Monique Andrade Baron

**Análise das metaloproteinases de matriz e seus
inibidores no tecido cardíaco de pacientes com
cardiomiopatia chagásica crônica**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha Neto

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2015

Monique Andrade Baron

**Análise das metaloproteínases de matriz e seus
inibidores no tecido cardíaco de pacientes com
cardiomiopatia chagásica crônica**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha Neto

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo auto

Baron, Monique Andrade

Análise das metaloproteinases de matriz e seus inibidores no tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica / Monique Andrade Baron. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Edecio Cunha Neto.

Descritores: 1.Cardiomiopatia chagásica 2.Cardiomiopatia dilatada 3.Miocardite
4.Metaloproteinases da matriz 5.Inibidores teciduais de metaloproteinases 6.Doença de Chagas.

USP/FM/DBD-160/15

DEDICATÓRIA

À minha linda família, por acreditar mais
em mim do que eu mesma e por terem
ensinado a enfrentar todos os
obstáculos da vida com muita força,
esperança e fé.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, e especialmente, agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Edecio Cunha Neto; pela orientação, amizade, confiança depositada em mim e oportunidade de executar este trabalho.

À Dra. Priscila Camillo Teixeira, pelo carinho, apoio, incentivo, conselhos e pela amizade sincera, por dividir seus conhecimentos e por ter proporcionado momentos incríveis durante esta etapa da minha vida... muito obrigada de coração!

À Dra. Ludmila Rodrigues Ferreira, pela amizade, carinho, confiança depositada em mim e pelas contribuições científicas.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil, por toda dedicação e apoio, pelas discussões, críticas e sugestões nas reuniões de grupo, e por ser um exemplo de professor e cientista.

Ao Prof. Dr. Esper Kallas, pela excelente organização do nosso programa de pós-graduação.

A toda a Equipe de Transplante do Instituto do Coração, Dr. Edimar Alcides Bocchi, Dr. Fábio Gaiotto, Dr. Fernando Bacal, e em especial ao Dr. Ronaldo Honorato pela indispensável ajuda na obtenção das amostras.

À querida amiga Andréia Kuramoto, pela amizade, dedicação, carinho e por estar sempre ao meu lado, incentivando, ajudando e por ser incrível.

À amiga Dra. Amanda Farage Frade, pelos conselhos, incentivo, carinho, por me mostrar que ninguém tem que acreditar mais em mim do que eu mesma, pelo companheirismo de congresso e pela amizade.

À Eliane Conti Mairena, pelos conselhos, por dividir seus conhecimentos, me apoiar nos bons e maus momentos, pelo carinho e por toda ajuda convívio e amizade.

À amiga Dra. Carol Luque, pela amizade, incentivo, apoio e pelo companheirismo de congresso.

As minhas amigas do Laboratório, Fê Magalhães, Pri Carmona, Isa Navarro, Aline Bossa, Maristela Hernandez, Karla Alcântara, Vanessa Moura, Taccy Mikulski, “Ana P” Pacanaro, Nathália Moreira, Carlo Martins, Rafael E. Almeida, Vinícius C. Santana, Susan Ribeiro e Luciana Nogueira. Agradeço a vocês pelas risadas, carinho, amizade, apoio, incentivo e por tornarem meus dias mais felizes. A pós-graduação não teria a mesma sem a participação de vocês.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Vascular do InCor, especialmente a Ana lochabel Moretti, Victor Debbas, Leonardo Tanaka, sempre dispostos a ajudar. Obrigada pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Vacina do InCor, Samar, Karen, Simoninha, Raquel, Fê Alegria, Washington, pela amizade e convívio.

Ao Sr. Jair, Sônia, Gisele e Cléber, pela atenção, amizade e por toda ajuda administrativa.

Aos amigos do HLA que não me atrevo a citar nomes, pois são muitos especiais para mim, que sempre me receberam tão bem, pelo carinho e pelos momentos de descontração.

A Rai e Elaine e toda equipe do Laboratório de Imunologia do InCor, pela amizade, dedicação, disponibilidade, carinho e cuidado com o nosso trabalho.

Aos professores Dr. Fábio Fernandes, Dra. Vanessa Moraes Freitas e à Dra. Ana lochabel Moretti, pelas valiosas sugestões feitas a este trabalho durante minha qualificação.

Ao Dr. Luiz Benvenutti e a todos do Serviço de Anatomia e Patologia (InCor) por toda ajuda com a análise histopatológica.

À Dra. Nilsa Regina Damaceno Rodrigues e todos do Laboratório de Biologia Celular (FMUSP), por toda ajuda com a coloração de Picrosirius red.

À Eleni Arruda, pela paciência, dedicação e infundáveis resoluções burocráticas.

A Todos os demais colegas do Laboratório de Imunologia do InCor e LIM-60, pela convivência e pela amizade.

Aos meus pais e irmãos por todo amor incondicional e imenso suporte para que eu pudesse realizar mais etapa em minha vida...

Ao meu cunhado Gustavo, por toda ajuda com as recuperações de arquivos corrompidos ...

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

E a Deus, principalmente por estar presente em todos momentos da minha vida ...

“Se procurar bem você acaba encontrando.

Não a explicação (duvidosa) da vida,

Mas a poesia (inexplicável) da vida”.

Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas.....	23
1.1.1. Ciclo de vida e infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
1.1.2. Epidemiologia	25
1.1.3. Controle e tratamento	26
1.1.4 Aspecto clínico da doença de Chagas.....	27
1.2. Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC).....	29
1.3. Cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI).....	35
1.4. Matriz extracelular e Remodelamento Cardíaco	36
1.5. Metaloproteinases da Matriz (MMPs).....	40
1.6. MicroRNAs como importantes reguladores pós-transcricionais das MMPs e TIMPs.....	50
1.6.1 Biogênese e mecanismo de ação.....	50
2. JUSTIFICATIVA	54
3. HIPÓTESE	56
4. OBJETIVOS	58
5. METODOLOGIA	60
5.1. Desenho Experimental.....	61
5.2. Amostras de miocárdio humano.....	62
5.2.1. Análise histopatológica das amostras de miocárdio.....	62
5.3. Análise da expressão gênica das MMPs e TIMPs por Real Time (qRT -PCR)	63
5.3.1. Extração de RNA total	63
5.3.2. Quantificação e análise da integridade do RNA total.....	64
5.3.3. Transcrição Reversa (cDNA)	65
5.3.4. Desenhos dos iniciadores (primers) específicos para as MMPs, TIMPs e genes Candidatos a normalizadores.....	66
5.3.5. Reação de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR).....	68
5.3.6. Concentração de uso dos Primers.....	69

5.3.7. Especificidade e Cálculo da eficiência de amplificação dos primers utilizados.....	70
5.4. Análise da expressão gênica dos microRNAs por Real Time (qRT -PCR) .	72
5.4.1. Extração do RNA para microRNAs	72
5.4.2. Transcrição Reversa específica para o microRNAs.....	73
5.4.3. Real time PCR (qRT-PCR) para microRNAs	75
5.4.4. Quantificação da expressão relativa dos microRNAs analisados	76
5.5. Análise da expressão proteica das MMPs e TIMPs por “Western Blotting”	76
5.5.1. Extração Proteica.....	76
5.5.2. “Western Blotting” para MMPs e TIMPs.....	77
5.5.3. Coloração e aquisição de imagens dos géis unidimensionais (1D)	78
5.6. Análise da atividade proteolítica das MMP-2 e MMP-9 por Zimografia.....	79
5.7. Análise Morfométrica Quantitativa	81
5.8. Análise Estatística.....	82
5.9. Análises Bioinformáticas	83
6. RESULTADOS	85
6.1. Caracterização das amostras de miocárdio humano	86
6.1.1. Análise histopatológica das amostras de miocárdio	90
6.2. Análise da expressão gênica, proteica e atividade proteolíticas das MMPs e TIMPs.....	91
6.2.1. Expressão gênica e proteica das gelatinases MMP-2 e MMP-9.....	91
6.2.2 . Atividade Proteolítica das gelatinases MMP-2 e MMP-9	93
6.2.3. Análise da expressão gênica e proteica da estromelina MMP-3.....	95
6.2.4. Análise da expressão gênica e proteica das collagenases MMP-1, MMP-8, MMP-13 e metaloestase MMP-12	96
6.2.5. Análise da expressão gênica e proteica de EMMPRIN (CD147)	99
6.2.6. Análise da expressão gênica e proteica dos inibidores TIMP-1, -2, -3 e -4 e RECK.....	100
6.3. Análise da Razão entre atividade da MMP-2, MMP-9 e TIMPs	104
6.4. Análise morfométrica quantitativa do colágeno intersticial.....	108
6.5. Análise de bioinformática para identificação de microRNAs regulatórios das MMPs e TIMPs.....	110

6.6. Análise da expressão gênica dos microRNAs regulatórios das MMPs, TIMPs e RECK.....	112
7. DISCUSSÃO	115
8. CONCLUSÃO	129
9. ANEXOS	131
10. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução da infecção por <i>T. cruzi</i>	29
Figura 2. Curvas de sobrevida de pacientes com insuficiência cardíaca de acordo com a etilogia	30
Figura 3. A. Domínios Estruturais das MMPs..	44
Figura 4. Delineamento experimental do trabalho.	61
Figura 5. Quantificação da fração do volume de colágeno intersticial.....	82
Figura 6. Análise histopatológica do tecido cardíaco de pacientes	90
Figura 7. Expressão relativa do RNAm e Expressão Proteica da MMP-2 e -9	92
Figura 8. Atividade Proteolítica da MMP-2 e MMP-9	94
Figura 9. Expressão Proteica MMP-3.....	95
Figura 10. Expressão Proteica da MMP-8 e MMP-13.	97
Figura 11. Expressão relativa do RNAm e expressão Proteica da MMP-12.....	98
Figura 12. Expressão relativa do RNAm e expressão Proteica do EMMPRIN	99
Figura 13. Expressão relativa do RNAm e expressão Proteica dos inibidores TIMPs.....	102
Figura 14. Expressão relativa do RNAm e expressão Proteica da RECK.	103
Figura 15. Razão entre atividade da MMP-2 e TIMPs.....	106
Figura 16. Razão entre atividade da MMP-9 e TIMPs.....	107
Figura 17. Análise morfométrica do colágeno intersticial do tecido de pacientes	109
Figura 18. Via de associação das MMPs, TIMPs e RECK como alvos preditos para microRNAs.....	111
Figura 19. Expressão relativa dos microRNAs regulatórios das MMP e TIMPs	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das MMPs de acordo com seu nome descritivo e seus principais substratos.....	42
Tabela 2. Sequência dos primers dos genes alvos e dos genes candidatos a normalizadores a serem utilizados na reação de qRT- PCR.....	67
Tabela 3. Sequência dos miRNAs maduros humanos (hsa)	73
Tabela 4. Dados clínicos dos pacientes cujas amostras de miocárdio foram utilizadas no estudo.....	88
Tabela 5. Dados de priorização e histopatológicos os pacientes, cujas amostras de miocárdio foram utilizadas no estudo.	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

