miRNAs

Devido a não disponibilidade de primers Taqman para ensaios de qPCR para pré-miRNAs, recorremos a empresa Exiqon para o desenho de primers específicos para os pré-miRNAs de myomiRs. O desenho de primers para pré-miRNAs é complexo, uma vez que a sequência dos mesmos está contida no pri-miRNA, além de conterem a sequência do miRNA maduro. Assim, amplificações inespecíficas são um ponto crucial a ser considerado.

O RNA utilizado para a síntese do cDNA foi o mesmo descrito nas seções 4.3.1 e 4.3.2. A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o *Universal cDNA synthesis Kit II* (catálogo 203301, Exiqon, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante. Para a reação de qPCR foi utilizado o ExiLENT SYBR® Green master mix (Exiqon, EUA) nas mesmas condições e com os mesmos aparelhos já descritos na seção 4.3.5.

4.4 qPCR array para perfil de miRNAs

Para a avaliação do perfil de miRNAs expressos no miocárdio dos pacientes foram utilizadas placas de PCR array, Taqman® Low Density Array (TLDA). Para cada paciente são utilizadas duas placas de 384 poços, ambas contendo controles endógenos e diferentes miRNAs de interesse (um por poço). Dessa forma, é possível analisar 754 miRNAs com apenas duas placas. Assim como os outros primers utilizados nas reações individuais, estes também pertencem à tecnologia Taqman®, conferindo alta especificidade e sensibilidade.

Devido à disponibilidade de amostras e placas, o perfil foi realizado em 12 amostras: 4 controles e 8 CCC.

Os mesmos protocolos de corte das amostras (100mg) e de extração utilizando o Kit *mirVana miRNA Isolation Kit* (Ambion, Estados Unidos) foram utilizados. Porém, neste caso, extraímos o RNA total (RNAs longos + RNAs pequenos), já que este é o protocolo preconizado pelo *Life Technologies*.

As amostras foram subsequentemente dosadas utilizando-se o NanoDrop™2000 (NanoDrop Technologies, Delaware, EUA) e sua qualidade avaliada através do Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc, EUA) (Anexo F).

O TaqMan® MiRNA Reverse Transcription Kit e os primers RT Megaplex™ foram utilizados para a síntese do cDNA. Os primers Megaplex™ RT contam com dois pools de primers para miRNAs humanos, o pool A e o pool B, cada um destinado para a transcrição reversa dos miRNAs contidos nas placas TLDA A e B. A reação foi montada de acordo com a recomendação do fabricante: 0,8 µL Megaplex™ RT Primers (10×), 0,2 dNTPs com dTTP

(100 mM), 1,5 µL MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL), 0,8 µL 10× RT Buffer, 0,9 µL MgCl₂ (25 mM), 0,1 µL RNase Inhibitor (20 U/µL), 0,2 µL água livre de Nuclease. À reação de 4,5 µL foram acrescentados 3 µL de RNA total contendo 500ng, totalizando 7,5 µL de reação. Os tubos foram colocados no termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com velocidade máxima de rampa, e com o seguinte ciclo: 40 ciclos de 16°C por 2 minutos, 1 minuto a 42°C, 1 segundo a 50°C e 1 ciclo de 85°C por 5 minutos. As amostras ficaram a 4°C até serem retiradas do equipamento e armazenadas a -20°C.

As reações de qPCR foram montadas utilizando-se o seguinte protocolo: 444 µL de água livre de nucleases, 450µL de TaqMan Universal Master Mix II no UNG (contendo a enzima AmpliTaq Gold® DNA polymerase, dNTPs, tampão de enzima, MgCL₂, e a referência passiva de fluorescência ROX®) (Thermo Fisher Scientific, EUA) e 6 µL do cDNA feito com o pool de primers A ou B. Cada placa TLDA recebeu 100µL desta reação em cada uma de suas oito canaletas. As placas foram centrifugadas duas vezes a 321xg por 1 minuto, seladas e as canaletas de aplicação da amostra foram removidas. As placas foram colocadas no termociclador *7900 HT Fast-Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) sob a seguinte ciclagem: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C, e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Os dados com as curvas de expressão de cada placa foram extraídos do equipamento SDS 7900HT e analisados inicialmente no programa ExpressionSuite versão 1.0.1 (Applied Biosystems – Life Technologies, EUA).

Após a análise da qualidade das curvas de amplificação de cada amostra, foi determinado o limiar de detecção para cada miRNA, gerando o valor de CT. Os dados de CT das placas foram então analisados utilizando os programas RealTime Statminer (*Integromics*, Espanha) e Excel (Microsoft, EUA).

4.5 Análise da expressão proteica

4.5.1 Extração Proteica

Devido à disponibilidade de amostras e a limitações dos aparatos utilizados na técnica de *Western Blot*, 15 amostras (5 controles e 10 CCC) das 22 iniciais foram utilizadas para avaliação da expressão proteica.

Fragmentos de aproximadamente 100 mg foram obtidos das amostras de tecido cardíaco, como descrito para RNA, e foram transferidas para tubos contendo esferas de cerâmica e solução de lise RIPA (100mM Tris-HCl pH 7.5, 1% desoxicolato de sódio, 150mM de NaCl, 0.1% de dodecil sulfato de sódio (SDS)) acrescida dos inibidores de protease aprontina 1% e PMSF 1mM (do inglês, phenylmethy sufonyl fluoride). As amostras foram então lisadas e homegeneizadas no aparelho *Precellys* (*Bertin Technologies*) a 6500rpm, 3 ciclos de 15 segundos com pausa de 10 segundos entre cada ciclo. Caso o tecido não estivesse completamente homogeneizado, mais uma etapa de 3 ciclos foi realizada. Após, os extratos foram sonicados por 3 ciclos de 10 segundos cada a 10 Watts e centrifugados a 12.000xg por 30 minutos a 4°C

para remoção de particulado insolúvel. Os extratos proteicos foram armazenados a -80°C.

4.5.2 Quantificação Proteica

A quantificação proteica dos extratos foi realizada pelo método de BCA (ácido bicincônico, BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce Biotechnology, EUA). Este teste baseia-se na redução de Cu^{2+} a Cu^+ quando em contato com proteínas em meio alcalino, combinada a uma detecção colorimétrica altamente sensível. Em suma, o cobre é quelado pelas proteínas em ambiente alcalino gerando um complexo de tonalidade azul clara, em seguida, o ácido bicincônico é acrescentado, reagindo com o cátion cuproso e gerando uma coloração roxa. Este complexo roxo tem forte absorbância a 562nm.

Como curva padrão foi utilizada a albumina bovina sérica (BSA) em diluição seriada, iniciando-se na concentração de 2mg/poço até 15,62ug/poço (8 pontos em duplicata, fator de diluição 2). As amostras foram então plaqueadas em três diluições em duplicatas, a saber: 1:10, 1:100, 1:1000. Às amostras e à curva, foram adicionados 200uL do reagente revelador, o qual é constituído pelas soluções A e B do kit misturadas em uma proporção de 50:1. Em seguida, as placas foram encubadas a 37°C por 30 minutos, ao abrigo da luz, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 562nm. A curva foi considerada adequada quando R^2 em torno de 0,99 e amostras com coeficiente de variação entre duplicatas maior que 10% tiveram sua dosagem repetida.

4.5.3 Análise da expressão de proteínas da maquinaria da biogênese de miRNAs por *Western Blot*

Aos extratos proteicos foi acrescentado o tampão de amostra, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol, foram aquecidos a 95 °C por 5 minutos a fim de desnaturar as proteínas, quebrar pontes dissulfeto e igualar as cargas elétricas. As amostras foram então aplicadas em géis de poliacrilamida tanto 12% e quanto 8% (dependendo do tamanho da proteína a ser analisada), e então submetidas à eletroforese unidimensional (SDS-PAGE). Utilizou-se o sistema SE600 Ruby (Amersham Biosciences/GE Healthcare) com uma voltagem de 70 volts até a entrada das amostras no gel de corrida e de 140 volts até o fim da corrida. Em seguida, foi realizada transferência úmida por 16 horas para membrana de nitrocelulose. Como controle da eficiência das transferências, as membranas foram coradas com corante Ponceau, lavadas com água miliQ e bloqueadas por 2 horas com solução de bloqueio (TBS 1%, Tween 0,1% e 5% leite em pó). As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários, específicos para as proteínas de interesse (Tabela), por 16 horas a 4°C. Após a incubação estas, passaram por um ciclo de três lavagens com TBST por 10 min, a fim de retirar anticorpos que se ligaram inespecificamente à membrana, e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente por uma hora, protegidas da luz à temperatura ambiente. O aparelho Odissey (LiCor) foi utilizado para leitura das membranas e a análise de densitometria foi realizada utilizando-se o software ImageQuant TL (Amersham Biosciences/GE healthcare). Na Tabela 4 encontra-se a relação de anticorpos utilizados no presente estudo. GAPDH (Drosha e Ago2) e alpha-

tubulina (Dicer, TRBP, PACT, Exportina-5 e RAN) foram utilizados como normalizadores endógenos.

Tabela 4 - Relação de anticorpos utilizados no método de *western blot* para análise da expressão relativa de proteínas da biogênese de miRNAs.

Anticorpo	Código
Anti-Drosha	ab58589
Anti-TRBP	ab180947
Anti-PACT (PKR activating protein) / PRKRA	ab75749
Anti-DGCR8	ab82876
Anti-Ago2 / eIF2C2	ab156870
Anti-Exportin-5	ab131281
Anti-Dicer	ab111971
Anti-Ran	ab155103
Endógenos	Código
Anti-GAPDH	ab8245
Anti-alfa-tubulina	Ab52866

4.6 Análises de Bioinformática

Após obtermos o padrão de expressão de miRNAs, fizemos uma análise dos RNAm alvo de cada miRNA estudado. Utilizamos o software *Ingenuity Pathways Analysis* v8.0-2602 IPA (*Ingenuity® Systems*) que nos permitiu examinar interações miRNA-RNAm preditos e/ou demonstrados experimentalmente, priorizando alvos baseados no contexto biológico relevante (como por exemplo, no nosso caso, doenças cardiovasculares, miocardite, hipertrofia e doenças infecciosas) e visualizar as interações moleculares entre estes miRNAs e seus RNAm alvo e o impacto biológico relacionado. Isso foi feito através de um processo de filtragem que utiliza os bancos de dados de

alvos de miRNAs: TarBase (alvos que foram determinados experimentalmente) e o TargetScan (alvos preditos), onde podemos selecionar o nível de confiança (se foi testado experimentalmente ou não e se a predição possui alta ou baixa confiabilidade), o contexto biológico, tipo de célula ou tecido, e doença. Também cruzamos os dados de expressão gênica de microarranjos (*microarrays*) de cDNA que haviam sido geradas anteriormente em nosso laboratório para o mesmo tipo de amostras, Controle e CCC (Laugier et al, 2017). Com esta análise pudemos gerar redes biológicas focadas nas relações funcionais entre os genes do *microarray* que tiveram sua expressão alterada e que possuem padrão de expressão opostos (*expression pairing*). Para a construção de redes de interação foram adicionadas disfunções características da CCC (fibrose, arritmia, miocardite e hipertrofia) utilizando a ferramenta *functions and diseases*. Estas características foram então conectadas aos miRNAs e aos respectivos RNAs. A fim de obter uma rede menor e mais informativa, foram mantidas na rede apenas miRNAs e moléculas com ligações diretas ou indiretas a alguma disfunção.

4.7 Análises estatísticas

A quantificação da expressão relativa dos genes e miRNAs avaliados foi feita utilizando o método *Ct* (*Threshold Cycle*) comparativo ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen; Livak, 2008). Onde *Ct* é o número do ciclo da reação de PCR no qual a fluorescência gerada cruza a linha de base (*threshold*). Os valores de *Ct* são logarítmicos e são inversamente relacionados à quantidade de produto amplificado (*amplicon*) gerado na reação (quanto menor o *Ct*, maior a

quantidade de *amplicon* na reação). Os valores de Ct são usados diretamente na equação $2^{-(\Delta Ct \text{ do gene alvo} - \Delta Ct \text{ do gene endógeno})}$, onde o gene alvo é o gene analisado e o gene endógeno foram o RNU48 ou HPRT1. Após o cálculo do ΔCT de cada amostra, foram calculados os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$. A análise de outliers foi realizada através do software online QuickCalcs Outlier Calculator (GraphPad Software, <https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>).

Para a quantificação da expressão proteica, os valores densitométricos para cada proteína analisada foi dividido pelo valor do gene endógeno GAPDH (amostra/endógeno da própria amostra). Em seguida, a média dos controles de cada gel foi utilizada para normalizar todas as amostras deste mesmo gel, fazendo com que todos os valores tivessem a mesma escala quando plotados em gráfico. Como os controles foram analisados em cada um dos três géis, seus resultados estão expressos na forma de média das triplicatas técnicas.

Para ambos tipos de análise de expressão gênica e proteica, os resultados foram plotados em gráficos através da utilização do software GraphPad Prism e a análise estatística realizada pelo método de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Para a análise dos dados de qPCR *array* utilizou-se o pacote HTqPCR para a linguagem R (Dvinge & Bertone, 2009). A distribuição dos valores de Ct foi submetida a normalização do tipo *quantilee* os miRBAs diferencialmente expressos foram determinados utilizando-se o Bioconductor package LIMMA (Ritchie et al, 2009). Filtros de variância foram aplicados e a ausência de até dois valores por grupo foram aceitos para cálculo de coeficientes parciais. Os

valores de p resultantes foram ajustados utilizando-se o método de Benjamim-Hochberg e a significância estatística foi determinada como $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Partindo da hipótese de que o mecanismo de biogênese de miRNAs está desregulado em CCC, realizamos experimentos para analisar o nível de expressão gênica dos pri, pré-miRNAs e miRNAs maduros e expressão proteica de moléculas responsáveis pela biogênese de miRNAs. Para uma das enzimas da biogênese, a Dicer, além de quantificarmos a sua expressão, também realizamos ensaios para medir a sua atividade enzimática.

5.1 Caracterização das amostras

Na tabela 5, encontram-se os dados relativos à idade, sexo e fração de ejeção para os pacientes CCC e controle incluídos no estudo. Percebe-se uma diferença estatisticamente significativa de idade entre os dois grupos, sendo os pacientes com CCC mais velhos. A composição dos grupos quanto ao sexo dos pacientes não é estatisticamente diferente.

Nos anexos B, C e D estão disponíveis mais informações individuais para ambos os grupos.

Tabela 5 - Médias de idade, fração de ejeção e composição quanto ao sexo para os grupos em estudo.

	Controle (N=6)	CCC (N=12)	p-valor
Idade (anos)	30.5 ± 12.2	47.4 ± 13.2	0.0148
Sexo (n,%)	M 6 (100)	M 10 (62.5%)	0.1328
FE (%)	-	24.2	

Fonte: própria. CCC = Cardiomiopatia chagásica crônica. FE = Fração de ejeção. A análise estatística da variável idade foi realizada utilizando-se o teste de Mann-Whitney, e para a variável sexo aplicamos o teste exato de Fisher. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0.05$.

5.2. Quantificação relativa da expressão de myomiRs maduros

Com a intenção de confirmar a menor expressão de myomiRs maduros no miocárdio de pacientes com CCC, avaliamos a expressão dos seguintes myomiRs: miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-133a-5p, miR-208a, miR-208a-5p, miR-208b, miR-208-5p, miR-499, miR-499-5p.

Como é possível visualizar na figura 3, com exceção dos miRNAs 208b-3p e 208b-5p, todos os myomiRs maduros apresentaram menor expressão no grupo CCC quando comparados ao grupo controle.

Figura 3 - Representação gráfica da expressão relativa dos miR-1, 133b, 133a, 133a-5p, 208a, 208a-5p, 208b, 208b-5p, 499, 499-5p. Os valores estão expressos na forma de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*fold change*) e foram normalizados pelo miR-331. O cálculo estatístico foi feito através do método de Mann-Whitney e os resultados foram considerados dignificantes se $p < 0,05$.

5.2 Quantificação relativa da expressão dos miRNAs primários (pri-miRNAs) de myomiRs

A fim de determinar se alterações na expressão dos pri-miRNAs de myomiRs no coração de pacientes com CCC poderiam explicar a diminuição observada para os miRNAs maduros, analisamos por qRT-PCR a expressão dos pri-miRNAs de myomiRs.

Nenhum dos pri-miRNAs apresentou expressão diferencial estatisticamente significativa entre os grupos controle e CCC (Figura 4).

Figura 4: Representação gráfica da expressão relativa dos pri-miR-1, 133b, 133a1, 133a2, 208a, 208b e 499a. Os valores estão expressos na forma de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (*fold change*) e foram normalizados pela média dos genes HPRT1, ACTB e PPIA. O cálculo estatístico foi feito através do método de Mann-Whitney e os resultados foram considerados significantes se $p < 0,05$.

5.3 Expressão dos precursores de miRNAs (pré-miRNAs) de myomiRs

Para avaliar possíveis alterações na primeira etapa da biogênese de miRNAs, avaliamos a expressão de pré-miRNAs de myomiRs. Por motivos técnicos, foi possível apenas a avaliação do pré-miR-1, o qual não se apresentou diferencialmente expresso nos pacientes com CCC quando comparado a pacientes controle (Figura5).

Figura 5 - Representação gráfica da expressão de pré-miRNA-1 em pacientes com CCC e controles. Os valores estão expressos na forma de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e foram normalizados pela média dos genes HPRT1, ACTB e PPIA. O cálculo estatístico foi feito através do método de Mann-Whitney e os resultados foram considerados significantes se $p < 0,05$.

5.4 Expressão relativa RNAm das miosinas cardíacas

Dos miRNAs analisados, dois miR-208a, miR-208b, são codificados nas regiões intrônicas dos genes da Myh6 e Myh7, respectivamente e normalmente acompanham a expressão dos seus genes hospedeiros. Avaliamos a expressão gênica de ambas as miosinas. A figura 6 mostra que não houve diferença na expressão da MYH7, porém há uma clara redução na expressão da MYH6, entre os grupos controle e CCC, $p=0.0268$. Da mesma forma, quando calculada a razão MYH6/MYH7, percebe-se uma redução da razão para o grupo CCC (Figura 6).

Figura 6 – Representação gráfica da expressão de RNAm das miosinas cardíacas em pacientes com CCC e Controles. Há uma menor expressão de MYH6 e também da razão MYH6/MYH7 em pacientes com CCC. a) MYH6, b) MYH7, c) razão MYH6/MYH7. Os valores estão expressos na forma de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e foram normalizados pela média dos genes HPRT1, ACTB e PPIA. O cálculo estatístico foi feito através do método de Mann-Whitney e os resultados foram considerados significantes se $p < 0,05$.

5.5 Expressão relativa de proteínas relacionadas à biogênese de miRNAs

Com o intuito de determinar possíveis alterações na maquinaria de biossíntese de miRNAs, a expressão relativa dos RNAs e das proteínas foram determinadas por qPCR e *Western blot*, respectivamente. A fim de facilitar o entendimento e análise dos resultados, os mesmos foram separados por etapa de edição (núcleo, citoplasma) e os resultados de qPCR e *Western blot* para cada proteína serão apresentados juntos. As imagens dos *Western blots* podem ser vistas no anexo I.

Núcleo

Após ser transcrito no núcleo, o pri-miRNA passa por sua primeira etapa de edição pela enzima Drosha, em conjunto com a proteína DGCR8, que juntas formam o complexo microprocessador. Após o seu processamento em pré-miRNA (perdendo a cauda poli-A e o 5'-cap), este é então transportado para o citoplasma pela exportina 5, em um processo ativo, utilizando energia produzida pela RAN-GTP.

Nenhuma das proteínas envolvidas no processamento nuclear da biogênese de miRNAs apresentou expressão diferencial entre os grupos CCC e controle, tanto a nível de RNA como a nível proteico, como pode ser observado na figura 7. Para a proteína DGCR8, não foi possível avaliar a expressão proteica.

Figura 7 - Representação gráfica da expressão relativa (fold change), de proteínas na etapa nuclear da biogênese canônica de miRNAs. À esquerda, níveis de RNAm, e à direita, expressão proteica. Nenhum dos componentes encontra-se diferencialmente expresso. a) Drosha, b) Exportina-5, c) RAN. Os valores estão expressos na forma de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change). A expressão gênica foi normalizada pela média dos genes HPRT1, ACTB e PPIA. Para normalização da expressão proteica utilizamos o GAPDH (Drosha) e a alfa-tubulina (XPO5 e RAN). O cálculo estatístico foi feito através do método de Mann-Whitney e os resultados foram considerados significantes se $p < 0,05$.

Citoplasma

Uma vez no citoplasma, o pré-miRNA é processado pela Dicer em associação a TRBP e a PACT. Neste processo, é gerada um duplex de miRNA, sendo uma das fitas posteriormente associada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), cuja proteína efetora em mamíferos é a argonauta 2.

Para Dicer1 não foram encontradas alterações significativas na expressão de seu RNAm, entretanto a mesma encontra-se com expressão proteica significativamente reduzida, quando comparada ao grupo controle. (Figura 8). Apesar de haver uma menor expressão gênica de PACT ($p=0,0032$) nos pacientes com CCC quando comparados ao grupo controle, não houve diferença nos níveis proteicos entre os dois grupos (Figura 8). Para TRBP e AGO2 não encontramos diferenças no padrão de expressão do RNAm ou da proteína entre os grupos analisados (Figura 8).

Figura 8 - Representação gráfica da expressão relativa (*fold change*) de proteínas na etapa citoplasmática da biogênese canônica de miRNAs. Observa-se redução na expressão gênica de PACT ($p=0,0046$) e na expressão proteica de Dicer1 ($p<0,001$). À esquerda, níveis de RNAm, e à direita, expressão proteica. a) Dicer, b) TRBP, c) PACT, d) AGO2. Os valores estão expressos na forma de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*fold change*). A expressão gênica foi normalizada pela média dos genes HPRT1, ACTB e PPIA. Para normalização da expressão proteica, utilizamos o GAPDH (Ago2) e a alfa-tubulina (Dicer, TRBP e PACT). O cálculo estatístico foi feito através do método de Mann-Whitney e os resultados foram considerados significantes se $p<0,05$.

5.6 Perfil da expressão de miRNAs maduros

A expressão de miRNAs maduros foi avaliada por meio da técnica *PCR array*, visando-se determinar o impacto final de possíveis alterações na maquinaria de biogênese em um número maior de miRNAs. Assim, 754 miRNAs tiveram sua expressão avaliada através de placas microfluídicas (TLDA).

Após a normalização global dos dados e a análise estatística considerando-se um $p < 0,05$ como significativo foram encontrados 80 miRNAs diferencialmente expressos entre CCC/Controle (Tabela). O *fold change* dos miRNAs diferencialmente expressos variou de -4,89 a 3,93, sendo 151-3p e 146a-5p os miRNAs menos e mais expressos, respectivamente. A grande maioria dos miRNAs no grupo CCC quando comparado ao controle estavam com a expressão reduzida, 97,5% (78/80). Ao considerar o p-valor corrigido pela análise de Bonferroni, apenas dois miRNAs apresentaram-se como diferencialmente expressos, estando estes com a expressão aumentada, miR-146a e miR-155, expressão relativa de 3,93 e 3,78 respectivamente.

Existe uma distribuição igualitária entre o número de miRNAs 3p e 5p que se apresentaram diferencialmente expressos, 40 miRNAs de ambos os grupos (50%). Entretanto, se dividirmos a lista de miRNAs ao meio (40-40) em miRNAs com maior e com menor redução de expressão, observa-se que há uma maior representatividade de miRNAs 3p entre os miRNAs com maior redução de expressão, 60% (24/40), enquanto que o oposto é observado para miRNAs 5p, estando estes mais presentes entre os miRNAs com menor

redução de expressão, 60% (24/40). Este fato se reflete na média de *fold change*, sendo a média para fitas 3p de -2,68 e para fitas 5p de -2,12.

Na figura 9, temos uma representação visual através de um *volcano plot* da expressão diferencial entre pacientes com CCC e controles. Em destaque estão os miRNAs com expressão aumentada (miR-146a-5p e miR-155-5p) e o grupo de miRNAs maduros enriquecidos no coração, *myomiRs* (miR-1-3p, miR133a-3p, miR-133b-3p e miR-499a-5p).

Figura 9: Representação gráfica em *volcano plot* dos microRNAs diferencialmente expressos para a comparação CCC/Controle, após normalização do tipo *quantile*. Percebe-se uma redução quase total dos microRNAs diferencialmente expressos. No eixo x, $\log_2$ do *fold change*, e no eixo y, $-\log_{10}(p\text{-valor})$. Em destaque temos os *myomiRs* e os microRNAs com expressão aumentada. A análise estatística foi realizada utilizando-se o método de LIMMA e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 6 – Lista de miRNAs maduros diferencialmente expressos no miocárdio de pacientes com CCC quando comparados a amostras controle. A lista está alinhada em ordem decrescente de expressão relativa.

miRNAs	miRBase number	p-valor	p-valor ajustado	Expressão Relativa
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	3,23E-05	0,0063	3,93
hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	6,33E-05	0,0063	3,78
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	4,97E-02	0,1237	-1,7
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	4,39E-02	0,1135	-1,77
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	3,99E-02	0,1117	-1,83
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	4,35E-02	0,1135	-1,84
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	2,83E-02	0,0971	-1,89
hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	3,09E-02	0,0976	-1,9
hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	4,34E-02	0,1135	-1,91
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	3,02E-02	0,0971	-1,91
hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	4,03E-02	0,1117	-1,91
hsa-miR-532-5p	MIMAT0002888	3,59E-02	0,1099	-1,94
hsa-miR-376c-3p	MIMAT0000720	2,01E-02	0,0911	-1,99
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	4,48E-02	0,1143	-2
hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	4,39E-02	0,1135	-2,01
hsa-miR-95-3p	MIMAT0000094	3,87E-02	0,1117	-2,06
hsa-miR-24-2-5p	MIMAT0004497	2,26E-02	0,0929	-2,07
hsa-miR-152-3p	MIMAT0000438	3,87E-02	0,1117	-2,07
hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	9,68E-03	0,0794	-2,08
hsa-miR-378a-3p	MIMAT0003151	2,99E-02	0,0971	-2,09
hsa-miR-20a-3p	MIMAT0004493	1,53E-02	0,0821	-2,09
hsa-miR-99a-3p	MIMAT0004511	2,37E-02	0,0943	-2,1
hsa-miR-744-5p	MIMAT0004945	2,98E-02	0,0971	-2,1
hsa-miR-345-5p	MIMAT0000772	1,42E-02	0,0821	-2,11
hsa-miR-328-3p	MIMAT0000752	2,94E-02	0,0971	-2,11
hsa-miR-103-3p	MIMAT0000101	2,56E-02	0,0945	-2,12
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	2,11E-02	0,0923	-2,17
hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	1,87E-02	0,0909	-2,17
hsa-miR-411-5p	MIMAT0003329	1,46E-02	0,0821	-2,18

hsa-miR-335-5p	MIMAT0000765	2,00E-02	0,0911	-2,22
hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	3,91E-02	0,1117	-2,22
hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	2,76E-02	0,0971	-2,22
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	2,18E-02	0,0923	-2,24
hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	4,33E-02	0,1135	-2,25
hsa-miR-340-5p	MIMAT0004692	2,29E-02	0,0929	-2,26
hsa-miR-20b-5p	MIMAT0001413	1,30E-02	0,0821	-2,29
hsa-miR-302b-3p	MIMAT0000715	3,19E-02	0,0991	-2,31
hsa-miR-151-5p	MIMAT0004697	7,97E-03	0,0782	-2,32
hsa-miR-133b-3p	MIMAT0000770	1,27E-02	0,0821	-2,34
hsa-miR-106b-5p	MIMAT0000680	2,86E-02	0,0971	-2,35
hsa-miR-379-5p	MIMAT0000733	1,23E-02	0,0821	-2,37
hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427	1,39E-02	0,0821	-2,37
hsa-miR-302d-3p	MIMAT0000718	2,49E-02	0,0945	-2,4
hsa-miR-19b-1-5p	MIMAT0004491	1,51E-02	0,0821	-2,46
hsa-miR-642-5p	MIMAT0003312	7,53E-03	0,0782	-2,48
hsa-miR-9-3p	MIMAT0000442	3,93E-03	0,0712	-2,49
hsa-miR-652-3p	MIMAT0003322	4,72E-02	0,1190	-2,49
hsa-miR-145-3p	MIMAT0004601	3,94E-03	0,0712	-2,51
hsa-miR-1233-3p	MIMAT0005588	7,30E-03	0,0782	-2,52
hsa-miR-487b-3p	MIMAT0003180	1,97E-02	0,0911	-2,54
hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455	2,47E-02	0,0945	-2,57
hsa-miR-22-5p	MIMAT0004495	3,75E-03	0,0712	-2,59
hsa-miR-212-3p	MIMAT0000269	1,78E-02	0,0909	-2,59
hsa-miR-422a	MIMAT0001339	9,04E-03	0,0782	-2,62
hsa-miR-376a-3p	MIMAT0000729	2,56E-03	0,0712	-2,63
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	4,04E-02	0,1117	-2,65
hsa-miR-365a-3p	MIMAT0000710	2,13E-03	0,0712	-2,69
hsa-miR-1-3p	MIMAT0000416	4,70E-03	0,0728	-2,72
hsa-miR-324-5p	MIMAT0000761	1,84E-02	0,0909	-2,85
hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	1,30E-02	0,0821	-2,88
hsa-miR-9-5p	MIMAT0000441	3,31E-03	0,0712	-2,88

hsa-miR-101-3p	MIMAT0000099	3,77E-02	0,1117	-2,89
hsa-miR-361-5p	MIMAT0000703	2,82E-02	0,0971	-2,9
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	2,52E-02	0,0945	-2,91
hsa-miR-455-5p	MIMAT0003150	1,06E-02	0,0812	-2,97
hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	1,90E-03	0,0712	-3,04
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	9,97E-03	0,0794	-3,14
hsa-miR-378a-5p	MIMAT0000731	2,55E-03	0,0712	-3,15
hsa-miR-23b-3p	MIMAT0000418	8,97E-03	0,0782	-3,18
hsa-miR-224-5p	MIMAT0000281	1,61E-02	0,0842	-3,25
hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	1,32E-02	0,0821	-3,29
hsa-miR-203a-3p	MIMAT0000264	3,68E-03	0,0712	-3,38
hsa-miR-494-3p	MIMAT0002816	7,16E-03	0,0782	-3,47
hsa-miR-143-3p	MIMAT0000435	8,29E-03	0,0782	-3,59
hsa-miR-451a	MIMAT0001631	1,47E-02	0,0821	-3,67
hsa-miR-499a-5p	MIMAT0002870	5,30E-03	0,0728	-3,81
hsa-miR-27b-3p	MIMAT0000419	5,17E-03	0,0728	-4,06
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	5,48E-03	0,0728	-4,29
hsa-miR-22-3p	MIMAT0000077	6,08E-03	0,0756	-4,69
hsa-miR-151-3p	MIMAT0000757	2,15E-02	0,0923	-4,89

5.7 Análises de Bioinformática

Após obtermos a lista de miRNAs diferencialmente expressos, utilizamos o software IPA para predizer redes de interação miRNA-RNA e tentar compreender a participação dos miRNAs em disfunções biológicas características da CCC. Para os dados de expressão de RNA utilizamos uma lista de genes diferencialmente expressos entre CCC e Controle previamente publicados por nosso grupo.

Utilizando a ferramenta *target filter*, foram encontrados 728 RNAs alvos para 70 dos 80 miRNAs diferencialmente expressos. Ao filtrar os resultados para interações com *expression pairing* este número foi reduzido para 556 RNAs. Destes, 280 possuíam interações altamente preditas ou experimentalmente validadas. Apenas 38 alvos possuíam interações experimentalmente validadas. Portanto, utilizamos a lista dos 280 alvos altamente preditos para a construção da rede de interação.

Uma rede de integração entre miRNAs e seus RNAs alvo e disfunções da CCC (fibrose, hipertrofia, miocardite e arritmia) foi construída a fim de elucidarmos a participação dos miRNAs nesses processos biológicos. A figura 10 mostra que 33 miRNAs dos 80 analisados, possuem uma ligação com uma das disfunções da CCC ou com alguma molécula da rede. Dos 33, 19 miRNAs possuem uma ligação direta com alguma das disfunções. Podemos observar, ainda, que quatro *myomirs* (miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-208a-3p e miR-499a-5p) estão presentes na rede, estando os miR-1, miR-133a e miR-208 relacionados a duas das disfunções, hipertrofia/arritmia, fibrose/hipertrofia,

fibrose/miocardite, respectivamente. O miR-499 está relacionado a apenas uma das disfunções, a miocardite.

A fibrose é a característica que apresenta maior número de miRNAs ligados (16), seguida por hipertrofia (6), miocardite (2) e arritmia (1). Observou-se que os únicos miRNAs ligados a miocardite e arritmia foram myomiRs, miR-208a e 499; e miR-1, respectivamente. Nenhum miRNA se ligou a mais de duas disfunções.