18S	<i>Eukaryotic 18S rRNA</i>
ANF	<i>Atrial natriuretic fator</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
CCC	Cardiomiopatia Chagásica Crônica
CCL-	<i>Chemokines</i>
CDI	Cardiomiopatia dilatada idiopática
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CT-1	Cardiotrofina
CXCL-	<i>Chemokine (C-X-C motif) – ligand</i>
DDVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DGR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DSVE	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>Epidermal growth fator</i>
EMMPRIN	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
ET-1	Endotelina-1
FE	Fração de ejeção
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HE	Hematoxilina e eosina
HPRT	<i>Hypoxanthine phosphoribosyl transferase</i>
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva

IFN- γ	<i>Interferon – gamma</i>
Ig	Imunoglobulina
IL-	Interleucina
IP-	<i>Interferon-γ induced protein</i>
IPA	<i>Ingenuity pathway analysis</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MEC	Matriz extracelular
MIG	<i>Monokine induce by gamma interferon</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1α</i>
miR-	microRNA
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MT-MMP	<i>Membrane - type MMP</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEA-3	<i>Polyomavirus enhancer activator 3</i>
Pri-microRNA	<i>Primary microRNA</i>
qRT-PCR	<i>Real time quantitative PCR</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RECK	<i>Reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RISC	<i>RNA-induced silence complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA _m	RNA mensageiro

RPLP0	<i>Ribosomal protein large P0</i>
RT	<i>Reverse transcription</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP-1	<i>Specificity protein 1</i>
TGF- β	<i>Transforming growth fator</i>
Th	<i>T Helper</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	<i>Tumour necrosis factor alpha</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VEGF	<i>Vascular endotelial growth fator</i>
α 1-CT	Quimiotripsina
α 1-PI	Proteinase
α 2-M	Macroglobulina

Resumo

Baron MA. **Análise das metaloproteinases de matriz e seus inibidores no tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica** [Dissertação]. São de Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) é uma cardiopatia dilatada inflamatória caracterizada por remodelamento cardíaco, uma miocardite rica em células T e macrófagos, hipertrofia e fibrose. Essa acomete 30% dos pacientes infectados com *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Os pacientes com CCC apresentam uma pior sobrevida e prognóstico quando comparados com pacientes portadores de cardiomiopatia de etiologia não inflamatória, como a cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI). No processo de remodelamento cardíaco, ocorre uma reestruturação da matriz extracelular (MEC), mediada em grande parte por proteínas como as enzimas proteolíticas, metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores específicos (TIMPs), sendo que a alteração e/ou atividade de algumas dessas enzimas em particular está relacionado com as doenças cardiovasculares. Dentro deste contexto, a hipótese deste trabalho é a de que o perfil da expressão e atividade das MMPs e de seus inibidores TIMPs na CCC será distinto do encontrado na CDI. Foi avaliado por qRT-PCR a expressão gênica e por “Western blotting” a expressão proteica das MMPs: -1, -2, -3, -8, -9, -12-13 e EMMPRIN e dos seguintes inibidores TIMPs: -1, -2, -3, -4 e RECK e atividade da MMP-2 e -9 por zimografia, em amostras de miocárdio (ventrículo esquerdo) de pacientes com CCC, pacientes com CDI e doadores de órgãos, obtidos durante o procedimento de transplante. Embora algumas das alterações da expressão das MMPs, TIMPs, e RECK tenham sido compartilhadas com a CDI, observamos que os pacientes com CCC apresentam o aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 e aumento exclusivo da proteína MMP-9. Analisamos através da razão entre a atividade da MMP-2 e MMP-9 com a expressão proteica dos inibidores TIMPs e RECK, observamos o aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 e a diminuição dos TIMPs: -1, -2, -3 e -4 e TIMPs -1, -2 e -3, respectivamente em pacientes com CCC, ocasionando um desequilíbrio entre sua ativação e inibição o que contribui com o remodelamento do miocárdio. Também foi avaliado a fração de colágeno intersticial por Picrosirius Red, observamos que o aumento de colágeno em pacientes com CCC e CDI, o que indica que o aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 está modulando a síntese, conformação e organização do colágeno, contribuindo com a fibrose em pacientes com CCC. Com objetivo de verificar se estas MMPs e seus inibidores estariam sob-regulação pós-transcricional,

realizamos análise *in silico* e identificamos 8 microRNAs (miR): miR-21, miR-29-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-188-5p, miR-214-3p, miR-491-5p e miR885-5p e analisamos suas expressões por qRT-PCR, mas não observamos correlação com as MMPs e seus inibidores, sugerindo que estas proteínas não estão sob regulação pós-transcricional pelos miRs analisados. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a expressão diferencial de MMPs e seus inibidores TIMPs estudados contribuem com a fibrose, remodelamento do miocárdio e disfunção cardíaca, observado em pacientes com CCC. Desta forma, este trabalho pode ajudar na elucidação dos mecanismos de desenvolvimento da patogênese da doença de Chagas.

Descritores: Cardiomiopatia chagásica; Cardiomiopatia dilatada; Miocardite; Metaloproteinase da matriz; Inibidores Teciduais de Metaloproteinases; Doença de Chagas.

Summary

Baron M A. ***Analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors in heart tissue of chronic Chagas disease cardiomyopathy patients.*** [Dissertation] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Chronic Chagas Cardiomyopathy (CCC) is an inflammatory dilated cardiomyopathy characterized by cardiac remodeling, a myocarditis rich in T cells and macrophages, hypertrophy and fibrosis. This affects 30% of patients infected with *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Patients with CCC have a poorer prognosis and survival when compared with cardiomyopathy patients with non-inflammatory etiology, such as idiopathic dilated cardiomyopathy (IDC). In cardiac remodeling process, there is a restructuring of the extracellular matrix (ECM), largely mediated by proteins such as proteolytic enzymes, matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific inhibitors (TIMPs). The alteration and/or activity of some these particular enzymes is associated with cardiovascular disease. Taking this into account, the hypothesis of this study is that the expression profile and activity of MMPs and their TIMPs inhibitors in the CCC will be different from those found in IDC. The gene expression was evaluated by qRT-PCR, the MMP protein expression: -1, -2, -3, -8, -9, -12-13 and EMMPRIN by "Western blotting" and the following TIMP inhibitors: -1, -2, -3, -4 and RECK and MMP-2 and -9 activity by zymography, in myocardial samples (left ventricle) of CCC and IDC patients and organ donors (Control) obtained upon transplantation. Although some of these changes in the expression of MMPs, TIMPs and RECK were shared with the IDC, we observed that patients with CCC have increased MMP-2 and MMP-9 activity and exclusive increase in MMP-9 protein. Through the ratio of MMP-2 and MMP-9 activity with protein expression of TIMPs and RECK inhibitors, we found that the increase in MMP-2 and MMP-9 activity and the decrease in TIMP: -1, -2, -3, and -4 and TIMP -1, -2 and -3, respectively, in myocardial samples of CCC patients causes an imbalance in their activation and inhibition, contributing to the myocardium remodeling. The fraction of interstitial collagen as stained by Picrosirius Red, indicates increase in collagen in patients with CCC and IDC, indicating that the increase of MMP-2 and MMP-9 activity is modulating the synthesis and conformation of collagen organization, contribute to fibrosis in patients with CCC. Aiming to verify whether these MMPs and their inhibitors would be under post-transcriptional regulation, we performed *in silico* analysis and it was identified 8 microRNAs (miR): miR-21, miR-29-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-188-5p, miR-214-3p, miR-491-5p and miR885-5p, but no correlation was found with the MMPs and their inhibitors, suggesting that these proteins are not

under post-transcriptional regulation by miRs analyzed. Together our results suggest that differential expression of MMPs and their TIMPs inhibitors studied contribute to fibrosis, myocardial remodeling and cardiac dysfunction observed in patients with CCC. Thus, this work may help in elucidating the development of mechanisms of the pathogenesis of Chagas disease.

Descriptors: Chagas cardiomyopathy; Cardiomyopathy dilated; Myocarditis; Matrix metalloproteinases; Tissue inhibitor of metalloproteinases; Chagas disease.

1. INTRODUÇÃO

As cardiomiopatias constituem um grupo de doenças primárias do músculo cardíaco, que podem ser resultados de diversos processos, como danos aos cardiomiócitos, defeitos genéticos, ou infiltração e deposição anormal de substâncias na matriz extracelular do tecido. A cardiomiopatia dilatada é vista como via final comum de várias cardiomiopatias, que pode evoluir para insuficiência cardíaca. A insuficiência cardíaca pode ser observada como distúrbio progressivo resultando na perda da função dos cardiomiócitos e na diminuição capacidade de contratilidade miocárdica, devido a alterações moleculares e estruturais que ocasionam o remodelamento cardíaco patológico (1-4).

O processo de remodelamento cardíaco é mediado em grande parte por um grupo de proteínas como as enzimas proteolíticas, metaloproteinases da matriz (MMPs; do inglês, “*matrix metalloproteinases*”) e seus inibidores específicos (TIMPs; do inglês, “*tissue inhibitors of metalloproteinases*”) (5). O envolvimento das MMPs em doenças cardiovasculares tem sido alvo de estudo, pois estas estão presentes no miocárdio e são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular do coração, sendo que o aumento dessas enzimas pode resultar em degradação das fibras de colágeno, liberação de moléculas bioativas, citocinas e remodelamento da matriz extracelular com consequente dilatação ventricular progressiva (6-9).

A fibrose e o remodelamento cardíaco patológico são especialmente preeminentes na Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC). Da mesma forma, a CCC apresenta pior sobrevida e prognóstico que outras formas de cardiomiopatia dilatada.