Quanto aos RNAs presentes na rede, observamos a interação de diversos grupos de moléculas, dentre elas: moléculas relacionadas a resposta imune como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-7 (IL7), CXCL9 e 11 (do inglês, *C-X-C motif chemokine 9 e 11*), perforina 1 (PRF1), Fas ligante (FASL), CTLA4 (do inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*) e CCR5; canais iônicos como KCNN4, KCNJ2, KCNA4 e SCN2B (do inglês, *Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily N Member 4*, *Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2*, *Potassium voltage-gated channel subfamily A member 4*, *Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 2*); e moléculas ligadas a matriz extracelular como colágenos 1A1, 1A2 e 3A1 (COL 1A1, 1A2 e 3A1) e metaloproteinase de matriz 9 (MMP9). Destaca-se ainda a presença de IFN- γ como molécula nodal, tendo o maior número de ligações na rede, além de se ligar diretamente a dois dos desfechos patológicos incluídos na análise, miocardite e fibrose.

Figura 10: Representação gráfica da interação entre miRNAs diferencialmente e seus alvos (RNAs) com disfunções características da CCC (fibrose, hipertrofia, arritmia e miocardite). A rede foi construída utilizando-se o *software* IPA. As moléculas estão preenchidas em tons de vermelho e verde de acordo com a magnitude da variação de sua expressão, sendo verde expressão reduzida e vermelho, aumentada. Contornos e linhas coloridas significam interação com uma disfunção: lilás (arritmia), amarelo (hipertrofia), azul (fibrose) e vermelho (miocardite).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, estamos avaliando a possível disfunção da biogênese de miRNAs na cardiomiopatia chagásica crônica através da análise da expressão diferencial de toda a maquinaria envolvida na sua síntese, bem como dos produtos gerados em cada etapa de edição. Dessa forma, podemos determinar em qual etapa esta disfunção estaria ocorrendo e qual o seu possível efeito no miocárdio dos pacientes estudados. Apesar de associações entre uma desregulação na biogênese de miRNAs e o desenvolvimento de cardiomiopatias já terem sido demonstradas em modelos animais (Chen et al., 2008; Rao et al., 2009; Ding et al., 2015; da Costa Martins et al., 2008), este é o primeiro trabalho a fazer uma avaliação detalhada em amostras de miocárdio humano para qualquer cardiomiopatia, em especial na CCC. Assim, buscamos demonstrar não apenas a existência de uma disfunção, mas como ela se comporta e contribui para o desenvolvimento/manutenção da CCC.

Através de nossos resultados, observamos não haver uma alteração na expressão de nenhum pri-miRNA analisados. Descrevemos que, em CCC, há uma alteração na expressão das cadeias pesada da miosina cardíaca, MYH6 e MYH7 (genes hospedeiros dos miRNAs 208-a e 208-b), com um desvio da expressão mais favorável a MYH7 e redução da expressão de MYH6. Ao analisarmos a expressão de proteínas da biogênese, demonstramos não haver alteração na expressão gênica (RNAm) para quase todas as proteínas, com exceção da PACT. Apesar de não encontrarmos diferença na expressão de RNAm de Dicer, encontramos redução dos níveis proteicos no grupo CCC quando comparado ao grupo controle. Demonstramos ainda que essa alteração na expressão de Dicer1 está associada a uma redução expressiva

(97,5%) da produção miRNAs maduros e que estas alterações estão associadas a disfunções características da CCC, principalmente a fibrose.

6.1 Biogênese de microRNAs na CCC

6.1.1 O processamento nuclear de miRNAs não está alterado no miocárdio de pacientes com CCC

Em 2014, *Ferreira et al.* demonstraram, pela primeira vez, haver uma redução na expressão de miRNAs maduros específicos de músculo, myomiRs, em pacientes com CCC e com CDI. Uma redução na expressão destes miRNAs poderia estar relacionada a uma menor transcrição de seus pri-miRNAs, a uma disfunção do seu processo de edição, ou mesmo a uma maior degradação do miRNA maduro por RNases (Ha; Kim, 2014). Caso a redução na expressão de miRNAs maduros adviesse de um menor estímulo transcricional, esperar-se-ia uma redução semelhante da expressão de seus respectivos pri-miRNAs. Seguindo este raciocínio, nosso primeiro resultado, a não alteração da expressão de nenhum dos pri-miRNAs, corrobora a hipótese de haver uma desregulação da biogênese de miRNAs em suas etapas de edição, realizadas por Drosha e Dicer, e não na etapa transcricional.

Além disso, este resultado ainda sugere a ausência de uma disfunção biologicamente importante da primeira etapa de processamento, realizada pela Drosha em associação com a DGCR8. Uma disfunção nesta etapa, levaria a um menor processamento dos pri-miRNAs estudados e, portanto, ao seu acúmulo. Não há relatos na literatura de redução da expressão (*Knockdown*) e/ou deleção (*knockout*) de Drosha em células cardíacas, entretanto há

estudos relacionando os efeitos de sua deleção ou redução da expressão em outros tipos celulares. Em 2013, Fan et al. demonstraram que o *knockdown* de Drosha em células MDA-MB-231 (células humanas de adenocarcinoma mamário) levou a um acúmulo de pri-miRNAs e a uma redução da produção de miRNAs maduros. Além disso o *knockout* de Drosha ou Dicer1 em células espermatozóides levou a uma não-detecção de um terço dos miRNAs avaliados por *miRNA*-seq, ao passo que 80% dos miRNAs identificados estavam com sua expressão reduzida (Wuet al.,2012). De fato, apesar de não termos avaliado sua atividade, nossos resultados apontam para uma expressão semelhante de Drosha (RNAm e proteína) entre os grupos CCC e controle, estando de acordo com os resultados encontrados para a expressão de pri-miRNAs.

Por outro lado, o *knockout* de DGCR8 já foi previamente descrito no coração de camundongos e levou ao desenvolvimento de uma cardiomiopatia dilatada e subsequente insuficiência cardíaca, com uma média de sobrevida de 31 dias. Histopatologicamente, os corações apresentaram fibrose, redução da espessura das paredes ventriculares direita e esquerda, e dilatação das câmaras cardíacas. Além disso, o *knockout* de DGCR8 levou a redução na expressão de três miRNAs específicos de músculo: miR-1, miR-133a e miR-208 (outros miRNAs não foram avaliados) (Rao et al., 2009). Assim, uma alteração na expressão de DGCR8 seria um possível mecanismo envolvido no desenvolvimento de cardiomiopatias. Apesar de não termos encontrado diferenças na expressão de seu RNAm, os resultados para a expressão proteica foram inconclusivos e, portanto, não foram incluídos no presente estudo.

Uma alteração biologicamente significativa na expressão/atividade de DGCR8 parece improvável, já que a deleção de DGCR8 também está associada ao acúmulo de pri-miRNAs (Wang et al., 2007). Além disso, observamos não haver diferença significativa nos níveis de pré-miR-1, os quais estariam reduzidos caso a primeira etapa da biogênese estivesse comprometida. A perda da função de DGCR8 também já foi associada ao desenvolvimento de hidronefroze, mal-formação renal e infertilidade devido à má formações uterinas (Kim et al., 2016; Bartram et al., 2015).

Quanto as proteínas envolvidas no transporte de pré-miRNAs, Exportina 5 e RAN, observamos que ambas as proteínas não apresentam alteração de expressão gênica e proteica. Um estudo recente reavaliou o papel da Exportina 5 na biogênese de miRNAs, por meio de sua deleção em células HCT116 KO, demonstrou-se redução na expressão de 75,5% dos miRNAs analisados. Em contraposição, os *knockouts* de Dicer e Drosha, nesse mesmo estudo, afetaram quase 100% do perfil de miRNAs, 99% e 97%, respectivamente. Assim, apesar de ser crítica para a biogênese canônica de miRNAs, a Exportina 5 não parece ser essencial (Kim; Kim; Kim, 2016).

Dessa forma, nossa primeira conclusão é de que não parece haver comprometimento nas etapas nucleares da biogênese de miRNAs: transcrição, edição de pri a pré-miRNA e transporte citoplasma-núcleo.

6.1.2 Comprometimento do processamento citoplasmático de miRNAs na CCC: expressão reduzida de Dicer1

Quanto ao processamento citoplasmático, O papel de TRBP e PACT, ambas proteínas associadas a Dicer1 na biogênese de miRNAs ainda foi pouco estudado. Um estudo que aboliu ambas interações Dicer-PACT e Dicer-TRBP demonstrou que essas são necessárias para que certos grupos de miRNAs sejam produzidos no tamanho correto. Além disso, há uma alteração na seleção da fita, 3p ou 5p, que será introduzida na Argonauta 2 (Wilson et al., 2014). Entretanto, o papel de PACT no coração nunca foi estudado. Neste estudo, apesar de termos encontrado uma expressão reduzida do RNAm de PACT, os níveis proteicos não se encontraram alterados.

Por outro lado, TRBP já teve sua função avaliada no tecido cardíaco (Chen et al., 2008; Da Costa Martins et al., 2008; Ding et al., 2015). O *knockout* de TRBP no miocárdio afetou a expressão de um seleto grupo de 53 miRNAs, dentre eles miR-208a e b, miR-133b e miR-499. Os camundongos mutantes também desenvolveram uma cardiomiopatia do tipo dilatada, a qual demonstraram ser mediada pela baixa expressão do miR-208a, com presença de fibrose, ativação de genes fetais e alteração no padrão de expressão de MYH6 e MYH7, resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo (Ding et al., 2015). Entretanto, não encontramos diferença na expressão do RNAm e proteína para TRBP no miocárdio de pacientes com CCC em relação aos controles.

A AGO2 é a última proteína a participar da biogênese de miRNAs. Na verdade, ela é a efetora final, já que é componente fundamental do RISC (do

inglês, *RNA-Induced Silencing Complex*), que guiado pelo miRNA impede que o RNAm seja traduzido em proteína (Ha; Kim, 2014). Além disso, AGO2 também tem a capacidade de editar alguns pré-miRNAs que fogem a biogênese canônica (Kim; Kim; Kim, 2016). Assim, é interessante observar que não foram encontradas alterações na expressão proteica de AGO2 e, portanto, não haveria alterações que comprometam as funções efetoras finais na via dos miRNAs, apenas alterações na via de síntese.

O *knockout* coração-específico de Dicer1 no estágio embrionário é letal, ao passo que no camundongo adulto leva ao desenvolvimento de uma cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca. Esses camundongos apresentam redução da fração de ejeção, dilatação ventricular esquerda grave, redução significativa da frequência cardíaca e desregulação da expressão de proteínas contráteis. Esse mesmo estudo demonstrou ainda haver uma menor expressão proteica de Dicer em pacientes com CDI, porém sem análise estatística e com um n amostral de apenas 4 pacientes (Chen et al., 2009). No presente estudo encontramos uma redução da expressão proteica de Dicer 1 no tecido cardíaco de pacientes com CCC quando comparados ao grupo controle. Dessa forma, demonstramos que de fato há uma alteração significativa na biogênese de miRNAs na CCC através de uma menor expressão de Dicer1. Nos perguntamos, então, se essa alteração de expressão também estaria relacionada a uma alteração de sua atividade enzimática. Nossos resultados preliminares (Anexo J.a) apontam, de fato, para uma redução na atividade de Dicer1 no coração de pacientes com CCC.

Além dos níveis proteicos reduzidos de Dicer1 em CDI, outras alterações da expressão proteica já foram relatadas e estão, em sua grande maioria,

associadas a diferentes tipos de neoplasias. Entretanto, ainda não existe uma interpretação clara entre o tipo de alteração, maior ou menor expressão, e o desfecho encontrado. Por exemplo, uma maior expressão proteica de Dicer1 está associada a carcinoma bronquioalveolar, hiperplasia adenomatosa atípica, adenocarcinoma avançado de pulmão, adnecarcinoma coloretal, leiomiosarcoma, leiomioma, linfoma cutâneo primária de células T, metástases de linfonodos, adenocarcinoma seroso ovariano, carcinoma ovariano metastático, adenocarcinoma e neoplasia intraepitelial de próstata, melanoma cutâneo e acrolentiginoso. Por outro lado, uma menor expressão proteica de Dicer1 já foi descrita em carcinoma de nasofaringe, câncer gástrico, câncer de mama e câncer ovariano epitelial invasivo. É interessante ressaltar que nos casos onde a expressão proteica de Dicer1 estava reduzida, a mesma foi acompanhada de uma menor expressão gênica de Dicer1, demonstrando uma provável participação de mecanismos regulatórios da expressão gênica (Kurzynska-Kokorniak et al., 2015). Este tipo de alteração é diferente da encontrada no presente estudo, já que a redução dos níveis proteicos de Dicer1 não foi acompanhada por uma redução de seu RNAm.

Outro ponto no qual as alterações encontradas em nosso estudo se diferenciam das descritas para neoplasias é a preferência entre fitas 3p e 5p nos dois sistemas. No caso das neoplasias, a maior parte das mutações afetando a atividade de Dicer1 ocorrem no seu domínio RNase IIIb, o qual é responsável pelo processamento das fitas 5p. Dessa forma, as fitas 3p são mais produzidas em detrimento das fitas 5p, cuja síntese é prejudicada (Anglesio et al., 2013). Em nosso estudo, observamos o oposto, apesar de ambas as fitas serem prejudicadas pela redução proteica de Dicer1, as fitas -3p

são mais afetadas que as fitas -5p, além de os dois únicos microRNAs com expressão aumentada serem -5p. Assim, existe ainda a possibilidade de um processamento pelo domínio RNase IIIa mais prejudicado nas proteínas viáveis no miocárdio de pacientes com CCC.

É difícil afirmar se ambos os eventos seriam a causa ou uma consequência de processos patológicos anteriores no desenvolvimento de uma cardiomiopatia e insuficiência cardíaca. Levando-se em consideração que a CCC se trata de uma cardiomiopatia na qual estão bem definidos os eventos patológicos iniciais (infecção pelo parasita), essa disfunção de atividade parece ser mais uma resposta secundária. Além disso, percebemos que essa redução dos níveis proteicos de Dicer1 é causada por algum evento pós-transcricional, já que a expressão de RNAm em CCC é semelhante a dos pacientes controle. Assim, acreditamos que um aumento de sua degradação, associado ou não a uma inibição, seja responsável pelo evento observado.

Mecanismos pós-transcricionais para a redução nos níveis proteicos de Dicer1 também já foram descritos, como a sua degradação proteassômica mediada pela proteína R do HIV (Casey et al., 2013); saturação da interação do seu RNAm com o receptor da exportina-5, o qual é responsável pelo seu transporte para o citoplasma, em infecções por adenovírus (Benasser et al., 2011); degradação por caspases humanas durante o processo apoptótico (Ghodgaonkar et al., 2009); regulação por microRNAs, como miR-103/107, miR-192 e família let-7 (Kurzynska-Kokorniak et al., 2015); e como alvo do processo autofágico (Gibbins et al., 2012). Além disso diversas variantes para o RNAm de Dicer resultando em níveis diferentes de transcrição já foram descritas (Kurzynska-Kokorniak et al., 2015). Mecanismos pós-traducionais que

resultam em uma menor atividade de Dicer1 são: fosforilação durante o processo de oogênese com consequente translocação para o núcleo e SUMOilação de Dicer em macrófagos causada pelo ato de fumar cigarros (Drake et al., 2014; Gross et al., 2014).

É importante ressaltar que Dicer possui outros papéis celulares, o quais são independentes da biogênese de microRNAs, representando uma camada a mais de complexidade patológica para a redução de seus níveis proteicos. Por exemplo, no núcleo, Dicer1 está associada ao DNA ribossomal nuclear e poderia promover uma maior estabilidade do mesmo (Sinkkonen et al., 2010). Além disso, o *knockout* de Dicer1 levou a uma redução de metilações e aumento de acetilação resultando em uma cromatina menos condensada, podendo representar um envolvimento em mecanismos de controle transcricional (Haussecker & Proudfoot, 2005). Dicer também parece ser capaz de facilitar mecanismos de *splicing* de maneira co-transcricional (Ameyar-Zazoua et al., 2012); está envolvida no processo de reparo de quebras de duplas fitas (Francia et al., 2012); participa da regulação da expressão de genes ativados por esteroides ao interagir com RNA ativadores de receptores esteroidais (Redfern et al., 2013); além de uma possível participação na formação do fuso mitótico (Murchinson et al., 2007). Assim, alterações na expressão de Dicer1 podem ter consequências adicionais ao seu papel na biogênese de microRNAs. Para efeitos deste estudo, discutiremos apenas as alterações relacionadas a biogênese de microRNAs.