Recentemente, foi demonstrado que as MMPs e os TIMPs podem ter sua expressão regulada pós-transcricionalmente por microRNAs, que são pequenas moléculas de RNA de 22 nucleotídeos que se ligam a sequências parcialmente complementares na região 3' não traduzida (3'UTR) dos RNAs mensageiros (RNAm) específicos, chamados de alvo. Esse pareamento entre o miRNA e seu RNAm alvo leva à clivagem deste último ou inibição da tradução, resultando no silenciamento da expressão gênica. (10-12). Neste contexto, avaliamos o perfil de expressão gênica e proteica e atividade proteolítica das MMPs e TIMPs, assim como a expressão de microRNAs que regulam de forma direta e indiretamente estas enzimas proteolíticas, na parede lateral do ventrículo esquerdo de pacientes com cardiomiopatia dilatada, em especial a Cardiomiopatia Chagásica Crônica, em estágio terminal da insuficiência cardíaca.

1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas

1.1.1. Ciclo de vida e infecção por *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas (Tripanossomíase Americana) foi descoberta em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas. É uma doença sistêmica e crônica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) (13).

O ciclo de vida deste parasita é complexo, caracterizado com múltiplos estágios de desenvolvimento que ocorrem em hospedeiros invertebrados (insetos triatomíneos) e vertebrados (mamíferos). A infecção do inseto triatomíneo, também conhecido por barbeiro (da família Reduviidae, das espécies *Triatoma*

infestans, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*) - seu vetor biológico - se dá através do repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado (13).

Dentro do organismo do inseto, as formas tripomastigotas sobrevivem e se transformam em epimastigotas com capacidade de se reproduzir por divisão binária. Estas migram pelo trato gastrointestinal do inseto, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicas, que é a forma infectante do hospedeiro vertebrado e são liberadas nas fezes e urina durante o repasto sanguíneo, podendo penetrar através do local da picada ou mucosas. Ao entrar na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, as tripomastigotas metacíclicas infectam células nucleadas, escapam do vacúolo parasitóforo e, em seu citoplasma, se transformam em amastigota, a qual se replica por fissão binária, perante estímulos ainda desconhecidos, se transformam em tripomastigotas flageladas. A lise da célula, posteriormente, proporciona a propagação da infecção no organismo (14, 15).

Durante a fase aguda da infecção, quaisquer células nucleadas são alvos potenciais da infecção por *T. cruzi*, embora cardiomiócitos, células musculares, endoteliais, adiposas e nervosas sejam preferencialmente parasitadas (16). Os mecanismos moleculares de invasão utilizados por este parasita envolvem vários tipos de receptores da célula hospedeira, como receptores do tipo *toll* (TLRs), receptores de tirosina quinase, TGF, EGF, quininas (sub-tipos B1/B2) e LDL (do inglês, “*transforming growth factor, epidermal*” “*growth factor, low density lipoprotein*”, respectivamente), atividade destes receptores é necessária para o sucesso da

ligação e internalização do parasita na célula (16, 17). Além do vetor, a transfusão sanguínea, transmissão oral e a transmissão congênita são outras formas de transmissão da infecção (18-22).

1.1.2. Epidemiologia

A doença de Chagas é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas do mundo, atingindo principalmente a população socioeconomicamente desfavorecida. Apesar de diversos programas de controle do vetor, a doença de Chagas é uma causa significativa de morbidade e mortalidade em muitos países da América do Sul e Central, estima-se que há 7 a 8 milhões de pessoas infectadas nessas regiões (13, 23, 24).

No Brasil, estima-se que 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas, com maior prevalência nas regiões Nordeste e Sudeste do país (25, 26).

A estagnação econômica e repressão política, resultaram no processo de migração de indivíduos provenientes de países endêmicos para doença de Chagas, rumo a países desenvolvidos, assim, alterou-se o perfil epidemiológico da doença, contribuindo para globalização dos casos. O número de casos diagnosticados tem aumentado em países não endêmicos, como nos Estados Unidos, Canadá, Europa, Austrália e Japão (27-31). Nestas regiões, este aumento representa um risco de ocorrência de transmissão do parasita via transfusão sanguínea, transplantes de órgãos ou infecção congênita. Na Espanha, em 2008, houve uma migração de 1,68 milhões de pessoas de países endêmicos, estima-se que 5,2% estavam infectados com *T. cruzi* e 17,4 mil indivíduos desenvolveram os sintomas da doença. Em alguns bancos de sangue dos Estados Unidos, as taxas

de contaminação por *T. cruzi* podem variar de 3 a 53%, excedendo, em alguns casos, a prevalência de HIV e hepatites B e C (29-32).

1.1.3. Controle e tratamento

A doença de Chagas é atualmente considerada antroponose e, como tal, deve permanecer, havendo sempre o risco de transmissão pelo vetor, por transmissão transfusional, vertical, oral ou acidental, e isso determina que a doença não seja erradicável. Porém, a possibilidade de controlar transmissão vetorial que é preconizada pela OMS/OPAS – Organização Mundial de Saúde e Organização Pan-Americana da Saúde (30, 31, 33-35).

O controle se dá através da eliminação do vetor por dedetização, melhora habitacional, utilização de mosquiteiros nas camas e telas nas janelas, bem como práticas de higiene no preparo e manuseio de alimentos para evitar a transmissão oral (36, 37). Para o controle da transmissão transfusional é necessária a triagem sorológica em doadores, para evitar a transmissão vertical, é realizada a triagem neonatal de recém-nascidos para tratamento precoce. Já o controle da transmissão acidental, é indispensável o uso de equipamentos de biossegurança (29, 32, 38, 39).

Segundo, OMS 2010, a transmissão do *T. cruzi* pelo seu vetor biológico foi reduzida em diversas regiões endêmicas, embora tal situação varie a depender do local. Apesar de diversos estudos, infelizmente não existe uma vacina para prevenção da doença de Chagas. Entretanto, o tratamento para doença envolve dois medicamentos antiparasitários (Benzonidazol e Nifurtimox), ambos requerem um longo tratamento e acompanhamento, devido aos altos efeitos colaterais

graves. Porém, tais medicamentos são contraindicados em caso de gravidez ou falência hepática e renal (36, 40).

Embora, não haja medicamentos ou procedimentos exclusivos para a cardiomiopatia chagásica, o tratamento dos sintomas cardíacos é o mesmo recomendado para outras cardiomiopatias (betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina ou bloqueadores dos receptores da angiotensina), entre outros (13, 24, 41).

1.1.4 Aspecto clínico da doença de Chagas

A evolução natural da doença é constituída por duas fases distintas, a fase aguda e crônica, segundo estudos clínicos e experimentais. A fase aguda pode durar de 2 a 3 semanas e caracteriza-se por alta parasitemia no sangue e nos tecidos, assim como, por uma intensa ativação do sistema imune (16, 42, 43).

A manifestação clínica na fase aguda é pouco característica e inclui febre, náusea, astenia, dores nos músculos e articulações e diarreia, sendo 95% dos casos assintomáticos. Os indivíduos sintomáticos possuem uma taxa de mortalidade de 5% e geralmente causada por meningoencefalite e miocardite (44-46). Devido à intensidade de miocardite, cerca de 10% dos pacientes podem apresentar manifestações clínicas graves, como sinais e sintomas de insuficiência congestiva cardíaca (47, 48). Em 50% dos casos agudos, no local da infecção é possível observar um edema bi palpebral unilateral com congestão das conjuntivas (sinal de Romãna) e/ou na pele (chagoma), essas lesões regredem dentro de um ou dois meses (Figura 1) (46, 49). Após a fase aguda, interpõe-se um longo período (20-30 anos), denominado de fase crônica, é caracterizada por um

declínio de parasitismo, resultado do estabelecimento de uma resposta imune relativamente eficiente (14). Na fase crônica, 60-70% dos pacientes permanecem na forma indeterminada da doença (assintomática), mas com níveis detectáveis de anticorpos séricos contra *T. cruzi*, ao fim do qual 30-40% evoluem para as formas sintomáticas crônicas da doença, apresentando a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), forma crônica digestiva ou cardiodigestiva (14, 50).

Entretanto, os fatores que determinam a patogenia da CCC, não foram completamente esclarecidos. Porém, estudos experimentais indicam que a carga parasitária durante a fase aguda influencia a ativação do sistema imune e a evolução da doença na fase crônica (51-53).

Figura1. **Evolução da infecção por T. cruzi.** A fase aguda tem manifestações clínicas pouco característica, porém em 50% dos casos há formação de Romã e/ou chagoma, sendo a taxa de mortalidade de 5%. 60 a 70% dos pacientes evoluem para a forma crônica indeterminada e assintomática, enquanto 30 a 40% dos pacientes desenvolvem a forma cardíaca ou digestiva da doença. Os fatores que determinam a evolução e estabelecimento da forma cardíaca ou digestiva ainda são desconhecidos. Fotografias retiradas de Rassi & Marin-Neto, 2010.

1.2. Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC)

A cardiomiopatia chagásica crônica é uma cardiomiopatia dilatada inflamatória, que leva a destruição de fibras cardíacas e ao aparecimento de extensa fibrose no miocárdio (54-56). A sintomatologia é caracterizada por arritmia ventricular e atrial, tromboembolismo e falência cardíaca (13, 49). Alterações eletrocardiográficas comuns incluem, o bloqueio de ramos direito (BRD), muitas vezes associado com hemibloqueio anterior esquerdo (HBAE), bloqueio atrioventricular (BAV) de 1°, 2° e 3° grau, ondas Q (despolarização septal), ondas P (despolarização atrial) anormais e baixa voltagem de QRS

(despolarização dos ventrículos – contração dos ventrículos). A combinação de BRD e HBAE é típico da CCC (14, 41).

Cerca de 1/3 dos pacientes com alterações cardíacas desenvolvem a cardiomiopatia dilatada grave (acompanhada ou não à forma arritmogênica), sendo que esses pacientes podem manifestar insuficiência cardíaca congestiva, responsável por elevado número de internações e 21.000 óbitos por ano (31, 57). Diversos trabalhos indicam que a CCC possui um prognóstico pior, com sobrevida até 55% mais curta do que em outras etiologias como a cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) (Figura 2) (58).

Figura 2. **Curvas de sobrevida de pacientes com insuficiência cardíaca** de acordo com a etiologia: cardiomiopatias chagásica e dilatada idiopática. Eixo x indica o tempo após o primeiro atendimento ambulatorial. Figura modificada de Pereira Nunes Mdo C, 2010.

A disfunção ventricular pode ser global e difusa ou pode ser localizada e segmentar, com a presença de uma lesão de ponta (59). A principal alteração ocorre na função sistólica, porém a função diastólica também é anormal (59, 60). É possível observar um aumento do volume e diâmetro e redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (59).

Através da correlação desses valores com o quadro clínico, a CCC pode ser dividida em quatro estágios (A, B, C e D). No estágio A estão pacientes da forma indeterminada, não possuem sintomas de insuficiência cardíaca e com eletrocardiograma e radiografia de tórax normal. Estágio B cardiopatas que não possuem sintomas de insuficiência cardíaca, este é dividido em B1 e B2. No estágio B1, estão cardiopatas com alterações discretas eletrocardiográficas e ecocardiográficas, porém a função ventricular é normal, estágio B2 estão cardiopatas que apresentam disfunção ventricular com fração de ejeção do ventrículo esquerdo reduzida. Cardiopatas no estágio C apresentam sintomas de insuficiência cardíaca e disfunção ventricular, estágio D possuem sintomas da insuficiência cardíaca em repouso, apesar do tratamento clínico otimizado necessita de intervenções intensivas (61).

No exame anatomopatológico evidencia-se dilatação das câmaras cardíacas e um aumento no peso do coração em pacientes chagásicos que faleceram devido à insuficiência cardíaca (46). Também é observada em alguns casos uma lesão anatômica macroscópica peculiar, conhecida como aneurisma apical (afinamento da ponta do ventrículo), e a presença de trombose mural ou tromboembolismo (59, 62-65).

Na análise histopatológica a principal característica é a miocardite crônica difusa, responsável pela destruição progressiva tissular do miocárdio (66). O infiltrado inflamatório presente na CCC é composto por células mononucleares na sua maioria macrófagos (50%), células B (10%) células T (40%), destes últimos com uma predominância de 2:1 de células T CD8⁺ sobre células T CD4⁺, sendo essas células responsáveis pela produção de parte das citocinas (67, 68). Devido à miocardite, pode-se observar uma extensa fibrose e consequente remodelação ventricular. A fibrose é essencial no processo de desorganização funcional e estrutural do coração, que culmina na falência do órgão (66).

Na infecção aguda em camundongos, são produzidas citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8) e quimiocinas (CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 α , CCL4/IP-1 β e CCL2), essas exercem um papel central da infecção por *T. cruzi*, no controle da fase aguda da doença de Chagas (69, 70).

Nosso grupo de pesquisa e outros demonstraram que pacientes com CCC, apresentam um aumento da resposta Th1, em comparação com pacientes assintomáticos, com alta produção pelas células do infiltrado inflamatório das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-15, porém, pouca ou nenhuma detecção de IL-4 e IL-10 (71-74). Resultados de pacientes com CCC demonstram uma maior frequência de células T CD4⁺ *T. cruzi* específicas produtoras de IFN- γ e níveis reduzidos de IL-10, sugerindo que esses pacientes possuíam uma deficiência na regulação de IFN- γ por IL-10 em comparação aos pacientes de forma indeterminada (75, 76).

Análises de expressão gênica por microarranjos (*microarray*) de cDNA e PCR quantitativo (qRT-PCR), indicaram a expressão diferencial de vários genes induzidos por IFN- γ , como por exemplo as quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10. Esse perfil de expressão foi evidenciado como específico do pacientes com CCC, o mesmo não sendo evidenciados em pacientes CDI, ambos em comparação a amostras controle provenientes de tecido miocárdico normal de doadores de órgãos, mas não em portadores de cardiomiopatia dilatada idiopática, ambos em estágio terminal, em comparação com miocárdio normal (68).

Entretanto, alguns genes induzidos pelo IFN- γ não estão relacionados diretamente ao processo inflamatório, dados do nosso grupo sugerem que o IFN- γ produzido em tecido cardíaco em pacientes com CCC, isoladamente ou em combinação com quimiocinas por ele induzidas, pode ter capacidade de alterar expressão de genes contráteis em cardiomiócitos, induzindo a hipertrofia (68). A hipertrofia cardíaca é caracterizada pelo aumento do tamanho das células na ausência da divisão celular, acompanhado com alteração da expressão gênica. Essa tem sido geralmente considerada uma característica da CCC - consequência indireta da inflamação persistente e do dano miocárdico (77). Na fase aguda da doença de Chagas também foi observado um aumento do tamanho de cardiomiócitos *in vitro* e aumento da expressão de genes para as proteínas contráteis (78). Também foi vista expressão aumentada do peptídeo vasoativo endotelina-1 (ET-1) e do fator hipertrófico cardiotrofina-1 (CT-1) no coração de ratos, bem como redução na contratilidade de ambos os ventrículos em camundongos, tão cedo quanto 10 a 15 dias após a infecção com *T.cruzi* (79, 80).

Resultados em pacientes com CCC e com a forma indeterminada da doença de Chagas mostraram níveis plasmáticos elevados de TNF- α e MCP-1 em comparação com indivíduos saudáveis. Citocinas inflamatórias e o TNF- α são relacionados com hipertrofia, sugerindo que a inflamação miocárdica contribui para evolução da CCC (81). Estudos mostraram que MCP-1 pode induzir a produção de citocinas IL-1- β e IL-6, sendo que o TNF- α e IL-1- β podem induzir hipertrofia em cardiomiócitos em cultura (78, 82, 83). Além disso, foi observada em pacientes com CCC ou cardiomiopatia dilatada idiopática a indução de genes embrionários envolvidos na hipertrofia, tais como o fator natriurético atrial (ANF, do inglês “*atrial natriuretic factor*”) e proteínas sarcoméricas alfa-actina do músculo liso, cadeia leve de miosina-2, cadeia pesada de miosina cardíaca de músculo liso (68).

Pelo fato de serem produzidas várias citocinas com atividade hipertrófica e frente ao aumento de genes embrionários e proteínas sarcoméricas na infecção por *T.cruzi*, sugere que a hipertrofia de cardiomiócitos é, provavelmente, uma característica tanto da fase aguda, quanto da fase crônica da doença (68, 78, 84).

Ainda há divergência quanto aos mecanismos de regulação das modificações moleculares e fisiológicas envolvidas na CCC, mostrando a importância do estudo da doença de Chagas, com o intuito de melhor compreender a sua patogênese e o motivo do pior prognóstico da CCC, ainda pouco esclarecido.

1.3. Cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI)

A cardiomiopatia dilatada apresenta uma etiologia heterogênea, sendo que 50% dos casos são devido à cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) (85). Resultados obtidos nos Estados Unidos indicam que 37% dos casos de insuficiência cardíaca são causados pela CDI (86). Essa é a terceira maior causa de insuficiência cardíaca crônica, com um índice de mortalidade anual de 95% na população mundial (58).

O diagnóstico da doença ocorre entre os 18 e 50 anos de idade, pode atingir crianças e idosos, sendo em maior proporção no sexo masculino (87, 88). As alterações cardíacas características na CDI são a dilatação ventricular progressiva devido à intensa remodelação do miocárdio e redução da função ventricular esquerda ou biventricular, sem doenças associadas que possam explicar essas alterações (89).

As características histopatológicas incluem fibrose, necrose dos miócitos e ausência ou leve infiltração inflamatória (89). Estudos sugerem que 25% dos casos estão relacionados à transmissão genética, enquanto a maior parte é de origem viral, possivelmente mediada por mecanismos imunológicos. No entanto, supõe-se que os fatores genéticos, alterações imunológicas e fatores infecciosos agem sinergicamente, ocasionando um quadro clínico heterogêneo (90).

Nos fatores infecciosos é possível observar a associação de alguns vírus com a CDI. Dados mostraram que 38% de 624 pacientes apresentaram genomas virais identificados como, o adenovírus, enterovírus, citomegalovírus, coxsackie, porém o papel desses vírus não foi amplamente estudado (91). Evidências

indicam que o vírus Coxsackie B3 pode causar 7-30% das miocardites agudas, dos quais aproximadamente 15% podem progredir para CDI (92). Existem diversas hipóteses sugerindo mecanismos de lesão celular a partir da infecção viral, seja por lesão viral direta, por mecanismos imune-mediados ou autoimunes (93).

O prognóstico é baseado com o grau de disfunção do miocárdio e complicações como arritmias e tromboembolismo. As arritmias são frequentes e quando associadas à baixa função ventricular possuem correlação com risco de morte súbita (89). Os medicamentos utilizados para melhorar os sintomas cardíacos, são betabloqueadores, antiarrítmicos, agentes inotrópicos, entre outros. Em pacientes graves têm indicação de transplante cardíaco (94).

Em suma, as causas das alterações cardíacas apresentadas na CDI ainda são desconhecidas, mostrando a importância dos estudos sobre a doença.

1.4. Matriz extracelular e Remodelamento Cardíaco

A matriz extracelular (MEC) é um dos principais componentes do microambiente celular e possui um papel fundamental na estrutura e homeostase tecidual, sendo responsável pelo alinhamento das células e pela integridade estrutural do tecido, além da migração e a diferenciação das células adjacentes (95, 96). Esta é altamente dinâmica e passa constantemente por um processo de remodelação, onde os componentes da MEC são depositados, degradados ou modificados, sendo essa dinâmica indispensável durante a reestruturação da arquitetura tecidual (96).

Os principais componentes proteicos da MEC são os colágenos e as elastinas (estruturais), os quais são produzidos e secretados por um grande número de células estromais, sendo necessários para a organização dos diferentes tecidos (97, 98). Outras proteínas que também fazem parte da MEC são as glicoproteínas adesivas, tais como, laminina, fibronectina e tenascina, além de proteoglicanos, glicosaminoglicanas, ácido hialurônico (99). Juntos, esses componentes da MEC formam uma estrutura que mantém sua integridade tecidual, regulam a migração celular e formam um reservatório de moléculas bioativas e fatores de crescimento (97).

Os principais componentes da MEC do miocárdio são o colágeno do tipo I, III e V, esses são produzidos por fibroblastos presentes no tecido cardíaco e responsáveis pela integridade estrutural dos cardiomiócitos adjacentes, proteases e determinados tipos celulares, que desempenham o remodelamento cardíaco (100). A membrana basal vascular é constituída por colágeno IV, elastina, fibronectina e proteoglicanas (100). Estudos demonstraram uma grande quantidade de moléculas bioativas presente na MEC do miocárdio, tais como, angiotensina II, endotelina-1, citocinas anti e pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento na forma latente, como TGF- β (101-105).

As alterações na MEC do miocárdio, assim como mudanças no equilíbrio entre sua síntese e degradação e na continuidade da rede de colágeno, bem como alteração na conformação das células são características do remodelamento cardíaco (100).