6.2 Envolvimento dos miRNAs em disfunções associadas a CCC

O *knockout* de Dicer in vitro, assim como o de Drosha, é marcado por uma redução global da expressão de miRNAs, exceto para alguns miRNAs não-canônicos que têm sua síntese independente dessa enzima (Chen et al., 2008). Porém, o *knockout* de Dicer1 in vivo especificamente no coração, leva a um perfil de miRNAs semelhante ao encontrado no presente estudo, onde apenas parte dos miRNAs é afetada (da Costa Martins et al, 2008). De fato, nossos resultados de perfil de miRNAs para CCC dão suporte a uma redução no processamento realizado por Dicer, já que mais de 97,5% dos miRNAs diferencialmente expressos encontram-se reduzidos, indicando uma disfunção de grande impacto.

A utilização de bioinformática e biologia de sistemas para a criação de redes de integração e identificação de vias de sinalização é a forma mais adequada de se analisar dados em larga escala. Portanto, utilizamos os dados de perfil de miRNAs e integramos dados de transcriptômica previamente publicados por nosso grupo para a criação de redes de interação miRNA-RNAm com desfechos patológicos característicos da CCC: hipertrofia, fibrose, arritmia, miocardite.

Das quatro características analisadas, fibrose aparece como um nodo central na rede, demonstrando a importância dos miRNAs diferencialmente expressos na sua regulação, além da sua grande importância para o desenvolvimento da CCC. Este destaque para fibrose pode ser devido ao fato das amostras analisadas serem derivadas de pacientes em estágio terminal da CCC, onde se predomina a fibrose. Alguns miRNA, tais como os pertencentes

a família 29, os quais estão enriquecidos em fibroblastos, são reconhecidos como miRNAs antifibróticos, pois regulam vias como a do TGF- β e controlam a expressão de componentes da matriz extracelular como colágeno, fibrilinas e elastina. A expressão reduzida dos miRNAs -133a, -125b, -101, -24, -30 também já foi previamente relacionada ao desenvolvimento de fibrose (O'Reilly, 2016; Wang et al, 2016). A fibrose cardíaca é caracterizada pelo depósito excessivo de matriz extracelular, principalmente colágeno. Este fator contribui para que o coração se torne mais rígido com a perda da elasticidade e disfunção tanto sistólica, quanto diastólica. Além disso, alterações de condução também estão associadas ao desenvolvimento de fibrose miocárdica, bem como hipertrofia, como forma de compensar a baixa capacidade de bombeamento sanguíneo (Travers et al, 2016). Na CCC já foi demonstrado correlação negativa entre a fração de ejeção e o percentual de fibrose, bem como uma correlação positiva entre a gravidade da insuficiência cardíaca e o grau de fibrose miocárdica avaliada por ressonância magnética (Uellendahl et al., 2016). O mesmo estudo detectou fibrose em 25 de 28 pacientes com CCC (89%). Assim, pode-se sugerir uma relação entre a área de fibrose e um pior prognóstico.

A relação de miRNAs com a hipertrofia cardíaca já foi bem descrita de forma a existirem dois grupos de miRNAs: anti-hipertrofos e os pró-hipertrofos. miRNAs como o miR-1, miR-101, miR-133a, miR-145, miR-185, miR-26, miR-378 e miR-9, miR-29, miR30, miR150 são considerados miRNAs anti-hipertrofos, ao reduzirem a expressão de genes que tendem a causar fibrose, como por exemplo, proteína ativadora da RASGTPase (RasGAP), quinase dependente de ciclina 9 (Cdk9), homólogo da Ras enriquecido no

cérebro (Rheb), fibronectina, *heart and neural crest derivatives expressed 2* (Hand2), e o fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1 (Igf1). Por outro lado, o miR-155 é considerado pró-hipertrófico ao reduzir a expressão de alvos como a proteína nuclear induzida por P53 (Tp53inp).

Duas disfunções apresentaram menor destaque na rede de interação entre miRNAs-RNAs diferencialmente expressos, arritmia e miocardite. Dessa forma, miocardite e arritmia parecem ser disfunções menos reguladas por microRNAs nesse estágio da doença. Entretanto, é importante ressaltar que análises de predição são baseadas em informações obtidas em bancos de dados, assim, algumas interações existentes podem eventualmente não ser incluídas. Um exemplo disso, são os microRNAs-155 e -146a, os dois únicos com expressão aumentada em CCC em relação ao grupo controle. Esses miRNAs provavelmente são provenientes de células do infiltrado inflamatório que migram para o coração durante o desenvolvimento da cardiomiopatia contribuindo para esta expressão diferencial (Da Costa Martins et al., 2008). Portanto, deveriam estar relacionados ao desenvolvimento de miocardite na rede.

De fato, os miRNAs 155 e 146a já foram todos relacionados a elementos da resposta imune como TNF- α , IFN- γ e NF-kB; além de outras respostas, como estresse oxidativo (Thum et al., 2008; Aliet al., 2016; Magenta et al., 2013; Van De Vrie et al., 2011; Tijssen et al., 2012; Jude et al., 2012; Reunbach et al., 2012; Fiorillo et al., 2015; Lindsay et al., 2008). O miR-146 é induzido pelo fator de transcrição NF-kB, o qual, em um feedback negativo, reduz a expressão de TRAF6 e IRAK1 da via de transdução de sinal dos receptores semelhantes ao Toll (TLRs), reduzindo a atividade do NF-Kb (Van De Vrie et al., 2011). No

coração, sua expressão aumenta após o infarto agudo do miocárdio, provavelmente devido ao infiltrado de células imunes, como evidenciado *no knockout* de Dicer (Da Costa Martins et al., 2008; Van De Vrie et al., 2011). Já o miR-155 está presente em monócitos, células-B e células-T, sendo considerado um miRNA pró-inflamatório, e é produzido em resposta a uma variedade de citocinas. Assim como o miRNA-146, sua expressão está aumentada no infarto miocárdico (Van De Vrie et al., 2011). Além disso, a superexpressão de miR-155 em células NK induz o aumento da expressão de IFN- γ após estímulo com IL-12 e IL-18, funcionando como um modulador positivo da expressão dessa citocina (Trotta et al, 2012). Em adição, pacientes portadores de CCC possuem uma exacerbação da resposta Th1 quando comparados a pacientes indeterminados, sendo esta resposta marcada por uma intensa produção de IFN- γ . A produção persistente desta citocina, apesar de permitir o controle da parasitemia crônica, tem um efeito duplo no miocárdio, induzindo também o dano tecidual por meio do estímulo de citotoxicidade celular e o consequente desenvolvimento de fibrose (Ferreira et al., 2014). Assim, microRNAs pró-inflamatórios desempenham um papel fundamental, porém muitas vezes controverso no miocárdio de pacientes com CCC, já que as respostas induzidas podem ser tanto protetoras, quanto prejudiciais. Ambos miRNAs, miR-146a e 155, também estão significativamente aumentados no miocárdio de camundongos infectados com *T. cruzi* em 15, 30 e 45 dias de infecção (Navarro et al., 2015).

Quanto a arritmia, apesar de apenas um miRNA ter interação direta com essa disfunção, miR-1, observamos que outros microRNAs controlam moléculas como canais iônicos e de matriz, como o colágeno. De fato, miR-1, -

133, -212, -328 e -208a, já foram todos relacionados ao desenvolvimento de arritmias por controlarem a expressão de moléculas como KCNJ2, KCND2, KCNJ2, dentre outros canais e moléculas como conexina43. Essas alterações resultam em comprometimento da condução ao gerar distúrbios nas correntes de sódio, cálcio e potássio, além de disfunções das junções comunicantes (Kim, 2013). A relação entre a expressão de microRNAs e distúrbios de condução também foi observada por nosso laboratório em modelo experimental da infecção aguda por *T. cruzi*, onde 6 microRNAs apresentaram expressão correlacionada ao aumento do intervalo QTc (Navarro et al, 2015). Em CCC, arritmias estão associadas a um pior prognóstico, inclusive tendo o intervalo QT sido sugerido como preditor de risco para mortalidade associada a CCC. Os maiores contribuintes para o desenvolvimento de arritmia em CCC são a miocardite e a fibrose (Barbosa et al, 2015).

É importante destacar a participação dos miomiRs na patologia da CCC. Todos os myomiRs estavam diretamente ligados a pelo menos uma das disfunções relacionadas a CCC e, em alguns casos, a mais de uma. De fato, a deleção do miR-208a no coração de camundongos é suficiente para o desenvolvimento de arritmias, já que o mesmo é necessário para a regulação de moléculas como GATA4 e conexina40 (Callis et al, 2008). A perda da regulação pelo miR-208a leva a um desbalanço entre as miosinas de contratilidade rápida (MYH6) e lenta (MYH7), além de induzir a expressão de genes fetais, alterações também encontradas no miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca (Van Roij et al, 2009; Dirkx, da Costa Martins & De Windt, 2013). Além disso, em um modelo animal onde houve a deleção de TRBP, a indução da expressão de miR-208a foi suficiente para reverter alterações

características de cardiomiopatias dilatadas, como fibrose, hipertrofia e dilatação de câmaras cardíacas (Ding et al, 2015). De forma interessante, camundongos *knockout* para miR-133a-1 ou a-2 são normais quanto a função cardíaca, porém 50% dos camundongos knockouts para ambos os miR-133a morrem e a outra metade desenvolve uma cardiomiopatia do tipo dilatada na fase adulta. Essas alterações estão relacionadas a sua importância no controle da expressão de (SRF) e ciclinaD2, os quais regulam crescimento e proliferação celular, miogênese, além da expressão de outros genes como a alfa-actina de músculo liso (Liu et al, 2008). Em adição, em pacientes com distrofia muscular o processamento de pre-miR-1a miR-1maduro está prejudicado e a expressão de genes como conexina43 e Cav1.2 (canal de cálcio) está aumentada, sendo uma possível causa para as alterações encontradas no miocárdio desses pacientes (Rau et al, 2001). O miR-1 também já foi associado ao desenvolvimento de fibrose e hipertrofia (Li et al, 2014).

Dessa forma, a desregulação da biogênese de microRNAs expõe o miocárdio do paciente chagásico a diversos mecanismos potencialmente patológicos, os quais, ao agirem de forma simultânea, parecem estar intimamente relacionados ao desenvolvimento e progressão da CCC. Vale ressaltar que miocardite, hipertrofia, fibrose e arritmia são alterações que estão interligadas, portanto, miRNAs inicialmente associados a uma disfunção podem contribuir indiretamente para o estabelecimento de outras.

6.3 Potencial mecanismo para redução dos níveis proteicos de Dicer1: papel do estresse oxidativo

Um dos grandes contribuintes para a modificação de proteínas em processos patológicos é o estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio (EROS) são extremamente instáveis e tendem a gerar reações em cadeia ao reagir com outros radicais livres e/ou macromoléculas, produzindo produtos secundários ainda mais danosos ao ambiente celular (Barrera G, 2012). De fato, o estresse oxidativo e os danos causados no miocárdio com CCC vem sendo bastante estudados nos últimos anos. Assim, a produção de EROS na CCC provém de três fontes principais: dano tecidual causado pelo parasita, produção por células do sistema imune, e secundários ao dano mitocondrial (revisado em Gupta; Wen; Garg, 2009).

Ao interagir com células do sistema imune, o *T. cruzi* induz a produção de EROS em células características da imunidade inata, como macrófagos e neutrófilos (células fagocíticas). A produção de EROS a partir da ação de enzimas como NADPH oxidase, também é seguida pela produção de $\bullet\text{NO}$ por enzimas como iNOS. Esse *burst* oxidativo inicial é ainda mais estimulado quando a produção de citocinas e quimiocinas se inicia, como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$, tendo a severidade da cardiopatia em pacientes sido fortemente correlacionada aos níveis circulantes de $\text{TNF-}\alpha$. Em eventos subsequentes, a disfunção mitocondrial, afetando a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa, com consequente vazamento de elétrons contribui para o aumento e manutenção do estresse oxidativo no miocárdio com CCC (Gupta; Wen; Garg, 2009). Em 2005, nosso grupo demonstrou haver uma forte ativação de genes

relacionados à resposta imune, metabolismo lipídico e fosforilação mitocondrial no coração de pacientes com CCC quando comparados a corações com CDI e controle. Importante, 15% de todos os genes com expressão significativamente aumentada eram induzidos por IFN- γ (Cunha-Neto et al., 2005). Além disso, uma redução nos níveis de uma das enzimas chave na geração de ATP, creatina quinase, foi observada por nosso grupo em CCC mas não em CDI (Teixeira et al., 2011). Em adição, uma redução da atividade de complexos respiratórios (CIII e CV) foi demonstrada em modelos murinos crônicos de CCC. Essas alterações levariam a uma reduzida eficiência da produção de ATP e consequente aumento da produção de espécies oxidativas (Vyatkina et al., 2004).

Uma disfunção de mecanismos antioxidantes também está associada ao estabelecimento de um maior estresse oxidativo em pacientes com CCC, caracterizando um cenário de desbalanço entre a produção excessiva de espécies oxidativas e um comprometimento dos mecanismos de defesa contra seus efeitos deletérios (Gupta; Wen; Garg, 2009). Apesar de uma resposta inicial com aumento de sistemas de proteção antioxidante, como glutathiona, ter sido observado em modelos murinos na fase aguda, na fase crônica esse mesmo padrão não se manteve, havendo uma redução desses mecanismos (Wen & Garg, 2004). Além disso, ao estudar o plasma de pacientes com CCC, evidenciou-se uma redução de proteínas antioxidantes como glutathiona (75%) e superóxido dismutase (SOD, 52%), além de um aumento de moléculas envolvidas na produção de EROS e estresse oxidativo (mieloperoxidase, nitrito, peróxidos de lipídio e produtos avançados de oxidação proteica) (Dhiman et al., 2009; Dhiman et al., 2013; Pérez Fuentes et al., 2003; Wen et al., 2006). Assim

o desbalanço oxidativo crônico tornaria o miocárdio de pacientes chagásicos susceptível ao dano molecular e celular causado pelo acúmulo de espécies oxidativas.

Um dos produtos gerados a partir da peroxidação de lipídios de membrana é o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), o qual é utilizado para mensurar o estresse oxidativo em diferentes tecidos. O 4-HNE é uma molécula extremamente reativa que se liga a aminoácidos como cisteína, histidina e lisina resultando em eventos irreversíveis como alquilação e introdução de grupos carbonil. Caso a interação com esses aminoácidos ocorra no sítio ativo da enzima, geralmente ocorre uma redução da atividade da mesma (Schaur, 2003).

Sabendo-se da presença aumentada dos adutos de 4-HNE no miocárdio de pacientes com CCC (Dhiman et al., 2012), decidimos conduzir experimentos adicionais para avaliar uma possível interação entre Dicer1 e 4-HNE, a qual poderia estar levando a uma maior degradação/redução de sua atividade enzimática e contribuindo para o perfil de miRNAs encontrado. Ao realizarmos uma imunoprecipitação para Dicer1 em células H9C2 seguida de *Western-blot* para marcar adutos de 4-HNE, constatamos a interação entre as duas moléculas (Anexo J.b). Em uma perspectiva molecular, o acúmulo de 4-HNE no miocárdio leva a alterações de contratilidade muscular, alterações mitocondriais, equilíbrio redox e afeta a reciclagem de proteínas ao interagir com o proteassoma, além de poder reduzir a atividade da própria ALDH2 ao interagir com seu sítio ativo (Chen et al., 2014). Além disso, proteínas moderadamente modificadas pelo 4-HNE são degradadas pelo sistema proteassoma (Grunie & Davies et al, 2003). Portanto, essa interação poderia

explicar tanto os menores níveis proteicos de Dicer1, como a atividade reduzida observada em nossos experimentos preliminares.

De fato, muito se sabe atualmente sobre o estresse que o miocárdio sofre durante o desenvolvimento de uma cardiomiopatia e o quanto esse estresse estaria relacionado a um aumento na ubiquitinação de proteínas e de sua degradação pelo proteassoma (Wang; Robins et al., 2013). Recentemente, estudo que contou com a participação de nosso grupo demonstrou haver um aumento da expressão do RNAm de componentes do proteassoma e do imunoproteassoma no miocárdio de pacientes com CCC (Ersching et al., 2016). Em adição, dados de proteômica não publicados do nosso grupo mostram existir uma maior expressão de enzimas relacionadas à ubiquitinação e de subunidades do proteassoma em pacientes com CCC (Teixeira, 2009). O tratamento de cardiomiócitos com IFN- γ leva ao aumento da atividade do proteassoma e do imunoproteassoma, com consequente aumento da degradação da cadeia pesada de miosina (Casper et al., 2012). Assim, a produção crônica de IFN- γ no miocárdio de pacientes com CCC também poderia estar relacionada a uma redução na atividade de Dicer devido ao aumento da produção de estresse oxidativo, ubiquitinação proteica e degradação pelo proteassoma.

O acúmulo de 4-HNE no miocárdio de pacientes com CCC parece derivar não só de um aumento na sua produção induzido pelo aumento do estresse oxidativo, mas também de uma redução na expressão e atividade da enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), responsável pelo seu metabolismo (Anexo J.c e .d).