O processo de remodelamento cardíaco envolve um conjunto de alterações (neuro-humorais, moleculares, celulares e intersticiais cardíacas) fisiológicas ou em resposta a agressões agudas ou crônicas de origem infecciosa e/ou inflamatória (106). As alterações se manifestam clinicamente na estrutura (massa, formato e dimensão) e função cardíaca, que são influenciadas pela resposta dos cardiomiócitos a sobrecarga pressórica, volumétrica ou dano celular associado à ativação neuro-humoral (107).

O remodelamento cardíaco pode ser classificado como fisiológico durante o desenvolvimento normal do coração, além disso, pode ser adaptativo e benéfico, como observado em atletas (107, 108). No entanto, pode ocorrer em processos patológicos de diversas etiologias, como observado em pacientes com CCC, devido ao processo inflamatório no miocárdio. Como mencionado anteriormente, a CCC provoca uma diminuição da contratilidade miocárdica e a dilatação do ventrículo esquerdo que tem sido associados ao remodelamento cardíaco (109). O remodelamento ventricular na CCC é adverso e geralmente envolve a hipertrofia do miocárdio, fibrose intersticial, morte dos cardiomiócitos (necrose ou apoptose), ativação de genes embrionários e acúmulo de proteínas contráteis (68).

Os cardiomiócitos estão totalmente envolvidos no processo de remodelamento cardíaco. Quando sofrem lesão aguda ou crônica, ocorre uma diminuição em seu número e os cardiomiócitos remanescentes tornam-se alongados e hipertrofiados, com o objetivo de manter o débito cardíaco, o que causa o aumento da espessura da parede ventricular (107).

Biópsias endomiocárdicas do ventrículo direito ou esquerdo de pacientes com CCC demonstram uma significativa hipertrofia de cardiomiócitos (110). Em pacientes com cardiomiopatia dilatada a hipertrofia cardíaca é do tipo excêntrica, com um aumento relativamente maior no comprimento do que na largura dos cardiomiócitos (111).

A hipertrofia se estabelece inicialmente na tentativa de manter a função cardíaca normal, entretanto, em determinado momento a sobrecarga ultrapassa a capacidade hipertrófica do coração, levando a um relaxamento cardíaco com alteração contrátil (112).

Além disso, ocorre ativação neuro-humoral que ao longo prazo leva a progressão da doença e ao processo de remodelamento ventricular (113). A ativação dos sistemas simpáticos renino-angiotensina-aldosterona, são os principais envolvidos nesse processo, além do aumento de expressão de genes embrionários, citocinas, quimiocinas e proteínas contráteis, características da hipertrofia (107, 113, 114). O aumento de angiotensina II estimula a produção de TGF- β 1, que irá aumentar a produção e proliferação de colágeno em fibroblastos, bem como o aumento de aldosterona que estimulará a síntese de colágeno determinando a fibrose cardíaca contribuindo para o remodelamento ventricular (7, 9, 115-118).

Os colágenos fibrilares presentes no miocárdio são do tipo I, III e V. Este tipo de colágeno fibrilar é relativamente rígido e interage com outros componentes do miocárdio, contribuindo com a manutenção da estrutura e com a função do ventrículo (119). O desequilíbrio entre a síntese e a degradação ocasiona

alterações na composição da rede de colágeno no miocárdio (119). Os colágenos e outros componentes da MEC são degradados em grande parte por um grupo de proteases denominadas metaloproteinases de matriz, que possuem atividade proteolítica dependente de zinco (106).

Esses colágenos degradados são substituídos por fibras de colágenos com uma fraca capacidade de interação, promovendo a dilatação ventricular, diminuição da rigidez dos ventrículos e disfunção sistólica, deformando a arquitetura do coração (119, 120). Por outro lado, se houver um aumento da quantidade de ligação cruzada de colágeno (processo pelo qual os colágenos estão ligados covalentemente um ao outro), isto resulta no aumento da rigidez ventricular e disfunção diastólica (120). Pacientes com CCC apresentam graus variados de deposição de colágeno, contribuindo com a disfunção do miocárdio (121, 122).

Esses fatores envolvidos no remodelamento cardíaco inicialmente diminuiriam os desequilíbrios, permitindo a manutenção da função cardíaca. Porém, em determinado momento passa a se estabelecer um círculo vicioso que culminará na alteração da arquitetura cardíaca, contratilidade e no relaxamento cardíaco. A partir desse estágio, o remodelamento cardíaco será ineficiente e as alterações progressivas tornam-se deletérias e associadas a um pior prognóstico.

1.5. Metaloproteinases da Matriz (MMPs)

As MMPs foram primeiramente identificadas em 1962 em um estudo que mostrou a atividade enzimática na degradação da tripla hélice do colágeno, durante o fenômeno da metamorfose da cauda do girino (123). Essa enzima foi

denominada de collagenase intersticial, e posteriormente denominada de MMP-1, diversos estudos ajudaram em sua descrição, mostrando seu papel na clivagem de diversos componentes da MEC (124).

Desde a primeira menção a este grupo de enzimas, há 52 anos, são classificadas como uma família multigênica codificada por 24 genes distintos em humanos, que são expressos como 26 diferentes endopeptidases, zinco-cálcio dependentes (Tabela 1) (125). As MMPs são classificadas em cinco grandes grupos de acordo com a especificidade do substrato e sua homologia interna, são estas: collagenases, gelatinases, estromelisinases, tipo-membrana e matrilisina.

Tabela 1. **Classificação das MMPs de acordo com seu nome descritivo e seus principais substratos.**

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

Fonte: Adaptado de Rydlova et al., 2008.

Essas proteases compartilham a mesma topologia estrutural, com pré e pós-domínios, seguidos de um domínio catalítico. O pré-domínio NH_2 – terminal é uma pequena porção hidrofóbica que direciona a síntese dessas proteases para o retículo endoplasmático e a secreção para o espaço extracelular. O pró-domínio localizado após o pré-domínio com aproximadamente 80 aminoácidos, esse contém um conservado resíduo de cisteína que interage com o íon zinco (Zn_2^+) no sítio ativo do domínio catalítico e impede a ligação e clivagem do substrato, mantendo a enzima em sua forma inativa. No domínio catalítico o íon zinco (Zn_2^+) está ligado ao sítio ativo por três resíduos conservados de histidinas, esse está ligado ao C-terminal por uma articulação flexível (região da alça), que possui uma estrutura variável. É no sítio ativo que os substratos se ligam especificamente à protease (Figura 3A) (126, 127).

O domínio hemopexina é uma estrutura composta por 4 hélices betas que proporciona uma estrutura plana, esse domínio está ausente em MMP-7 e MMP-26. As MMP-2 e -9 possuem em suas estruturas 3 repetições de fibronectina do tipo II inserido no domínio catalítico, aumentando sua especificidade ao substrato (Figura 3B) (125, 128).

As MMPs tipo membrana (MT-MMPs) possuem em sua estrutura um domínio hidrofóbico transmembrana do tipo I, seguido de uma cauda citosólica, que interage com proteínas intracelulares, e ainda, possuem uma conformação diferente do sítio catalítico (“MT-loop”), porém as MT4-MMP e MT6-MMP, não apresentam o domínio transmembrana, a cauda citosólica e o “MT-loop”, mas são ancoradas à membrana por âncoras glicosilfosfatidilinositol (GPI) e apresentam

uma região adicional (“stem” ou “stalk”), entre o domínio hemopexina e a âncoras GPI, contendo 2 a 3 cisteínas que proporcionam a formação de pontes de dissulfetos, sugerindo que estas proteases apresentam um conjunto de funções distintos das demais MMPs (Figura 3B) (129-131).

Figura 3. **A.** Domínios Estruturais das MMPs. **B.** Grupos baseados no Domínio Estrutural das MMPs Figura modificada de Marc A. Lafleur et al, 2003.

As MMPs são sintetizadas e secretadas como zimogênios (pró-MMP), e assim, requerem ativação proteolítica que ocorre após remoção do pró-peptídeo NH_2 – terminal. Esse processo ocorre pela quebra da ligação entre o grupo tiol da cisteína no pró-peptídeo e o zinco no domínio catalítico, assim, o local para ligação ao substrato fica exposto e o zinco disponível para se ligar a uma molécula de água, cuja presença é indispensável para o processo catalítico (125, 132). Ademais, todas MMPs são ativas em pH neutro e requerem cálcio (Ca^{2+}) para manutenção da conformação estrutural. Estudos demonstraram que esse processo de ativação pode ser mediado por diversas proteases e outras MMPs, ou alternativamente, por tratamentos químicos com ureia, detergentes, radicais livres, citocinas e fatores de crescimentos (132, 133).

Apesar da maioria destas proteases serem secretadas como pró-enzimas, algumas pró-MMPs, como as MMP-11, MMP-21 e MMP-28, possuem uma sequência de reconhecimento da pró-proteína convertase tipo furina localizada no final do segmento pró-peptídeo e são ativadas intracelularmente e secretada para MEC, bem como, as MT-MMPs e MMP-23, ancoradas à membrana na forma ativa (133-135). Outros fatores envolvidos na ativação das MMPs, ocorre por ação de proteases séricas como plasmina ou por ação de outras MMPs que podem ativar outros membros da família, como a ativação pela formação do complexo molecular ternário MMP-2/MT1-MMP/TIMP-2 (136, 137).

Além disso, foi identificado um indutor de metaloproteinases da matriz, denominado de EMMPRIN (CD147), é uma glicoproteína transmembrana com 2 domínios semelhantes a imunoglobulina (Ig). É expresso em células epiteliais,

fibroblastos, tecido sinovial em artrite reumatoide, células monucleares, células T e B ativado, células dendríticas, entre outros (138-140). É conhecido por induzir células a produzirem as MMPs, por aumentar a proliferação celular, promover a síntese de ácido hialurônico e a angiogênese, através do aumento de VEGF (do inglês, “*vascular endothelial growth factor*”). Essa interage com várias moléculas, incluindo caveolina, ciclofelina 60 e transportadores de monocarboxilatos (141, 142).

Como mencionado anteriormente, as MMPs são capazes de degradar componentes da MEC e moléculas insolúveis liberando fragmentos bioativos, e por isso, participam de uma variedade de processos fisiológicos como, angiogênese, reparação tecidual, morfogênese, cicatrização de feridas e mobilização de células-troncos (143). Além disso, a clivagem proteolítica de proteínas da MEC por MMPs e/ou mudanças conformacionais da mesma, “desmascara” sítios matricrípticos e libera fragmentos de macromoléculas bioativas, que não são observadas nas moléculas intactas, e assim, podem exercer suas funções biológicas (144). Esses sítios matricrípticos provavelmente fazem parte de uma estratégia evolutiva para controlar diferentes atividades celulares, assim, determinadas instruções podem permanecer na molécula intacta até serem requeridas, não havendo necessidades de inibidores ou bloqueio de atividade que não foi requisitada em determinado momento (144).

Nos processos fisiológicos as atividades das MMPs estão sob controle entre ativação e inibição. Essas proteases são reguladas aos níveis transcricional, pós- transcricional, proteico via seus ativadores/inibidores e interação com

componentes específicos da MEC (145). A expressão gênica dessas proteases é regulada por diversos fatores estimulantes e supressores que influenciam muitas vias de sinalização, tais como, citocinas, fatores de crescimento, hormônios, epigenética, entre outros (146).

Ao nível de inibição enzimática, tanto a pró-MMP e MMP ativa podem ser inibidas na MEC por seus inibidores, situados na membrana plasmática, como a proteína RECK (do inglês, “*Reversion Inducing Cysteine Rich Protein with Kazal Motifs*”). A proteína RECK é o único inibidor das MMPs ancorado à membrana celular e inibe principalmente as MMP-2, MMP-9, MT1-MMP e supostamente a MMP-7 (147, 148).

Várias MMPs exercem um *feedback* autócrino, por vários inibidores endógenos de proteases que inibem a conversão proteolítica das MMPs, tais como, a quimiotripsina – 1 (α 1-CT), 1-proteinase (α 1-PI) e α 2 macroglobulina (α 2-M). Os principais inibidores endógenos das MMPs são os TIMPs, foram identificados 4 tipos de TIMPs (TIMP-1 a 4), esses possuem uma estrutura com 2 domínios distintos, sendo 1 N-terminal composto por 125 resíduos de aminoácidos e 1 domínio C- terminal com cerca de 75 resíduos de aminoácidos, a conformação estrutural de cada domínio é estabelecida por 3 pontes de dissulfetos. Em humanos, esses inibidores possuem entre eles, cerca de 40% de similaridade na sequência gênica, sendo que o TIMP-2 e TIMP-4 são 50% idêntica, enquanto que o TIMP-1 é apenas 37-41% idêntica a outros TIMPs (146, 149). Os TIMPs se ligam às pró-MMPs por ligação de seu domínio C-terminal com o domínio hemopexina da pró-MMP, formando um complexo TIMP-MMP (149). Esta ligação

é relativamente específica, sendo que o TIMP-1 é mais restrito na sua gama de inibição do que os outros TIMPs, possuindo uma afinidade relativamente baixa para MT1-MMP, MMP-16, MMP19 e MMP-24. Já o TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 ligam-se à MMP-2 e o TIMP-1 e TIMP-3 à MMP-9 (149). Como mencionado anteriormente, a interação entre o TIMP-2 com a pró-MMP-2 também é parte de um mecanismo de ativação da pró-MMP-2. Neste processo, a MT1-MMP desempenha um papel fundamental, onde o domínio catalítico da mesma interage com o complexo pró-MMP-2-TIMP-2 através do domínio N-terminal do TIMP-2 e formam um complexo ternário de molécula associada à membrana. Esse complexo ternário não se encontra ativo, mas a ativação proteolítica da pró-MMP-2 é através da clivagem do seu pró-domínio por uma segunda molécula MT1-MMP, esse processo é facilitado pela interação entre 2 moléculas MT1-MMP por meio de seu domínio hemopexina. No entanto, os TIMPs possuem atividades além da inibição de MMPs, como promover a proliferação celular, atividade antiangiogênica pró e antiapoptótica (146, 150).

A partir do momento que ocorre desequilíbrio entre os níveis de MMPs e TIMPs, o processo fisiológico passa a ser patológico, o que vem atraindo mais a atenção de pesquisadores nos últimos anos é, sem dúvida, sua relevante participação em um grande número de patologias, como doenças cardiovasculares, câncer e diversos tipos de doenças inflamatórias (151).

Estudos mostraram que as MMP-2 e MMP-9 estão presentes no miocárdio e são capazes de degradar os componentes da MEC cardíaca, sendo que um aumento dessas proteases pode resultar na degradação das fibras de colágenos,

remodelamento da matriz extracelular com consequente dilatação ventricular progressiva (7, 9, 152).

Além disso, durante o estresse oxidativo essas MMPs podem clivar proteínas intracelulares como trombina e miosina (153, 154). A MMP-2 e MMP-9 são ativadas no coração humano após a isquemia e sua atividade correlaciona-se negativamente com o índice de função contrátil do ventrículo esquerdo e positivamente com a duração de isquemia (155).

Entretanto, as MMPs estão associadas a processo de remodelamento tecidual e possuem um papel essencial nas doenças parasitárias causada por protozoários (156). Foi demonstrado um aumento da atividade e expressão gênica das MMP-2 e MMP-9 no tecido cardíaco de camundongos infectados agudamente com *T.cruzi*, e que estes camundongos tratados com inibidores dessas MMPs apresentaram uma diminuição significativa na inflamação cardíaca, níveis reduzidos de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico, além de um aumento da sobrevida em comparação ao grupo controle, sugerindo um papel importante das MMPs na indução da miocardite mediada pelo *T.cruzi* (157). Nesse mesmo estudo, os autores apontam que a degradação da arquitetura da MEC miocárdica com o deslocamento de células inflamatórias é o principal mecanismo pelo qual MMP-2 e MMP-9 contribuem para miocardite chagásica, porém esse mecanismo não está completamente elucidado (157).

Assim, as MMPs podem ser consideradas moléculas importantes nas alterações patológicas do miocárdio observadas em pacientes com CCC.

1.6. MicroRNAs como importantes reguladores pós-transcricionais das MMPs e TIMPs

Nos últimos anos tem-se visto que não apenas os genes codificadores de proteína são importantes. 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 possuem papel fundamental em diversos processos biológicos assim como em diferentes patologias (158, 159). Alguns trabalhos têm demonstrado que os miRNAs estão diretamente envolvidos na regulação dos componentes da MEC, assim como no controle da expressão de várias MMPs e TIMPs.

1.6.1. Biogênese e mecanismo de ação

Os microRNAs foram descritos em *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) e são uma classe abundante de moléculas de RNA de fita simples que contêm em média 22 a 24 nucleotídeos que regulam expressão gênica através do pareamento específico de bases com os RNAs mensageiros (RNAm), causando a inibição da tradução do RNAm em proteína ou causando a degradação desse último. (160).

Sua biogênese inicia-se no núcleo onde são transcritos, de genes localizados nas regiões intergênicas ou intragênicas do genoma (161). Podem estar contidos em regiões intrônicas de transcritos codificadores ou não e uma minoria pode ser encontrada em regiões isoladas do genoma, dentro de exons de genes não codificadores ou nas extremidades 3'-UTR (do inglês, “3'-*Untranslated Region*”

(161). A transcrição dos microRNAs é feita pela RNA polimerase II ou III, formando um longo transcrito denominado microRNA primário ou pri-microRNA (do inglês, “*primary microRNA*”), o qual sofre a adição de uma cauda poli-A na extremidade 3’ e de uma 7-metil-guanosina na extremidade 5’ (162). O pri-microRNA formado é, então, processado pelo complexo constituído pela RNase III *Drosha* e seu co-fator, DGCR8 (do inglês, *DiGeorge Syndrome critical region gene 8*), que o cliva, formando o pre-microRNA. Este último é um microRNA de fita dupla em forma de grampo, com cerca de 70 nucleotídeos, exportado do núcleo para o citoplasma pelo complexo Exportina-5/Ran-guanosina trifosfato (GTP) (162,163). No citoplasma, o pré-microRNA é processado por outra RNase III, *Dicer*, gerando um duplex microRNA: microRNA (10, 162, 163). Em seguida, este duplex associa-se ao complexo multiproteico RISC (do inglês, “*RNA-induced silence complex*”), uma das fitas da molécula representa o microRNA maduro, capaz de impedir a tradução do RNAm alvo, seja pela repressão deste processo ou pela degradação do transcrito (164).

Ação destas moléculas de RNA depende de complementariedade de bases em seu pequeno tamanho, portanto, fornece pouca especificidade, o que quer dizer que um mesmo microRNA pode ter alvos diversos (165). A repressão se dá pela ligação – total ou parcial – do microRNA à região *seed* do RNAm alvo, geralmente na sequência 3’-UTR (165). Em animais, raramente ocorre complementariedade total entre o microRNA e seu alvo e, nestes casos, o RNAm é degradado (165). Em geral, o pareamento ocorre com falhas e isto resulta na repressão da tradução (165). Em mamíferos, aproximadamente 30% dos genes

estão sob possível regulação de um microRNA. Tais associações entre microRNA e RNAm, uma vez adquiridas, tendem a ser conservadas evolutivamente, o que reforça sua importância biológica (166). Estudos funcionais indicam que estas moléculas estão envolvidas na maioria dos processos celulares e, portanto, alterações em sua expressão estão associadas à gênese de muitas patologias (167, 168).

Dados recentes indicam que a expressão de microRNAs está relacionado ao desenvolvimento cardíaco normal, bem como sua homeostase. Em um estudo os autores obtiveram sucesso na tentativa de reprogramar fibroblastos cardíacos de maneira a transformá-los em cardiomiócitos, apenas utilizando transfecção de microRNAs, onde os mesmos foram capazes de induzir tal transformação em miocárdio murino isquêmico, indicando que estas moléculas participam ativamente do desenvolvimento cardíaco (170).

Um exemplo da importância dos microRNAs em doenças cardiovasculares foi dado por Van Rooij e colaboradores, em um trabalho onde foi visto que a deleção do microRNA-208 protege camundongos da hipertrofia cardíaca e fibrose induzida por bandagem da artéria aorta (169). Já a expressão aumentada transgenicamente deste mesmo microRNA, levou ao desenvolvimento de hipertrofia em camundongos com 4 meses de idade (170). Os microRNAs 1 e 133 – que compartilham o mesmo transcrito primário - são também frequentemente associados a diferentes situações envolvendo hipertrofia cardíaca, sendo ambos pouco expressos nestes casos (171, 172). Além disso, muitos outros acometimentos cardíacos têm sido associados à expressão diferencial de

microRNAs (173). Além disso, tem sido descrito que as MMPs e TIMPs envolvidas no remodelamento cardíaco podem ter sua expressão regulada pós-transcricionalmente por microRNAs. Como exemplo temos o microRNA-21 que regula a transcrição da MMP-2 durante a isquemia miocárdica e microRNA-188 que está envolvido no remodelamento cardíaco durante estresse oxidativo regulando a expressão das MMP-2 e 9 e os TIMPs 1 e 3 (174, 175). Em outras patologias também já foi demonstrado a importância dos microRNAs como reguladores da expressão das MMPs, como exemplo o papel dos microRNAs, microRNA-885-5p e microRNA-491-5p que reduzem o nível de MMP-9 em células de glioblastoma (171).