A ALDH2 é uma enzima mitocondrial que faz parte do grupo de defesas desintoxicantes contra moléculas agressoras, sejam elas endógenas ou exógenas. É uma das enzimas envolvidas no metabolismo do álcool, o qual é realizado em duas etapas: álcool a acetaldeído, realizada pela álcool desidrogenase, e acetaldeído a ácido acético, realizado pela ALDH2. Além disso, também é responsável pelo metabolismo de diversos outros aldeídos, como por exemplo, o 4-HNE e o malondialdeído (MDA), os quais são produtos secundários da peroxidação de lipídios de membrana durante o estresse oxidativo e são espécies extremamente tóxicas aos sistemas biológicos (Chen; Sun; Mochly-Rosen, 2010).

Sua relevância médica se concentra inicialmente na mutação ALDH2*2, a qual está presente em até 8% da população mundial, sendo provavelmente a deficiência enzimática de maior ocorrência em todo o mundo (Brooks et al., 2010). Há uma maior frequência dessa mutação na população do leste asiático (japoneses, coreanos, chineses, etc.), aproximadamente 35% a 45% (Dandré; Cassaigne; Iron, 1995). Esta mutação confere uma redução na atividade da enzima e é responsável pelos efeitos tóxicos observados em seus portadores após o consumo de álcool (rubor facial, dores de cabeça, náuseas, tonturas e palpitações) (Chen; Sun; Mochly-Rosen, 2010). Quando em heterozigose (ALDH2*1/*2) espera-se que o portador possua menos de 50% da atividade enzimática ideal, já em indivíduos homozigóticos (ALDH2*2/*2), a atividade enzimática aproxima-se de zero, <1 a 4%. Estudo realizado na população chinesa demonstrou haver um risco 2,88 vezes maior para a população com mutação ALDH2*2 em desenvolver hipertensão do que na população normal. Além disso, o risco era maior na população que consumia

bebidas alcóolicas, revelando uma associação entre o consumo de álcool e doenças cardiovasculares (Chang et al., 2012). Esta mutação também foi associada a uma maior susceptibilidade miocárdica a danos isquêmicos e ao desenvolvimento de cardiomiopatias. A ALDH2 também já foi associada com outras disfunções/doenças como diabetes melitus, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer's), patologias induzidas pelo álcool, anemia de Fanconi, radiodermatite, dor, osteoporose, envelhecimento, toxicidade medicamentosa, dentre outras (Chen et al., 2014).

Tendo isso em vista, aumentar a atividade de uma enzima tão fundamental para os mecanismos primários de defesa celular oxidativa, se torna um mecanismo terapêutico de grande relevância biomédica. De fato, ALDA-1, uma pequena molécula descrita por um grupo em Stanford consegue aumentar a atividade catalítica da ALDH2, aumentando em 11 vezes a atividade da enzima mutante, quando em homozigose, e a níveis normais, quando em heterozigose (Chen et al., 2008). Essa mesma molécula foi testada nos extratos proteicos de algumas de nossas amostras de CCC, e o resultado foi um aumento na atividade enzimática da ALDH2, como pode ser visto no anexo I.d.

Dessa forma, poderíamos hipotetizar um possível mecanismo para as alterações encontradas na CCC, fazendo algumas adaptações ao mecanismo proposto pelo grupo de Nisha Jain Garg (Dhiman et al, 2013). O próprio *T. cruzi*/ou moléculas liberadas em resposta a sua invasão tecidual, padrões moleculares associados a dano (DAMPs) induziriam a produção de EROS de duas formas distintas: (1) em macrófagos e monócitos, através da iniciação do *burst* oxidativo por enzimas como NADPH dependente de oxidase; (2) em

células não-fagocíticas, como os próprios cardiomiócitos, ao gerar um desequilíbrio mitocondrial, com subsequente vazamento de elétrons. Outras espécies reativas também são produzidas durante a infecção, como HOCl por mieloperoxidases e radical •NO pela óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). Ao mesmo tempo, a redução na atividade de enzimas responsáveis pelo combate ao estresse oxidativo como SOD e GPX permite que esses agentes estressores reajam com macromoléculas, induzindo a peroxidação lipídica, gerando produtos secundários como MDA e 4-HNE. A baixa atividade da ALDH2 leva ao acúmulo de 4-HNE o qual interage com cisteínas, lisinas e histidinas das proteínas a deriva no meio celular, dentre elas a Dicer1. Esta interação seria responsável pela redução nos níveis proteicos de Dicer1 observada no miocárdio de pacientes com CCC, tendo como desfecho uma desregulação na produção de miRNAs, caracterizada principalmente por um perfil de miRNAs com expressão diferencial de padrão majoritariamente reduzido, incluindo *myomiRs*. Esta expressão reduzida de diversos miRNAs está associada a desfechos patológicos característicos da CCC, como fibrose, miocardite, arritmia e hipertrofia e parece ter um papel no desenvolvimento/progressão da CCC.

Ressaltamos aqui a compreensão de que diversos outros mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento da CCC como mecanismos imunes relacionados a citotoxicidade, danos microvasculares, mecanismos autoimunes, predisposição genética, dentre outros (Cunha-Neto & Chevillard, 2014). Nosso modelo, é uma forma simplificada de tentar integrar os resultados encontrados e entender/demonstrar sua relevância, devido a expressiva participação de microRNAs no controle da expressão gênica.

6.4 Limitações e garantia da qualidade

Podemos observar algumas limitações durante o desenvolvimento deste trabalho. O n amostral dos controles é menor em relação ao grupo CCC, porém lembramos que estas amostras são bastante valiosas e de difícil obtenção. Além disso a média de idade dos controles (30,5 anos) é significativamente menor que a dos pacientes com CCC (47,4 anos). Entretanto, essa diferença já era esperada, uma vez que mais de 50% dos doadores de coração estão entre 18-34 anos de idade (Kilic et al, 2014). Apesar de os controles serem corações não utilizados para o transplante, os mesmos não apresentavam sinais de alterações cardíacas, possuindo eletrocardiograma normal e área cardíaca normal evidenciada pelo raio-x de tórax. Infelizmente, ecocardiogramas não são realizados no coração dos doadores, e, portanto, estes dados não estavam disponíveis. Os dados fornecidos pela Central de Transplantes da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo estão apresentados no anexo.

Quanto aos experimentos, devido a problemas técnicos, alguns resultados não puderam ser obtidos atempo. Para o western blot de DGCR8, obtivemos resultados conflitantes em 4 réplicas realizadas, portanto, preferimos julgar estes resultados como inconclusivos e não incluí-los no estudo. Quanto aos pré-miRNAs de myomiRs, encontramos problemas com dois lotes diferentes de primers desenhados especificamente para esta finalidade, como *primer dimers* e reconhecimento de mais de um alvo. Dessa forma, apenas o pré-miR-1 pode ser adequadamente avaliado. Entretanto, não acreditamos que a ausência destes resultados comprometam a qualidade do estudo, já que para cada etapa da biogênese analisamos fatores complementares (proteínas e

RNAs) que apontariam para uma possível disfunção. No caso da DGCR8, a não alteração na expressão de pri-miRNAs e de Drosha, bem como de pré-miR-1 apontam para uma não-disfunção na primeira etapa da biogênese, e, portanto, de DGCR8.

Para avaliar uma disfunção global na produção de microRNAs maduros, poderíamos ter usado sequenciamento, técnica padrão-ouro para análises de expressão gênica em larga escala. Com esta técnica, poderíamos ter avaliado outras informações como: uma gama maior de microRNAs, diferença de expressão entre fitas 3p e 5p, além da própria constituição e tamanho de cada microRNA diferencialmente expresso. Devido a fatores como estrutura disponível, tempo e orçamento, optamos por utilizar as placas TLDA para qPCR array, já que elas utilizam a tecnologia Taqman resultando em dados robustos e confiáveis; possuem os microRNAs mais comumente expressos e relevantes para o nosso estudo, incluindo *myomiRs*; além de possuímos expertise no processamento e análise desses dados em nosso laboratório.

No presente estudo, asseguramos a qualidade dos resultados apresentados através de: escolha de endógenos adequados, padronização e otimização de metodologias, utilização de replicatas técnicas, utilização de controles adequados, análise de *outliers* e boas práticas de laboratório. Como exemplo, a escolha do endógeno para miRNAs maduros se baseou nos resultados que obtivemos para o perfil de microRNAs. Em posse desses dados, escolhemos os microRNAs com expressão mais estável entre todas as amostras utilizadas no estudo. Assim, o miR-331 foi escolhido por sua baixa variabilidade de expressão (desvio padrão), comparação entre as médias dos

dois grupos, bem como análise estatística comparando a expressão entre os grupos estudados.

7 CONCLUSÃO

1. Há uma disfunção na etapa citoplasmática da biogênese de miRNAs no miocárdio de pacientes com CCC, caracterizada por uma redução de 2/3 nos níveis proteicos de Dicer1. Não foram encontradas alterações significativas nas etapas nucleares da biogênese: transcrição, edição pri-miRNA a pré-miRNA e transporte núcleo-citoplasma.
2. A redução nos níveis proteicos de Dicer1 resulta em um perfil de microRNAs diferencialmente expressos majoritariamente reduzido (97,5%). Há uma maior redução na produção de fitas 3p do que 5p.
3. Redes de integração miRNA-RNA revelaram haver uma participação dos microRNAs diferencialmente expressos em disfunções características (fibrose, hipertrofia, miocardite, arritmia) do miocárdio de pacientes com CCC, principalmente fibrose.
4. Nossos dados preliminares sugerem a formação de adutos Dicer1-4-HNE, decorrentes de um desbalanço entre mecanismos oxidantes/antioxidantes, como uma possível causa para as alterações observadas.

A figura 9 apresenta um resumo dos principais achados do nosso estudo.

Figura 9 - Representação gráfica da biogênese de microRNAs na CCC. Há uma menor expressão proteica de Dicer1, a qual leva um perfil global de redução na expressão de microRNAs. a) Transcrição: a expressão de pri-miRNAs de myomiRs não está alterada na CCC. b) Etapa nuclear de edição e transporte núcleo-citoplasma estão preservados em pacientes com CCC. c) Há uma disfunção na etapa citoplasmática da biogênese de microRNAs, caracterizada por uma menor expressão proteica de Dicer1. d) Perfil de microRNAs diferencialmente expressos em CCC é afetado pela disfunção de Dicer1.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados possuem relevância não só devido ao impacto biológico de uma disfunção na produção de reguladores finos da expressão gênica, mas também devido às novas perguntas e possibilidades que eles representam.

1- Estudamos as alterações no miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca terminal, portanto, seria interessante estudar essas alterações em outros contextos clínicos da CCC, bem como em modelos animais que reproduzam tanto as suas características agudas quanto crônicas. Dessa forma, poderemos melhor compreender o estabelecimento da disfunção, sua temporalidade dentro da história natural da CCC e qual o seu impacto para o desenvolvimento/progressão da doença.

2- Podemos hipotetizar que uma menor expressão proteica de Dicer1 seja um mecanismo comum entre cardiomiopatias de diferentes etiologias, já que o acúmulo de 4-HNE já foi demonstrado em outros modelos.

3- Percebemos ainda o quão importante o estresse oxidativo, tanto proveniente do sistema imune como de uma disfunção mitocondrial, podem ser cruciais nos eventos patológicos subsequentes em CCC. Dessa forma, podemos pensar em diferentes etapas que poderiam ser estudadas como novos alvos terapêuticos para CCC e talvez para outras cardiomiopatias: disfunção mitocondrial e estresse oxidativo; defesas antioxidantes (atividade reduzida de ALDH2); expressão/atividade de Dicer1; e até mesmo a utilização de miRNAs, como o 208a, como forma de terapia de reposição.

4- Por fim, as evidências que levantamos da interação Dicer1-4-HNE ainda são muito superficiais e faz-se necessário conduzir estudos moleculares para compreender o efeito dessa interação para a estabilidade proteica e para a atividade da enzima.

10 REFERÊNCIAS

- Albinsson S, Skoura A, Yu J, DiLorenzo A, Fernandez-Hernando C, Offermanns S, et al. Smooth muscle mirnas are critical for post-natal regulation of blood pressure and vascular function. *PloS one*. 2011;6(4):e18869.
- Ali Sheikh MS, Salma U, Zhang B, Chen J, Zhuang J, Ping Z. Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Value of Circulating miRNAs in Heart Failure Patients Associated with Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:5893064.
- Ameyar-Zazoua M, Rachez C, Souidi M, Robin P, Fritsch L, Young R, et al. Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012;19:998–1004.
- Anglesio MS, Wang Y, Yang W, Senz J, Wan A, Heravi-Moussavi A, et al. Cancer-associated somatic DICER1 hotspot mutations cause defective miRNA processing and reverse-strand expression bias to predominantly mature 3p strands through loss of 5p strand cleavage. *J. Pathol.* 2013;229:400–409.
- Baccal F & Bocci E. Cardiac transplantation for Chagas' disease. *RevInsufCardiaca*.2008; 3(2):85-87
- Barbosa MP, Carmo AA, Rocha MO & Ribeiro AL.Ventricular arrhythmias in Chagas disease.Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(1):4-10.
- Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncol*. 2012; 2012: 137289.
- Bartel DP. MiRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
- Bartram MP, Dafinger C, Habbig S, Benzing T, Schermer B, Müller R-U. Loss of Dgcr8-mediated miRNA expression in the kidney results in hydronephrosis and renal malformation. *BMC Nephrology*. 2015;16:55.

Bennasser Y, Chable-Bessia C, Triboulet R, Gibbings D, Gwizdek C, Dargemont C, et al. Competition for XPO5 binding between Dicer RNAi, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011;18:323–327.

Bocchi E, Fiorelli A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. First Guidelines Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of Cardiology. *Ann Thorac Surg.* 2001; 71 (6): 1833-8.

Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, et al. A population-based study of the 22q11.2 deletion: Phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics.* 2003;112(1 Pt 1):101-107.

Brooks PJ, Enoch M-A, Goldman D, Li T-K, Yokoyama A. The Alcohol Flushing Response: An Unrecognized Risk Factor for Esophageal Cancer from Alcohol Consumption. *PLoS Medicine.* 2009;6(3):e1000050.

Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang R-H, Tatsuguchi M, Huang Z-P, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of Clinical Investigation.* 2009;119(9):2772-2786.

Callis TE, Wang DZ. Taking miRNAs to heart. *Trends in molecular medicine.* 2008;14(6):254-260.

Cardillo F, de Pinho RT, Antas PRZ, Mengel J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. Bozza P, ed. *Pathogens and Disease.* 2015;73(9):ftv082.

Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. MiRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature medicine.* 2007;13(5):613-618.

- Casey KL, Sharifi HJ, Wen X, Flagg M, Furuya AK, Nekorchuk M, et al. The HIV-1 protein Vpr targets the endoribonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection. *Virology*. 2013;444:191–202.
- Chang Y-C, Chiu Y-F, Lee I-T, Ho LT, Hung YJ, Hsiung CA, et al. Common *ALDH2* genetic variants predict development of hypertension in the SAPHIRE prospective cohort: Gene-environmental interaction with alcohol consumption. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2012;12:58.
- Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D. An Activator of Mutant and Wildtype Aldehyde Dehydrogenase Reduces Ischemic Damage to the Heart. *Science (New York, NY)*. 2008;321(5895):1493-1495.
- Chen C-H, Ferreira JCB, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting Aldehyde Dehydrogenase 2: New Therapeutic Opportunities. *Physiological Reviews*. 2014;94(1):1-34.
- Chen C-H, Sun L, Mochly-Rosen D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovascular Research*. 2010;88(1):51-57.
- Chen C, Wang Y, Yang S, Li H, Zhao G, Wang F, et al. MiR-320a contributes to atherogenesis by augmenting multiple risk factors and down-regulating SRF. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2015;19(5):970-985.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of miRNA-1 and miRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics*. 2006;38(2):228-233.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(6):2111-2116.

Clayton J. Chagas disease 101. *Nature*. 2010;465:S4-5.

Connor AM, Mahomed N, Gandhi R, Keystone EC, Berger SA. TNF α modulates protein degradation pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy*. 2012;14(2):R62.

Cosper PF, Harvey PA, Leinwand LA. Interferon- γ Causes Cardiac Myocyte Atrophy via Selective Degradation of Myosin Heavy Chain in a Model of Chronic Myocarditis. *The American Journal of Pathology*. 2012;181(6):2038-2046.

Coura JR, Vinas PA. Chagas disease: A new worldwide challenge. *Nature*. 2010;465:S6-7.

Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:683230.

Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatou D, Benvenuto L, Higuchi ML, et al.. Cardiac Gene Expression Profiling Provides Evidence for Cytokinopathy as a Molecular Mechanism in Chagas' Disease Cardiomyopathy. *The American Journal of Pathology*. 2005;167(2):305-313.

Da Costa Martins PA, Bourajaj M, Gladka M, Kortland M, van Oort RJ, Pinto YM, et al.. Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation*. 2008 Oct 7;118(15):1567-76.

Dandré F, Cassaigne A, Iron A. The frequency of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase I2 (atypical) allele in Caucasian, Oriental and African black populations determined by the restriction profile of PCR-amplified DNA. *Mol Cell Probes*. 1995 Jun;9(3):189-93.

- Davies BP, Arenz C. A fluorescence probe for assaying micro RNA maturation. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16(1):49-55.
- Davis BN, Hata A. Regulation of miRNA biogenesis: A myriad of mechanisms. *Cell communication and signaling*. 2009;7:18.
- De Araujo FF, Nagarkatti R, Gupta C, Marino AP, Debrabant A. Aptamer-Based Detection of Disease Biomarkers in Mouse Models for Chagas Drug Discovery. P. Pollastri M, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(1):e3451.
- Dhiman M, Estrada-Franco JG, Pando JM, Ramirez-Aguilar FJ, Spratt H, Vazquez-Corzo S, et al. Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;16(5):660–666.
- Dhiman M, Zago MP, Nunez S, Amoroso A, Rementeria H, Dousset P, et al. Cardiac-Oxidized Antigens Are Targets of Immune Recognition by Antibodies and Potential Molecular Determinants in Chagas Disease Pathogenesis. *PLoS ONE*. 2012;7(1):e28449.
- Dias JC, Ramos AN Jr, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(1):3-60
- Ding J, Chen J, Wang Y, Kataoka M, Ma L, Zhou P, et al.. Trbp regulates heart function through miRNA-mediated Sox6 repression. *Nature genetics*. 2015;47(7):776-783.
- Dipla K, Mattiello JA, Jeevanandam V, Houser SR, Margulies KB. Myocyte recovery after mechanical circulatory support in humans with end-stage heart failure. *Circulation*. 1998;97(23):2316-2322.

- Dirkx E, da Costa Martins PA & De Windt LJ. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1832(12):2414-24.
- Drake M, Furuta T, Suen KM, Gonzalez G, Liu B, Kalia A, et al. A requirement for ERK-dependent Dicer phosphorylation in coordinating oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *Dev. Cell*. 2014;31:614–628.
- Dvinge H & Bertone P. HTqPCR: High - throughput analysis and visualization of quantitative real - time PCR data in R. *Bioinformatics*. 2009;25(24),3325.
- Ersching J, Vasconcelos JR, Ferreira CP, Caetano BC, Machado AV, Bruna-Romero O, et al.. The Combined Deficiency of Immunoproteasome Subunits Affects Both the Magnitude and Quality of Pathogen- and Genetic Vaccination-Induced CD8⁺ T Cell Responses to the Human Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*. 2016;12(4):e1005593.
- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of mirna-mediated gene silencing. *Cell*. 2008;132(1):9-14.
- Fan P, Chen Z, Tian P, Liu W, Jiao Y, Xue Y, et al.. miRNA Biogenesis Enzyme Drosha Is Required for Vascular Smooth Muscle Cell Survival. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60888.
- Ferreira LR, Ferreira FM, Nakaya HI, Deng X, Cândido DD, de Oliveira LC, et al. Blood Gene Signatures of Chagas Cardiomyopathy With or Without Ventricular Dysfunction. *J Infect Dis*. 2017;215(3):387-395.
- Ferreira LR, Frade AF, Santos RH, Teixeira PC, Baron MA, Navarro IC, Benvenuti LA, Fiorelli AI, Bocchi EA, Stolf NA, Chevillard C, Kalil J, Cunha-Neto E. MiRNAs mir-1, mir-133a, mir-133b, mir-208a and mir-208b are dysregulated in chronic chagas disease cardiomyopathy. *International journal of cardiology*. 2014;175(3):409-417.

Ferreira LRP, Frade AF, Baron MA, Navarro IC, Kalil J, Chevillard C, et al.. Interferon- γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. *World Journal of Cardiology*. 2014;6(8):782-790.

Fildes JE, Shaw SM, Yonan N, Williams SG. The immune system and chronic heart failure: is the heart in control?. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(12):1013-20.

Fiorelli AI, Santos RH, Oliveira JL Jr, Lourenço-Filho DD, Dias RR, Oliveira AS, et al. Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease. *Transplant Proc*. 2011;43(1):220-4.

Fiorillo AA, Heier CR, Novak JS, Tully CB, Brown KJ, Uaesoontrachoon K, et al.. TNF α -induced miRNAs control dystrophin expression in Becker muscular dystrophy. *Cell reports*. 2015;12(10):1678-1690.

Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):126-39.

Frade AF, Laugier L, Ferreira LR, Baron MA, Benvenuti LA, Teixeira PC, et al. Myocardial Infarction-Associated Transcript, a Long Noncoding RNA, Is Overexpressed During Dilated Cardiomyopathy Due to Chronic Chagas Disease. *J Infect Dis*. 2016;214(1):161-5.

Frade AF, Pissetti CW, Ianni BM, Saba B, Lin-Wang HT, Nogueira LG, et al. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infect Dis* (2013) 13:587.

Francia S, Michelini F, Saxena A, Tang D, de Hoon M, Anelli V, et al. Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature*. 2012;488:231–235.

Ghodgaonkar MM, Shah RG, Kandan-Kulangara F, Affar EB, Qi HH, Wiemer E, et al. Abrogation of DNA vector-based RNAi during apoptosis in mammalian cells due to caspase-mediated cleavage and inactivation of Dicer-1. *Cell Death Differ.* 2009;16:858–868.

Gibbings D, Mostowy S, Jay F, Schwab Y, Cossart P, Voinnet O. Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nature cell biology.* 2012;14(12):1314-1321.

Gross TJ, Powers LS, Boudreau RL, Brink B, Reisetter A, Goel K, et al. A microRNA processing defect in smokers' macrophages is linked to SUMOylation of the endonuclease DICER. *J. Biol. Chem.* 2014;289:12823–12834.

Grune T & Davies KJ. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol Aspects Med.* 2003; 24(4-5):195-204.

Ha M, Kim VN. Regulation of miRNA Biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Aug;15(8):509-24.

Haussecker D, Proudfoot NJ. Dicer-dependent turnover of intergenic transcripts from the human beta-globin gene cluster. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25:9724–9733.

Jude JA, Dileepan M, Subramanian S, Solway J, Panettieri RA Jr, Walseth TF, et al.. miR-140-3p regulation of TNF- α -induced CD38 expression in human airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2012;303(5):L460-L468.

Kim GH. MicroRNA Regulation of Cardiac Conduction and Arrhythmias. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine.* 2013;161(5):381-392.

Kim GH. MiRNA regulation of cardiac conduction and arrhythmias. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2013;161(5):381-392.

Kim VN. MiRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2005;6(5):376-385.

Kim Y-K, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of *DROSHA*, *Exportin 5*, and *DICER* in miRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(13):E1881-E1889.

Kim YS, Kim H-R, Kim H, Yang SC, Park M, Yoon JA, et al.. Deficiency in DGCR8-dependent canonical miRNAs causes infertility due to multiple abnormalities during uterine development in mice. *Scientific Reports*. 2016;6:20242.

Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of miRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews. Genetics*. 2010;11:597-610.

Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, et al. The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(9):4365-4380.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific miRNAs from mouse. *Current biology : CB*. 2002;12(9):735-739.

Laugier L, Frade AF, Ferreira FM, Baron MA, Teixeira PC, Cabantous S, et al. Whole genome Cardiac DNA methylation fingerprint and gene expression analysis provide new insights in the pathogenesis of Chronic Chagas disease Cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*. 2017 [Epub ahead of print].

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):843-854.

Li J, Dong X, Wang Z & Wu J. MicroRNA-1 in Cardiac Diseases and Cancers. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2014;18(5):359-363.

Lindsay MA. miRNAs and the immune response. *Trends Immunol*. 2008 Jul;29(7):343-51.

Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & Development*. 2008;22(23):3242-3254.

Lu J & Clark AG. Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome Research*. 2012;22(7):1243-1254.

Mady C, Cardoso RH, Barretto AC, da Luz PL, Bellotti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to chagas' cardiomyopathy. *Circulation*. 1994;90(6):3098-3102.

Magenta A, Greco S, Gaetano C, Martelli F. Oxidative Stress and MiRNAs in Vascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(9):17319-17346.

Massad E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiology and Infection*. 2008;136(9):1153-1164.

Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Nascimento MS, Do-Valle-Matta MA, Silva JS. Antiparasitical chemotherapy in chagas' disease cardiomyopathy: Current

evidence. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2012;17(9):1057-1065.

Morilla MJ, Romero EL. Nanomedicines against chagas disease: An update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine*. 2015;10(3):465-481.

Murchison EP, Stein P, Xuan Z, Pan H, Zhang MQ, Schultz RM, et al. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev*. 2007;21:682–693.

Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, Lisanti MP, Weiss LM, Garg NJ, Tanowitz HB. Mechanisms of trypanosoma cruzi persistence in chagas disease. *Cellular microbiology*. 2012;14(5):634-643.

Nagarkatti R, de Araujo FF, Gupta C, Debrabant A. Aptamer Based, Non-PCR, Non-Serological Detection of Chagas Disease Biomarkers in *Trypanosoma cruzi* Infected Mice. Burleigh BA, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(1):e2650.

Navarro, I.C. et al.. MiRNA Transcriptome Profiling in Heart of *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice: Parasitological and Cardiological Outcomes. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2015;9(6):e0003828.

Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL, Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of C. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(9):767-776.

O'Reilly S. MicroRNAs in fibrosis: opportunities and challenges. *Arthritis Research & Therapy*. 2016;18:11.

Opperman CM1, Sishi BJ. Tumor necrosis factor alpha stimulates p62 accumulation and enhances proteasome activity independently of ROS. *Cell Biol Toxicol*. 2015;31(2):83-94.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory rna. *Nature*. 2000;408(6808):86-89.

Pérez-Fuentes R, Guégan J-F, Barnabé C, López-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically individuals. *International Journal for Parasitology*. 2003;33(3):293–299.

Petherick A. Country by country. *Nature*. 2010;465(7301):S10-11.

Pinho RT, Waghabi MC, Cardillo F, Mengel J, Antas PRZ. Scrutinizing the Biomarkers for the Neglected Chagas Disease: How Remarkable! *Frontiers in Immunology*. 2016;7:306.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of chagas disease. *The Lancet. Infectious diseases*. 2001;1(2):92-100.

Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, et al.. Loss of cardiac miRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circulation research*. 2009;105(6):585-594.

Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin JP, Fischer MC, Jost B et al. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat StructMol Biol*. 2011 Jun 19;18(7):840-5.

Redfern AD, Colley SM, Beveridge DJ, Ikeda N, Epis MR, Li X, et al. RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2013;110:6536–6541.

- Reinsbach S1, Nazarov PV, Philippidou D, Schmitt M, Wienecke-Baldacchino A, Muller A, et al.. Dynamic regulation of miRNA expression following interferon- γ -induced gene transcription. *RNA Biol.* 2012 Jul;9(7):978-89.
- Ren X-P, Wu J, Wang X, et al.. MiRNA-320 is Involved in the Regulation of Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Targeting Hsp20. *Circulation.* 2009;119(17):2357-2366.
- Ribeiro G, Jr., Gurgel-Goncalves R, Reis RB, Santos CG, Amorim A, Andrade SG, Reis MG. Frequent house invasion of trypanosoma cruzi-infected triatomines in a suburban area of brazil. *PLoS neglected tropical diseases.* 2015;9(4):e0003678
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research.* 2015; 43(7),e47.
- Rodriguez-Zanella H, Melendez-Ramirez G, Meave A, Alexanderson E. Ecg score correlates with myocardial fibrosis assessed by magnetic resonance: A study in chagas heart disease. *International journal of cardiology.* 2015;187:78-79.
- Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. MiRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart.* 2015;101(12):921-928.
- Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.* 2003;24(4-5):149-59.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time pcr data by the comparative c(t) method. *Nature protocols.* 2008;3(6):1101-1108

- Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Filipowicz W, Svoboda P. Dicer is associated with ribosomal DNA chromatin in mammalian cells. *PLoS One*. 2010;5:e12175.
- Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the rna-interference code. *Nature*. 2009;457(7228):396-404.
- Teixeira PC, Santos RHB, Fiorelli AI, Bilate AM, Benvenuti LA, Stolf NA, et al.. Selective Decrease of Components of the Creatine Kinase System and ATP Synthase Complex in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(6):e1205.
- Teixeira PC. Análise proteômica no miocárdio de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica: alterações no metabolismo energético cardíaco [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.
- Thermo Scientific. 260/280 and 260/230 ratios. Technical Bulletin: T009.
- Thum T1, Catalucci D, Bauersachs J. MiRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res*. 2008;79(4):562-70.
- Tijssen AJ1, Pinto YM, Creemers EE. Non-cardiomyocyte miRNAs in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2012 Mar 15;93(4):573-82.
- Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circulation research*. 2016;118(6):1021-1040.
- Uellendahl M, de Siqueira MEM, Calado EB, Kalil-Filho R, Sobral D, Ribeiro C, et al. Cardiac Magnetic Resonance-Verified Myocardial Fibrosis in Chagas Disease: Clinical Correlates and Risk Stratification. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2016;107(5):460-466.
- Van de Vrie M, Heymans S, Schroen B. MiRNA Involvement in Immune Activation During Heart Failure. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2011;25-25(2):161-170.

van Rooij E, Olson EN. MiRNAs: Powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(9):2369-2376.

Van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland L B, Qi X, Richardson JA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental cell*. 2009;17(5):662-673.

van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive miRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(48):18255-18260.

Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of miRNAs after myocardial infarction reveals a role of mir-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(35):13027-13032.

Van Rooij E. Introduction to the series on miRNAs in the cardiovascular system. *Circulation research*. 2012;110(3):481-482.

Van Rooij E. The art of miRNA research. *Circulation research*. 2011;108(2):219-234.

Vegter EL, van der Meer P, de Windt LJ, Pinto YM, Voors AA. MiRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy. *Eur J Heart Fail*. 2016 May;18(5):457-68.

Vyatkina G, Bhatia V, Gerstner A, Papaconstantinou J, Garg N. Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004;1689(2):162–173.

- Wang J, Liew OW, Richards AM, Chen Y-T. Overview of MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Apoptosis. Cho WC, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(5):749.
- Wang X, Robbins J. Proteasomal and Lysosomal Protein Degradation and Heart Disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014;0:16-24.
- Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for miRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics*. 2007;39(3):380-385.
- Wen J-J & Garg N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of *Trypanosoma cruzi* infection. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;37(12):2072–2081.
- Wen J-J, Yachelini PC, Sembaj A, Manzur RE, Garg NJ. Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;41(2):270–276.
- Willeit P1, Zampetaki A, Dudek K, Kaudewitz D, King A, Kirkby NS, et al..Circulating miRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ Res*. 2013 Feb 15;112(4):595-600.
- Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer–TRBP complex formation ensures accurate mammalian miRNA biogenesis. *Molecular cell*. 2015;57(3):397-407.
- Wu Q, Song R, Ortogero N,Zheng H, Evanoff R, Small CL, et al.. The RNase III Enzyme DROSHA Is Essential for MiRNA Production and Spermatogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(30):25173-25190

Zhang H, Zhang P, Ma KJ, Lv YH, Li WC, Luo CL, et al. The selection of endogenous genes in human postmortem tissues. *Science & justice : journal of the Forensic Science Society*. 2013;53(2):115-120.

Zhang Z, Convertini P, Shen M, Xu X, Lemoine F, de la Grange P, et al.. Valproic Acid Causes Proteasomal Degradation of DICER and Influences miRNA Expression. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e82895.

ANEXO A- Aprovação pelo comitê de ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

4344/16/010

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da Biogênese de miRNAs na Cardiopatia Chagásica Crônica

Pesquisador: Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54013516.8.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.480.717

Apresentação do Projeto:

As amostras de miocárdio que serão analisadas neste estudo foram obtidas através de uma colaboração entre o Laboratório de Imunologia e a equipe de transplantes do Centro Cirúrgico do INCOR-HC, apresenta aprovação da Comissão Científica do INCOR-HC (SDC 2667/05/087), pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP e da Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n 852/05). O objetivo do estudo está claro, pertence a linha de pesquisa dos pesquisadores e apresenta relevância para a prática médica.