2. JUSTIFICATIVA

A patogênese da Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) ainda é um assunto de intenso debate. Apenas uma fração dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (~30%) desenvolve a CCC. Sabe-se que pacientes com CCC tem pior prognóstico em relação àqueles com outras cardiomiopatias dilatadas de etiologia não inflamatória. As principais características das lesões da CCC são a presença de miocardite, fibrose, hipertrofia e remodelamento cardíaco. As MMPs e TIMPs possuem um importante papel na lesão do miocárdio e no remodelamento cardíaco. A compreensão das alterações ocorridas nestas moléculas, bem como dos mecanismos de regulação envolvidos representam uma rica ferramenta para melhor compreensão da patogênese da doença de Chagas.

3.HIPÓTESE

As considerações feitas até o momento nos levaram à hipótese de que o perfil da expressão e atividade das MMPs e de seus inibidores TIMPs na Cardiomiopatia Chagásica Crônica será distinto do encontrado na Cardiomiopatia dilatada Idiopática.

.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel das MMPs e TIMPs na Cardiomiopatia Chagásica Crônica.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica das seguintes MMPs: 1, 2, 3, 8, 9, 13, 12, e EMMPRIN e dos seguintes TIMPs: 1, 2, 3 e 4 e o inibidor RECK,
2. Avaliar a atividade proteolítica da MMP-2 e MMP-9,
3. Avaliar o colágeno intersticial,
4. Por análise “*in silico*” (*software Ingenuity-IPA*) e com base na literatura identificar microRNAs regulatórios das MMPs e TIMPs e analisar sua expressão gênica e correlacionar os dados obtidos.

5. METODOLOGIA

5.1. Desenho Experimental

Figura4. **Delineamento experimental do trabalho.** Amostras de tecido miocárdio de pacientes com aproximadamente 100mg da parede lateral do ventrículo esquerdo de 35 pacientes, sendo 17 CCC, 12 CDI e 6 corações de doadores de órgãos (Controle), que por motivos técnicos não foram utilizados para transplante. Para verificar a infecção, foram analisadas a histologia do tecido cardíaco. Em seguida, foi extraído o RNA total e enriquecidos, para análise de MMPs, TIMPs e microRNAs, respectivamente. Após a reação de transcrição reversa, as amostras foram analisadas por qRT-PCR. Para análise de expressão proteica e atividade proteolítica, foram utilizadas 15 amostras, sendo 5 CCC, 5 CDI e 5 Controles. Após a extração proteica, foi realizado a quantificação das proteínas por método de *Bradford* e feito um gel 1D para ver a integridade, das mesmas, em seguida, foram analisados por "Western Blotting" e zimografia, respectivamente. Para análise morfométrica de colágeno, foram utilizadas 15 lâminas contendo cortes das amostras do ventrículo esquerdo, sendo 5 CCC, 5 CDI e 5 Controles, coradas por método de Picrosirius red, em seguida analisadas e quantificadas pelo programa *Qwin Image Plus* (Leica), acoplado a microscopia ótica. Para predição de microRNAs, foi feito análises de bioinformática, pelo software *Ingenuity Pathway Analysis*.

5.2. Amostras de miocárdio humano

As amostras de tecido miocárdico de pacientes que estamos utilizando no presente projeto consistem de fragmentos de aproximadamente 100mg da parede lateral do ventrículo esquerdo de coração de 35 pacientes, sendo que 17 com Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC), 12 com Cardiopatia dilatada idiopática (CDI) que passaram por transplante cardíaco e 6 corações de doadores de órgãos (Controle), que por motivos técnicos não foram utilizados para transplante. As amostras após serem coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. A captação destas amostras de tecido foi iniciada através de uma colaboração entre o Laboratório de Imunologia e a equipe de transplantes do Centro Cirúrgico do INCOR-HC, com aprovação da Comissão Científica do Instituto do Coração (SDC 4002/13/127), pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n 492/682 – Anexo A).

5.2.1. Análise histopatológica das amostras de miocárdio

Fragmentos do miocárdio (parede lateral do ventrículo esquerdo) foram fixados em solução tamponada (pH=7,2) contendo 10% de formalina e posteriormente processados pelo método de inclusão em parafina. Os fragmentos foram cortados transversalmente em secções de 5µm e submetidos à coloração por hematoxilina e eosina (HE) e por Picrosirius red (para fibras de colágenos). Os procedimentos foram realizados respectivamente pelo Serviço de Patologia do Instituto do Coração (InCor-HC-FMUSP), em colaboração com o Dr. Luiz

Benvenuti e pelo Laboratório de Biologia Celular - Departamento de Patologia (FMUSP), em colaboração com a Dra. Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues.

5.3. Análise da expressão gênica das MMPs e TIMPs por Real Time (qRT - PCR)

5.3.1. Extração de RNA total

As amostras com aproximadamente 100mg da parede lateral esquerdo de coração de 17 pacientes com CCC, 12 pacientes com CDI e 6 doadores de órgão (Controle) foram imersas em 1ml de Trizol (*Life Technologies*). A homogeneização dos tecidos foi feita utilizando tubos com esferas de cerâmica e o equipamento *Precellys* (*Bertin Technologies*) a 6.000rpm, 3 ciclos de 15 segundos e pausa de 20 segundos cada. Após esta etapa transferimos os homogenatos para tubos de 1,5ml e adicionamos 0,2ml de clorofórmio para a extração orgânica do RNA total, transferimos às respectivas fases aquosas de cada alíquota em tubos de 1,5ml (DNases e RNases free) e foi adicionado 0,5ml de álcool isopropílico. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 13.000rpm por 15 minutos a 4°C. Removemos o sobrenadante e adicionamos 1ml de etanol 75% ao *pellet* de RNA total. Em seguida, centrifugamos a 10.000rpm por 8 minutos a 4°C, desprezamos o sobrenadante com cuidado e deixamos o *pellet* de RNA total secar, com o objetivo de evaporar o etanol. Ressuspendemos o *pellet* de RNA total em 20µL de água DEPC (Dietilpirocarbonato), (*Sigma-Aldrich*, Alemanha), e estes foram armazenados a -80°C. A concentração e possível contaminação com proteína do

RNA total foi estimada pela absorbância a 230nm utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)* e observamos a razão das absorbâncias 260/280nm, pois é estabelecido que uma razão entre 1,8 e 2,0 é indicador de qualidade.

5.3.2. Quantificação e análise da integridade do RNA total

A quantificação de RNA foi feita em espectrofotômetro (*Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Delaware, EUA*), com base na relação da absorbância A260nm: A280nm e da leitura a A230nm. O grau de pureza relativo à presença de contaminantes proteicos foi obtido pelo cálculo do quociente A260nm: A280nm, onde uma razão compreendida entre 1,8 e 2,0 é o indicador de qualidade. A integridade das amostras foi analisada no equipamento *2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc, EUA)*, em matriz de gel aplicado nos capilares do chip, contendo uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular. A ligação dos fluoróforos aos marcadores e ao RNA resulta em fluorescência que é quantificada, permitindo a separação do rRNA 18S e 28S e a atribuição de um score de integridade (RIN, do inglês, *RNA integrity number*), que varia de 1 a 10. Foram consideradas suficientemente íntegras as amostras com RIN igual ou maior que 7. De acordo com tais análises, foram obtidas amostras de RNA de boa qualidade, com valores médios de RIN=7,9, razão A260nm: A280nm=1,99. Os valores individuais de cada amostra, a concentração em (µg/µl) e o exemplo de análise do RIN, podem ser observados no item Anexos B. As amostras foram alíquotadas e acondicionadas a -80°C até o momento do uso.

Após, verificarmos que os RNAs estão puros e íntegros para ser utilizados, iniciamos nossos experimentos de expressão gênica.

5.3.3. Transcrição Reversa (cDNA)

Após a quantificação e constatação da qualidade e pureza do RNA, foi feita a reação de transcrição reversa (*Reverse Transcriptase – RT*). Possíveis contaminações com DNA foram eliminadas através do tratamento das amostras com DNase I. A reação de transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada utilizando-se 5µg de RNA total e a enzima transcriptase reversa (*Super-script II™ Reverse Transcriptase, Invitrogen*). Para este protocolo foi adicionado ao RNA, 1µL do iniciador (primer) oligodT (500 µg/mL), 1µL de dNTP (10mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e água DEPC para um volume final de 12µL. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos em termociclador (*MJ research*). Em seguida, adicionamos ao tubo de reação, 4µL de tampão de transcrição 5x (250mM de tris-HCl, 375mM de KCl e 15mM de MgCl₂, pH 8,3), 2µL de DTT 0,1M e 1µL de inibidor de RNase (40U/µL) (*RNAse OUT™, Invitrogen*). As amostras foram então colocadas em termociclador a 42°C por 5 min. Por último adicionamos 1µL da enzima transcriptase reversa (200U/µL), e a reação foi colocada novamente no termociclador a 42°C por 50 minutos seguidos de 70°C por 15 min. Os produtos de reação foram armazenados a -20°C.

5.3.4. Desenhos dos iniciadores (*primers*) específicos para as MMPs, TIMPs e genes Candidatos a normalizadores

A obtenção das sequências genômica e do cDNA dos genes das MMPs, TIMPs, RECK e genes candidatos a normalizadores (18S (do inglês, “*Eukaryotic 18S rRNA*”), GAPDH (do inglês, “*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*”), HPRT (do inglês, “*Hypoxanthine phosphoribosyl transferase*”) e RPLP0 (do inglês, “*Ribosomal protein, large, P0*”), a serem analisados foram obtidos através da ferramenta disponível na internet (www.genome.ucsc.edu). Quando algum gene possuía mais de uma isoforma, as sequências deste eram alinhadas utilizando o software Clustalw disponível na internet (www.genome.jp/tool/clustalw) que nos permitia selecionar a sequência comum entre as isoformas alinhadas. As sequências dos *primers* específicos para cada gene foram geradas através da utilização do software Primer Express 2.0 (*Applied Biosystems, USA*), estes possuem o comprimento de 19 a 21 bases, e temperatura de hibridização entre 59-61°C, gerando produtos de PCR de 90 a 110 pares de bases. Na Tabela 2 podemos observar as sequências e características dos *primers* que foram utilizados nas reações de qRT-PCR.