Objetivo da Pesquisa:

No presente projeto os pesquisadores pretendem estudar a relevância biológica da biogênese de miRNAs para a patogênese da cardiopatia chagásica crônica. No projeto serão analisadas amostras do tecido miocárdico de pacientes com CCC, CDI e CI submetidos a transplante cardíaco) e de corações de doadores de órgãos (que por motivos técnicos não foram utilizados para transplante). Serão realizadas a caracterização e comparação do perfil de expressão dos seguintes marcadores myomiRs, seus pri e premiRNAs: miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a, miR-208b, miR-126, miR-302a-302d, miR-367, e avaliação da expressão gênica e proteica dos seguintes componentes da biogênese de miRNAs: Drosha, DGCR8, Ran-GTP, Exp-5, Dicer, PACT, TRBP e AGO2.

Endereço: Rua Ovidio Pires da Campos, 225 5º andar

Bairro: Carqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO B- Dados clínicos referentes aos controles que tiveram amostras incluídas no estudo.

Tabela 1 – Dados sociodemográficos e clínicos dos controles não-cardiomiopatas incluídos no estudo.

Amostra	Colunas1	Etnia	Idade	Tipo sanguíneo	Tabagismo	Causa de Morte	Motivo de Recusa	Tempo de morte	Medicamentos	Pressão	Rx tórax
ZFS	M	-	45	-	-	-	-	-	-	-	-
ESS	M	Branco	22	A	Não	PAF	Instabilidade hemodinâmica	8 dias	Noradrenalina	130/80	Normal
LO	M	Branco	46	B	Não	AVCH	Instabilidade hemodinâmica	6 dias	-	140/80	Normal
MBFM	M	Branco	17	A	Sim	TCE	Incompatibilidade anatômica	-	Noradrenalina	123/78	Normal
FJR	M	Branco	28	O	Não	AVCH	Incompatibilidade anatômica	2 dias	-	130/60	Normal
EMBT	M	Pardo	25	A	Sim	PAF	-	1 dia	-	150/73	Normal

Fonte Própria. PAF= Lesão Produzida por Projétil de Arma de Fogo, AVCH = Acidente vascular cerebral hemorrágico, TCE = Traumatismo crânioencefálico, Rx = Raio x, ECG = Eletrocardiograma.

ANEXO C- Dados clínicos referentes aos pacientes CCC com amostras incluídas no estudo.

Tabela 2 – Dados sociodemográficos e clínicos de pacientes com CCC incluídos no estudo.

Amostra	Sexo	Etnia	Tabagismo	Tipo Sanguíneo	FE (%)	DDVE (mm)
OMG	M	Parda	Sim	O+	21	57
LRJ	F	Parda	Não	A+	25	67
MAP	F	ND	Não	A+	23	61
ABG	F	Branca	Sim	O+	30	68
PMG	M	ND	ND	O-	29	71
EBS	M	ND	ND	A-	12	75
HBO	M	ND	ND	A+	25	68
GMS	M	Branca	Não	A+	20	73
MCRS	M	Branca	Não	A+	20	74
ECA	F	Branca	Não	O+	19	69
AFS	M	ND	Não	A+	21	
EAS	M	Branca	Não	B+	29	72
EPG	M	Branca	Não	AB+	23	65
JRJ	M	Branca	Sim	A-	23	72
APA	F	ND	ND	O+	20	
AAF	F	ND	ND	O+	27	77

Fonte Própria. FE = Fração de ejeção, DDVE = Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, ND= Não disponível

ANEXO D- Medicamentos em uso por pacientes com CCC

Tabela 3- Principais medicamentos em uso no dia do transplante por pacientes com CCC incluídos no estudo.

MEDICAMENTOS	Nº DE PACIENTES
Azatioprina	15
Furosemida	15
Metilprednizolona	15
Dipirona	13
Dobutamina	13
Omeprazol	12
Espironolactona	10
Heparina sódica	9
Glicose	8
Metoclopramida	8
Milirinona	8
Bromopride	7
Nitroprussiato de sódio	7
Tramadol	7
Amiodarona	6
Bromazepan	6
Cloreto de potássio	6
Insulina humana	6
Lactulose	6
Norepinefrina	6
Brasiliximab	5
Hidralazina	5
Enoxaparina	4
Hidroclorotiazida	4
Ondansetron	4
Sulfato de magnésio	4
Vancomicina	4
Ácido acetilsalicílico	3
Captopril	3
Ciclosporina	3

ANEXO E - Análise da qualidade das extrações e integridade do RNA

Tabela 4 - Concentração, razão 260/280 e RIN das amostras incluídas no estudo.

Amostras	Grupo Clínico	ng/uL	260/280	RIN	ng/uL	260/280
ZFS	Controle	441.00	2.05	7.80	204.20	2.03
ESS	Controle	236.20	2.12	8.10	42.70	1.97
LO	Controle	135.60	2.04	7.90	56.20	2.04
MBFM	Controle	285.40	2.03	7.20	90.40	2.02
FJR	Controle	382.10	2.06	7.70	76.40	2.09
EMBT	Controle	468.40	1.98	8.20	121.30	2.00
OMG	CCC	194.00	2.06	7.90	54.30	1.96
LRJ	CCC	172.90	2.10	7.50	125.90	2.14
MAP	CCC	298.20	2.04	8.00	100.50	1.95
ABG	CCC	310.70	2.09	8.00	120.60	2.01
PMG	CCC	371.60	2.03	6.90	78.00	2.02
EBS	CCC	284.60	1.99	7.60	79.50	2.00
HBO	CCC	563.80	2.12	6.90	225.50	1.01
GMS	CCC	543.90	2.13	7.70	200.80	1.70
MCRS	CCC	351.7	2.07	6.20	131.9	1.05
ECA	CCC	341.70	2.11	7.10	151.4	1.07
AFS	CCC	486.30	2.08	6.70	460.70	1.05
EAS	CCC	650.30	2.11	6.60	183.60	1.04
EPG	CCC	512.7	2.05	7.30	158.70	2.01
JRJ	CCC	708.50	2.12	7.50	254.40	2.05
APA	CCC	392.70	2.10	8.10	102.70	1.04
AAF	CCC	253.30	2.11	8.30	127.50	2.00
Média		376.06	2.07	7.51	143.20	1.74
Mínimo		135.60	1.98	6.20	42.70	1.01
Máximo		708.50	2.13	8.30	460.70	2.14

Fonte: própria. RNAm = RNA mensageiro, RIN= *RNA Integrity Number*. Em negrito estão a média, o valor máximo e o valor mínimo para cada variável.

ANEXO F- Representação gráfica dos géis de eletroforese capilar das amostras utilizadas no estudo

Fonte: Própria. Representações gráficas das corridas eletroforéticas capilares realizadas pelo aparelho 2100 Bioanalyzer. As amostras controle estão destacadas em negrito e com um asterisco.

ANEXO G – Eficiência dos primers para HPRT1 e hsa-miR-1 nas amostras do estudo

hsa-miR-1

HPRT1

Fonte: Própria. Os primers tiveram suas eficiências determinadas em um pool de amostras. Para o hsa-miR-1 a faixa de concentração foi de 12,5 ng/uL a 0,000125ng/uL, fator de diluição 10. Para o HPRT1 a faixa de concentração foi de 140ng/uL a 2,18ng/uL, fator de diluição 2. No gráfico estão plotados os Ct vs o Log da concentração para cada um dos pontos.

ANEXO H – Estatística descritiva para os genes normalizadores testados no estudo

Tabela 5 – Análise estatística descritiva dos Cts dos genes endógenos normalizadores utilizados no estudo.

Amostra	Endógeno		Geral	Controle	CCC
RNA	HPRT1	Desvio Padrão	0.486	0.364	0.494
		Média	28.149	28.429	28.044
	ACTB	Desvio Padrão	0.751	0.450	0.779
		Média	20.154	19.696	20.326
	PPIA	Desvio Padrão	0.545	0.871	0.401
		Média	24.277	24.348	24.250
	3 endógenos	Desvio Padrão	0.387	0.242	0.436
		Média	24.193	24.157	24.206
miRNA	RNU44	Desvio Padrão	1.604	2.319	1.186
		Média	27.538	28.397	27.217
	RNU48	Desvio Padrão	1.294	1.630	1.114
		Média	26.573	27.203	26.337
	miR-331	Desvio Padrão	0.668	0.524	0.714
		Média	24.651	24.855	24.575
	3 endógenos	Desvio Padrão	26.254	1.303	0.830
		Média	1.011	26.818	26.043

Fonte: Própria. Para as análises de RNA e miRNA, três endógenos foram testados. Na tabela apresentamos os valores de desvio padrão e média por grupo clínico e geral para cada endógeno e para a média deles. O melhor resultado, menor desvio e menor diferença entre as médias, foi utilizado. Em negrito estão destacados os endógenos que foram escolhidos como normalizadores para os ensaios com RNAs e miRNAs.

ANEXO I – Imagens dos Western blots para biogênese de miRNAs

ANEXO J – Resultado s preliminares para possível mecanismo da redução de Dicer1

Fonte: Própria. Dados preliminares demonstrando possível mecanismo para a redução dos níveis proteicos de Dicer1 no miocárdio de pacientes com CCC. a) Atividade de Dicer-1 está reduzida no miocárdio de pacientes com CCC ao serem comparados com pacientes não-cardiomiopatas. b) Interação Dicer1-4-HNE em células H9C2, obtida a partir de imunoprecipitação de Dicer1 seguida por marcação para adutos de 4-HNE. c) Reduzida Expressão de ALDH2 no miocárdio de pacientes com CCC. d) A atividade de ALDH2 em extratos de pacientes cm CCC é aumentada pelo tratamento com ALDA-1 para níveis comparáveis aos dos controles.

ANEXO K – Atividades realizadas durante o mestrado

1- Participou de diversos cursos, incluindo:

- 2016 Harvard-Brazil Collaborative Course in Public Health. Fortaleza, Ceará, Janeiro de 2016. 120 horas.
- São Paulo School of Advanced Sciences on Neglected Diseases Drug Discovery – focus on Kinetoplastids (SPSAS-ND3). CNPEM, Campinas, São Paulo. Junho de 2015. 96 horas.
- Curso de inverno do IQ-USP - Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular. Julho de 2015. 80 horas.
- Redação Científica: Bases Teóricas e Metodológicas. FSP-USP. São Paulo. Janeiro de 2016. 24 horas.
- X Curso de Patogênese Avançada do HIV. FMUSP. São Paulo. Abril de 2015. 40 horas.

2- Participou do The Non-Coding Genome no *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), em Heidelberg, Alemanha. Outubro de 2015. Tendo apresentado o trabalho: MiRNAs and Gene expression Networks in Human Chronic Chagas Cardiomyopathy.

3- Participou do 2016 Cardiovascular Development Meeting em Newcastle, UK. Novembro de 2016. Apresentou o trabalho derivado de seu projeto de mestrado: MiRNA biogenesis is dysregulated in Idiopathic Dilated and Chagas Cardiomyopathies.

4- Participou do evento FOCIS goes South – Chilean Workshop, Santiago – Chile, maio de 2017.

-
- 5- Realizou revisão de artigos para revista como a Oncotarget (Fator de impacto 5.169).
 - 6- Publicou dois artigos relacionados às atividades desenvolvidas no laboratório de Imunologia do InCor no *The Journal of Infectious Diseases* (Fator de Impacto 6.3). Além de outros trabalhos não diretamente relacionados ao mestrado (em anexo).

ANEXO L – Artigos Publicados durante o Mestrado

The Journal of Infectious Diseases

BRIEF REPORT

Myocardial Infarction-Associated Transcript, a Long Noncoding RNA, Is Overexpressed During Dilated Cardiomyopathy Due to Chronic Chagas Disease

Amélia Farago Frade,^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690,691,692,693,694,695,696,697,698,699,700,701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720,721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,738,739,740,741,742,743,744,745,746,747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765,766,767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,777,778,779,780,781,782,783,784,785,786,787,788,789,790,791,792,793,794,795,796,797,798,799,800,801,802,803,804,805,806,807,808,809,810,811,812,813,814,815,816,817,818,819,820,821,822,823,824,825,826,827,828,829,830,831,832,833,834,835,836,837,838,839,840,841,842,843,844,845,846,847,848,849,850,851,852,853,854,855,856,857,858,859,860,861,862,863,864,865,866,867,868,869,870,871,872,873,874,875,876,877,878,879,880,881,882,883,884,885,886,887,888,889,890,891,892,893,894,895,896,897,898,899,900,901,902,903,904,905,906,907,908,909,910,911,912,913,914,915,916,917,918,919,920,921,922,923,924,925,926,927,928,929,930,931,932,933,934,935,936,937,938,939,940,941,942,943,944,945,946,947,948,949,950,951,952,953,954,955,956,957,958,959,960,961,962,963,964,965,966,967,968,969,970,971,972,973,974,975,976,977,978,979,980,981,982,983,984,985,986,987,988,989,990,991,992,993,994,995,996,997,998,999,1000}

¹Aix-Marseille Université, INSERM, GIMF UMR 5086, 13385, France; ²Laboratory of Immunology, ³Division of Pathology, ⁴Division of Heart Transplantation, Heart Institute, ⁵Division of Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, University of São Paulo, ⁶Institute for Investigation in Immunology, National Institutes of Science and Technology, and ⁷University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Long noncoding RNAs (lncRNAs) modulate gene expression at the epigenetic, transcriptional, and posttranscriptional levels. Dysregulation of the lncRNA known as myocardial infarction-associated transcript (MIAT) has been associated with myocardial infarction. Chagas disease causes a severe inflammatory dilated chronic cardiomyopathy (CCC). We investigated the role of MIAT in CCC. A whole-transcriptome analysis of heart biopsy specimens and formalin-fixed, paraffin-embedded samples revealed that MIAT was overexpressed in patients with CCC, compared with subjects with noninflammatory dilated cardiomyopathy and controls. These results were confirmed in a mouse model. Results suggest that MIAT is a specific biomarker of CCC.

Keywords: dilated; cardiomyopathy; Chagas disease; lncRNA; MIAT; biomarker.

Noncoding RNAs (ncRNAs) modulate gene expression at the epigenetic, transcriptional, and posttranscriptional levels and have been classified according to transcript length as small ncRNAs and long ncRNAs (lncRNAs). Small ncRNAs (<200 nucleotides) include microRNAs, piwi-interacting RNAs, small nucleolar RNAs, and small interfering RNAs [1]. lncRNAs have been shown to play significant roles in many developmental and pathological processes [2]. A few lncRNAs have been associated with heart development or cardiac diseases [3–6].

Received 4 February 2016; accepted 2 March 2016; published online 8 March 2016.

*A. F. F., L. L., L. R. P. F., and M. A. B. contributed equally to this work.

*E. C.-N. and C. C. contributed equally to this work.

Correspondence: C. Chevillard, INSERM, U508, Université Aix-Marseille, Faculté de Médecine, 27 bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France (chevillard@univ-amu.fr).

The Journal of Infectious Diseases® 2016;214:161–5

© The Author 2016. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jiv295

Myocardial infarction-associated transcript (MIAT), a lncRNA, is predominantly expressed in heart and fetal brain tissue. Polymorphisms in MIAT were identified by genome-wide association studies as a risk factor for myocardial infarction [5], and MIAT was found to be underexpressed in platelets from patients with myocardial infarction [7].

Chagas disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and affects 13 million people in Latin America [8]. About 30% of infected patients develop chronic Chagas disease-associated cardiomyopathy (CCC), an aggressive inflammatory dilated cardiomyopathy. CCC is a major cause of heart failure in Latin America [9]. Clinical progression, survival duration, and overall prognosis are significantly worse in patients with CCC, compared with patients with dilated cardiomyopathy of noninflammatory etiology [10]. The increased aggressiveness of CCC seems to be related to inflammation and activation of myocardium-specific disease pathways due to an unbalanced expression of multiple genes [9]. Dysregulation of microRNAs has also been observed in the myocardium during CCC [11]. CCC presents a T-cell/macrophage-rich myocarditis, with scarce *T. cruzi* parasites and local production of inflammatory cytokines, such as interferon γ and tumor necrosis factor α , hypertrophy, and fibrosis [11]. Myocardial inflammation during CCC may be due to autoimmune or parasite-specific immune responses [11].

So far, no study has evaluated the expression of lncRNA in patients with Chagas disease. To investigate the expression levels of MIAT in heart tissue during CCC, we performed a whole-transcriptome analysis of samples from patients with CCC, samples from subjects with idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM), and control myocardial samples. The results were then validated by quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis of a larger set of heart left ventricular biopsy specimens. MIAT expression analysis was also done in heart mouse samples obtained 15, 30, and 45 days after *T. cruzi* infection [12].

METHODS

The investigations on mice conform to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The Institutional Committee for Animal Ethics of Fiocruz and the Institutional Committee for Animal Ethics of the University of São Paulo approved all of the procedures. Experiments on human samples were performed in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Institutional Review Board of the School of Medicine of São Paulo, the INSERM Internal Review Board, and the Brazilian National Ethics in Research Commission. Written informed consent was obtained from the patients.

Blood Gene Signatures of Chagas Cardiomyopathy With or Without Ventricular Dysfunction

Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira,^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690,691,692,693,694,695,696,697,698,699,700,701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720,721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,738,739,740,741,742,743,744,745,746,747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765,766,767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,777,778,779,780,781,782,783,784,785,786,787,788,789,790,791,792,793,794,795,796,797,798,799,800,801,802,803,804,805,806,807,808,809,810,811,812,813,814,815,816,817,818,819,820,821,822,823,824,825,826,827,828,829,830,831,832,833,834,835,836,837,838,839,840,841,842,843,844,845,846,847,848,849,850,851,852,853,854,855,856,857,858,859,860,861,862,863,864,865,866,867,868,869,870,871,872,873,874,875,876,877,878,879,880,881,882,883,884,885,886,887,888,889,890,891,892,893,894,895,896,897,898,899,900,901,902,903,904,905,906,907,908,909,910,911,912,913,914,915,916,917,918,919,920,921,922,923,924,925,926,927,928,929,930,931,932,933,934,935,936,937,938,939,940,941,942,943,944,945,946,947,948,949,950,951,952,953,954,955,956,957,958,959,960,961,962,963,964,965,966,967,968,969,970,971,972,973,974,975,976,977,978,979,980,981,982,983,984,985,986,987,988,989,990,991,992,993,994,995,996,997,998,999,1000}

¹Laboratory of Immunology and ²Cardiomyopathy Unit, Heart Institute, and ³Division of Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, ⁴Department of Pathophysiology and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, and ⁵Institute of Tropical Medicine, Department of Infectious Diseases, University of São Paulo, ⁶Institute for Investigation in Immunology, National Institute of Science and Technology, and ⁷Universidade Santo Amaro, São Paulo, and ⁸Hospital das Clínicas and ⁹Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil; ¹⁰Department of Pathology, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia; and ¹¹Blood Systems Research Institute and ¹²Department of Laboratory Medicine and ¹³Institute for Human Genetics, Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, and ¹⁴Department of Biostatistics, Glaxo, Redwood City, California

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects 7 million people in Latin American areas of endemicity. About 30% of infected patients will develop chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), an inflammatory cardiomyopathy characterized by hypertrophy, fibrosis, and myocarditis. Further studies are necessary to understand the molecular mechanisms of disease progression. Transcriptome analysis has been increasingly used to identify molecular changes associated with disease outcomes. We thus assessed the whole-blood transcriptome of patients with Chagas disease. Microarray analysis was performed on blood samples from 150 subjects, of whom 30 were uninfected control patients and 120 had Chagas disease (1 group had asymptomatic disease, and 2 groups had CCC with either a preserved or reduced left ventricular ejection fraction [LVEF]). Each Chagas disease group displayed distinct gene expression and functional pathway profiles. The most different expression patterns were between CCC groups with a preserved or reduced LVEF. A more stringent analysis indicated that 27 differentially expressed genes, particularly those related to natural killer (NK)/CD8⁺ T-cell cytotoxicity, separated the 2 groups. NK/CD8⁺ T-cell cytotoxicity could play a role in determining Chagas disease progression. Understanding genes associated with disease may lead to improved insight into CCC pathogenesis and the identification of prognostic factors for CCC progression.

Keywords. Chagas disease; whole-blood transcriptome; Cardiomyopathy; NK cells.

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and affects up to 7 million people in Latin American countries where *T. cruzi* is endemic [1]. The parasite is mainly transmitted by hematophagous reduviid bugs, by blood transfusion, and congenitally, and Chagas disease is now a concern in industrialized countries where it is not endemic, owing to immigration [2–4]. The infection presents with an acute phase with high-level parasitemia, which progresses to a chronic low grade infection phase due to strong innate and acquired immunity that controls—but does not completely suppress—blood and tissue parasitism [5–7]. Most patients will develop an indeterminate/asymptomatic form (ASY) showing no signs of cardiac or digestive alterations. Around 30% will have altered electrocardiograph and/or echocardiograph findings that are characteristic of chronic

Chagas cardiomyopathy (CCC) or so-called mega-syndromes (ie, megacolon and megaesophagus). These complications are a great cause of morbidity and mortality, resulting a considerable socioeconomic burden [7–9].

CCC is the most frequent and severe clinical consequence of Chagas disease and the major cause of infectious myocarditis in the world [1, 8, 10]. It is an inflammatory cardiomyopathy with electrical heart conduction abnormalities and arrhythmias [6, 11]. One third of patients with CCC further develop left ventricular dysfunction, leading to dilation and refractory heart failure. Patients with CCC have a worse prognosis than patients with other noninflammatory cardiomyopathies [12]. Current anti-*T. cruzi* drugs have shown to be unable to block progression toward the more severe forms of CCC [1]. The mechanisms underlying CCC development are still not fully understood, although inflammatory mechanisms are certainly involved [13]. Detection of *T. cruzi* DNA in peripheral blood is associated with CCC severity [14], suggesting that the parasite load influences disease progression toward CCC with ventricular dysfunction.

Histopathological analysis of hearts from patients with CCC reveals a diffuse T-cell- and macrophage-rich myocarditis, hypertrophy, and fibrosis with scarce tissue parasitism [15–17]. Cytokines and chemokines are also known to play an important role in immune-mediated damage and fibrosis [6].

Received 16 April 2016; editorial decision 31 October 2016; accepted 29 November 2016; published online December 17, 2016.

*L. R. P. F. and E. M. F. contributed equally to this work.

†E. C. S. and E. C.-N. are co-senior authors and contributed equally to this work.

Correspondence: E. Cunha-Neto, MD, PhD, Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor), Avenida Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – Bloco 9, 9º Andar, São Paulo, Brazil 05403-900 (e-mail: eunha@usp.br).

The Journal of Infectious Diseases® 2017;215:215–235

© The Author 2016. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com. DOI:10.1093/infdis/jiv540

Major Article

Pharmacotherapeutic follow-up of patients with Chagas disease using in use of benznidazole: drug-related problems and pharmaceutical interventions

João Paulo Ramalho Correia^[1], Alanna Carla da Costa^[1,2], Eduardo Arrais Rocha^[3], Ana Rosa Pinto Quidute^[3], Darlan da Silva Cândido^[4], Ângela Maria de Souza Ponciano^[5], Marta Maria de França Fonteles^[2,5] and Maria de Fátima Oliveira^[1,2]

[1]. Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. [3]. Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. [4]. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Alergia e Imunopatologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. [5]. Departamento de Farmácia, Centro de Estudos em Atenção Farmacêutica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

Abstract

Introduction: Benznidazole (BNZ) is a drug available for the etiological treatment of Chagas disease. However, this drug is toxic and has a limited effectiveness on the chronic phase of this disease, often leading to poor treatment adherence. **Methods:** This is a descriptive and exploratory study conducted at the Pharmaceutical Care Service for Chagas disease patients of the Federal University of Ceará. Drug-related problems (DRPs) and pharmaceutical interventions (PIs) were classified according to the Second Consensus of Granada. **Results:** The average age of patients with Chagas disease was 62 years, with the majority residing in the Ceará countryside (86.7%), and having low education levels (63.3% with elementary school education). Regarding family income, most patients belonged to a household that earned ≤ 1.2 times the minimum wage per month. Approximately 73% of these patients complied with the BNZ treatment, and nearly 7% underwent therapy interruption after medical evaluation. A total of 189 DRPs were identified, of which 51.9% (n=98) were classified as potential, and 48.1% (n=91) as actual. The most frequent DRPs were related to safety (qualitative safety; n=70; 37%), necessity (non-adherence; n=52; 27.5%), and effectiveness (qualitative effectiveness/non-optimal drug selection; n=45; 23.8%). Among the 216 PIs conducted, the majority were related to patient education (n=168; 77.8%) and pharmacological strategy (n=42; 19.4%). **Conclusions:** This study indicates the need for pharmacotherapeutic monitoring in patients with Chagas because of the high number of therapeutic interventions, DRPs (approximately 3 DRPs/patient), BNZ adherence, and polypharmacy.

Keywords: Chagas disease. Pharmaceutical care. Pharmacotherapy.

INTRODUCTION

Chagas disease (CD), caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, is endemic to several Latin American countries. Over a century after its discovery, CD still presents as an important public health problem¹. In fact, the epidemiological profile of CD has changed over the last decades, mainly because of migratory flow that led to both the urbanization and globalization of this disease². According to the World Health Organization (WHO) in 2014, 7 to 8 million people were estimated to be infected worldwide, mainly in Latin America, where 75 to 90 million people are at risk of contracting the infection with over 10,000 deaths/year occurring from this

disease. In Brazil throughout almost all the states, approximately 3 million individuals are estimated to be infected with CD^{3,4}.

Benznidazole (BNZ) is the only drug available for the etiological treatment of CD in Brazil. However, this drug is toxic and has a limited effectiveness in the chronic phase of the disease, often resulting in poor treatment adherence^{5,6}. The 2015 Second Brazilian Consensus on Chagas Disease recommends treating all infected patients either during the early chronic and acute phase (regardless of the transmission routes), or those with undetermined, cardiac, and digestive forms (without serious clinical complications), or during the late chronic phase. BNZ treatment was also indicated in cases of transplantations, accidental infection, or in immunocompromised patients, in case reactivation occurs. Confirmed parasitological cure, especially during the chronic phase, depends on several factors, such as follow-up time and types of examinations conducted. During the treatment of CD, many drug-related problems (DRPs) may occur and interfere with the therapeutic results and patient quality of life⁹.

Corresponding author: Alanna Carla da Costa.
e-mail: alannacarla.costa@gmail.com
Received 21 November 2016
Accepted 2 June 2017

Full Length Research Paper

Evaluation of clinical parameters in people living with HIV undergoing pharmacotherapeutic monitoring: Viral load, CD4+ T lymphocytes and adherence to antiretrovirals

Henry Pablo L. C. Reis^{1,2*}, Darlan da S. Cândido¹, Catarine V. Loureiro^{1,2}, Juliana de O. Carlos¹, Ana Maria S. de Araújo³, Maria Jacqueline Batista³ and Marta Maria de F. Fonteles^{1,2}

¹Department of Pharmacy, Center for Studies in Pharmaceutical Care (CEATENF), Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

²Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

³Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Received 27 April, 2015; Accepted 9 November, 2015

The aim of this study was to evaluate the clinical indicators (viral load- VL, CD4 lymphocytes and adherence) of HIV+ patients, at the beginning of treatment with antiretrovirals (ARV), during pharmacotherapeutic monitoring (PTM) in a specialized center in Fortaleza, Ceará. The longitudinal study, according to the Dáder method, was used for patients with HIV (n = 100) from 2008 to 2012, beginning at the time of dispensation of the antiretroviral therapy. The data were analyzed using SPSS[®]. To evaluate the VL and CD4 levels, the Wilcoxon's test was carried out and the patients were used as temporal controls for themselves regarding the outcomes assessed at the beginning and end of the PTM. Adherence was determined by self-report and pharmacy dispensing records (PDR) of antiretrovirals. There was a mean reduction of 89.45% (SD = 0.28986) in total VL (p < 0.001). For CD4+ lymphocytes, a mean increase of 124.14% (SD = 1.31756) was detected (p < 0.001) during the PTM. Most treated patients showed high rates of adherence by self-report (95.0%, n = 100) and (76.0%) PDR methods. The findings of the present work demonstrated the potential benefits of PTM on treatment adherence, which may have been decisive for the successful improvement of the assessed clinical indicators. The inclusion of PTM for people living with HIV/AIDS (PLHIV/AIDS) in clinical services should be encouraged at the level of secondary health care.

Key words: HIV, AIDS, viral load, adherence, pharmaceutical care.

INTRODUCTION

The highly active antiretroviral therapy (HAART) has resulted in increased patient survival rates. Thus, continuing clinical assessment by objective indicators is important. CD4+ T-cell and viral load (VL) measurements

are fundamental parameters for deciding when to the start and evaluate effectiveness of the antiretroviral therapy (Brito, 2012).

Adherence to antiretroviral drugs is a fundamental and

Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo
57(5):431-433, September-October, 2015
<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000500011>

BRIEF COMMUNICATION

PREVALENCE OF CHAGAS DISEASE IN A RURAL AREA IN THE STATE OF CEARA, BRAZIL

Erlane Chaves FREITAS(1), Maria de Fátima OLIVEIRA(2), Mônica Coelho ANDRADE(2), Arduina Sofia Oriet de Barros VASCONCELOS(2),
José Damilão da SILVA FILHO(2), Darlan da Silva CÂNDIDO(2), Laís dos Santos PEREIRA(2), João Paulo Ramalho CORREIA(2),
José Napoleão Monte da CRUZ(3) & Luciano Pamplona de Góes CAVALCANTI(4)

SUMMARY

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and affects about two to three million people in Brazil, still figuring as an important public health problem. A study was conducted in a rural area of the municipality of Limoeiro do Norte - CE, northeastern Brazil, aiming to determine the prevalence of *T. cruzi* infection. Of the inhabitants, 52% were examined, among whom 2.6% (4/154) were seropositive in at least two serological tests. All seropositive individuals were older than 50 years, farmers, with a low education and a family income of less than three minimum wages. Active surveillance may be an alternative for early detection of this disease.

KEYWORDS: Chagas disease; Epidemiology; Health survey.

In Brazil, there are about two to three million people infected with *Trypanosoma cruzi*, generating a high social, pension and healthcare impact, and also the need for continuous surveillance^{1,2}.

The prevalence of Chagas disease in the state of Ceará (CE), Brazil, according to the National serological survey that was conducted between 1975 and 1980, was 0.84%. However, the results for Ceará presented limitations, such as the long-term storage of samples, a fact that may have affected the validity of this finding³. The municipality of Limoeiro do Norte - CE stood out by its high prevalence of Chagas disease, mainly between last century's 50s and 70s. Serological studies performed in humans until 1967 in Ceará brought up an infection prevalence of 14.8%, for the whole state. In the same period, the prevalence in Limoeiro do Norte was 16.7%. In the next decade, from 1970 to 1974, the prevalence of human *T. cruzi* infection was 4.6%³. In addition to the high levels of human infection, entomological studies showed triatomine infection rates of 14% in 1955-1976³ and 5% in the period 2009-2011⁴.

Epidemiological studies are important to spread information about the disease among populations in risk areas⁵. Therefore, this study aimed to investigate the seroepidemiological situation of CD in a rural location in Limoeiro do Norte, Ceará, Brazil, in order to provide early diagnosis and evaluate the profile of this population.

This cross-sectional study was conducted between February and September, 2011, in a rural area in the municipality of Limoeiro do Norte, which is 162 km away from the Capital, Fortaleza, in a

straight line. The municipality is located in the Jaguaribe river valley, northeastern Brazil (5° 08' 44" and 38° 05' 53" ^W). The locality of Sape was chosen randomly among those that had a greater number of insects captured between the years of 2006-2009 in the city of Limoeiro do Norte⁶. The census type sample was possible due to the reduced number of inhabitants of the locality, in addition to the fact that it meets the goal of providing early diagnosis to individuals in the region. This location was chosen due to the presence of infected triatomines, captured in routine surveillance activities of the municipality and because Limoeiro do Norte is located between the areas of highest disease prevalence, according to other studies^{1,7,23}. Then, all 115 residences and its 296 inhabitants were visited, informed about the objectives of the project and invited to participate. Socioeconomic data were collected using a structured questionnaire and 154 people who agreed to participate had blood samples taken.

The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method was used, according to the Wama Diagnostica[®] kit for Chagas Disease (Brussels, Belgium) in the Laboratory for Research in Chagas disease (LPDC) of the Federal University of Ceará, in Fortaleza. Serum samples that resulted reagent, or inconclusive in serology for anti-*T. cruzi* antibodies by ELISA were forwarded to the Public Health Central Laboratory of Ceará (LACEN-CE) to be analyzed by three methods: indirect immunofluorescence (IIF), indirect hemagglutination (HAI) and ELISA. According to the Brazilian Consensus on Chagas disease, serum reagent individuals in at least two serological tests with different methodological principles were considered positive¹⁴.

(1) Universidade Federal do Ceará, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Fortaleza, CE, Brazil.

(2) Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Fortaleza, CE, Brazil.

(3) Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

(4) Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Saúde Comunitária, Fortaleza, CE, Brazil.

Correspondence to: Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti, Departamento de Saúde Comunitária, Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, R. Prof. Costa Mendes 1608, 9º andar, 60430-140 Fortaleza, CE, Brazil. Tel.: +55 85 99878909; Fax +55 85 33668090. E-mail: pamplona.luciano@gmail.com