Tabela 2. **Sequência dos primers dos genes alvos** (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, EMMPRIN, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 E RECK) e dos genes candidatos a normalizadores (18S, GAPDH, HPRT e RPL0) a serem utilizados na reação de qRT-PCR. O número de acesso no banco de dados (<http://www.uniprot.org/>) corresponde à sequência de RNAm humano. Tam.amp, tamanho de amplificação do produto, pb, pares de bases, Concentração (nM).

Gene	Nº acesso Uniprot	Sequências 5—3'	Tam. amp. Pb	Concentração (nM)
MMP-1	NM_002421.3	TCAGGGGAGATCATCGGGA CAAAATGAGCATCCCCTCCA	102	300
MMP-2	NM_001127891. 1 NM_004530. 4	CTGACCAAGGGTACAGCCTGTT AGGTGTAAATGGGTGCCATCAG	108	200
MMP-3	NM_002422. 3	AGACAGGCACTTTTGGCGC AAATGAAAACGAGGTCCTTGCTAG	105	300
MMP-8	NM_002424. 2	TGGAAACTCTGGACATGATGAA GAGATGCTCATTTTGATGCCG	117	300
MMP-9	NM_004994. 2	GATGGGAAGTACTGGCGATTCTC CCAGTTTGACAGAGCGCTACC	116	200
MMP-12	NM_002426.	TACGCAATCCGGAAGCTTTC ATGAGCTCCACGGGCAAAA	111	200
MMP-13	NM_002427. 3	GGAATTAAGGAGCATGGCGAC CCATAATTTGGCCCAGGAGG	115	300
EMMPRIN	NM_001728. 3 NM_198589. 2 NM_198590. 2	CTCACCTGCTCCTTGAATGACAG CACCTTGAACCTCCGTTTCTGG	114	300
TIMP-1	NM_003254. 2	GCTGTGAGGAATGCACAGTGTTT CCTTTTCAGAGCCTTGGAGGA	105	200
TIMP-2	NM_003255. 4	AGTGCAAGATCACGCGCTG TGGTGCCCGTTGATGTTCTT	103	200
TIMP-3	NM_000362. 4	CTGACAGGTCGCGTCTATGATG AGGTGATACCGATAGTTCAGCCC	113	200
TIMP-4	NM_003256. 3	CTGCCAAATCACCACTGCTA CATAGAGCTTTCGTTCCAACAGC	95	200
RECK	NM_021111. 2.	CTCTGCAGATTGAAGCCTGCA CCTGGGAAATGATGAGGGC	114	200
18S	472910	CAGCGAGGTCGTAGGGAAG CTCTATGGGCCGGAATCTTT	109	200
GAPDH	NM_001256799. 1	GGTCTCTCTGACTTCAACA AGCCAAATTCGTTGTCATACC	105	200
HPRT	NM_000194.2	TCATTATGCTGAGGATTTGAAAG GGCCTCCCATCTCCTTCATC	108	200
RPLP0	NM_Q3B7A4	GAAATCCTGAGTGATGATGTGCAG GATGACGAGCGGAAAGGAGAA	103	200

5.3.5. Reação de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

Para as reações de Real time PCR seguimos o protocolo do fabricante onde utilizamos 1,6µl de cDNA em 10µl de volume final de reação, contendo os reagentes “SYBR-Green PCR Master Mix” (*Applied Biosystems, EUA*). Foi utilizado o equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 sequence detection system” (*Applied Biosystems, EUA*). As reações foram realizadas em placas de 96 poços contendo triplicatas técnicas para cada amostra. As condições da reação foram: 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C.

A determinação da intensidade de fluorescência na reação é feita pelo cálculo do ΔR_n ($\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$), onde R_n^+ = intensidade de emissão do SYBR® Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e R_n^- = intensidade de emissão do SYBR® Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔR_n permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR® Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔR ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔR , que é uma linha de corte (*Threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de *primers*. O número do ciclo em que a ΔR cruza o *threshold* corresponde ao C_t (*cycle threshold*) da amostra. O valor de C_t é

preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (176, 177).

Calculamos inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraímos o Ct do gene alvo dos valores do Ct do gene de referência. A fórmula utilizada para a quantificação relativa (QR) é $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ amostra controle})$. Com o fim de obtermos uma quantificação relativa do gene alvo com precisão, foi necessário obtermos os valores de Ct dos genes avaliados e do controle endógeno, para isso, após a reação de *Real Time PCR*, seguimos os cálculos conforme descrito previamente (176, 177). Com esses valores plotados foi feita análise estatística “One Way Anova”, seguido por “*Mann-Whitney Rank Sum Test*” utilizando o programa *GraphPad Prims software* (versão 5.0, *GraphPad*). Os valores de P foram considerados significativos se < 0.05 .

5.3.6. Concentração de uso dos Primers

A concentração de uso de cada par de sequências de *primes* foi inicialmente padronizada. Em reações de qRT-PCR utilizamos um *pool* de cDNA de todas amostras estudadas (CCC, CDI e Controle), onde foram testadas nas seguintes concentrações: 100nM, 200nM, 300nM e 400nM para cada sequência de *primers*. A escolha da melhor concentração foi baseada nos valores de Ct de cada par de *primers* em cada concentração. A concentração de cada par de *primer* de interesse pode-se observar na Tabela 2.

5.3.7. Especificidade e Cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* utilizados

A especificidade dos *primers* desenhados pelo Primer Express 2.0 (*Applied Biosystems, USA*) foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 minuto, a 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura e as pontes de hidrogênio que mantém as duplas fitas unidas se rompem (devido ao aumento de temperatura), o SYBR – Green é liberado. A fluorescência é emitida somente quando o DNA está em dupla fita. Assim, quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que o *primer* amplificou um produto específico.

O cálculo da expressão gênica assume que a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene de referência entre 1,8 e 2,2, ou seja, 100%. Para calcularmos a eficiência de cada par de *primers*, utilizamos um *pool* de cDNA de todas as mostras estudadas e diluímos esse *pool* em diluições seriadas (1. cDNA diluído 1/10 (500ng RNA), 2. cDNA diluído 1/50 (100ng RNA), 3. cDNA diluído 1/250 (20ng RNA), 4. cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA) e 5. cDNA diluído 1/3125 (0,8ng RNA)), fator 5. Em seguida realizamos reações de qRT-PCR, com *primers* já padronizados quanto a sua concentração de uso, foi testado (Tabela 2).

Os valores de Ct das triplicatas de cada diluição foram utilizadas no cálculo da eficiência. Para o cálculo da eficiência foi utilizada a equação $E = 10^{(-1/\text{slope})}$,

onde E corresponde à eficiência e “*slope*” corresponde ao coeficiente de angulação da curva. Para cada sequência de *primers* fizemos um gráfico, onde o valor do *slope* foi utilizado para determinar a eficiência dos *primers* para cada gene de interesse. O gráfico da eficiência foi construído com base no valor logaritmo das diluições testadas ($\log$ ng RNA; eixo X), e pelos valores da média de C_t (eixo Y). Todos *primers* de interesse apresentaram eficiência de 100%. Os gráficos das eficiências, a amplificação e a curva de dissociação podem ser observados no item Anexo C.

Após verificarmos que os ensaios preencheram todos os critérios de validação para qRT-PCR (especificidade e eficiência) para cada primer de interesse, iniciamos nossos experimentos de quantificação da expressão gênica.

5.3.8. Padronização para os *primers* dos genes de referência candidatos a normalizadores

Para escolha do melhor gene de referência normalizador selecionamos os seguintes genes: 18S, GAPDH, HPRT e RPL0 e realizamos a padronização. Para isso, foram selecionadas 15 amostras de cDNA aleatoriamente, sendo 5 amostras CCC, 5 amostras CDI e 5 amostras controle, onde foram feitos os experimentos de concentração de uso de cada par de sequências de *primers*, especificidade e eficiência, conforme descrito acima. Em seguida realizamos quantificação da expressão gênica nas mesmas amostras selecionadas em triplicata e calculamos a média dos C_t e o desvio padrão de cada gene candidato. A expressão gênica do gene RPL0 apresentou um menor desvio padrão ($19 \pm 1,23$) e expressão

homogênea para as amostras. Os gráficos das eficiências, a amplificação, curva de dissociação e o gráfico da média do Ct e desvio padrão dos genes de referências candidatos a normalizadores podem ser observadas no item Anexos D. As amostras foram alíquotadas e acondicionadas a -80°C até o momento do uso. Portanto, para normalização da expressão gênica dos genes de interesse utilizamos o gene de referência normalizador RPL0.

5.4. Análise da expressão gênica dos microRNAs por Real Time (qRT -PCR)

5.4.1. Extração do RNA para microRNAs

As amostras com aproximadamente 100mg da parede lateral esquerdo de coração de 17 pacientes com CCC, 12 pacientes com CDI e 6 amostras controle, foram imersas em 0,5mL de Tampão de Lise do kit de extração *mirVana™ miRNA Isolation Kit* (Ambion, Austin). A homogeneização dos tecidos foi feita utilizando tubos com esferas de cerâmica e o equipamento *Precellys* (Bertin Technologies) a 6.000 rpm, 3 ciclos de 15 segundos e pausa de 20 segundos cada. O RNA total foi obtido utilizando-se o kit *mirVana™ microRNA Isolation Kit* (Ambion, Austin TX, EUA), que se baseia na extração orgânica com solução de fenol:clorofórmio. A fase aquosa de cada alíquota foi recuperada, misturada a etanol 100% e o RNA total foi imobilizado em coluna de fibra de vidro; após três lavagens com tampões específicos fornecidos com o kit, o RNA foi eluído em 100µL de água livre de nucleases a 95°C (*Nuclease-free Water*, Ambion, Austin, TX, EUA). Conforme descrito acima a quantificação de RNA foi feita em espectrofotômetro (*Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*; NanoDrop Technologies,

Delaware, EUA), com base na relação da absorbância A260nm:A280nm e da leitura a A230nm. O grau de pureza relativo à presença de contaminantes proteicos foi obtido pelo cálculo do quociente A260nm:A280nm, onde uma razão compreendida entre 1,8 e 2,0 é o indicador de qualidade. Garantir a pureza das amostras antes de realizar um experimento de qRT-PCR para detecção microRNAs é primordial, visto que pouco se sabe acerca dos fatores que controlam a degradação destas moléculas (178). Os valores individuais de cada amostra e a concentração em ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), podem ser observados no item Anexo E.

5.4.2. Transcrição Reversa específica para o microRNAs

Para a reação de transcrição reversa, foram utilizados *primers* com sequências de bases complementares às dos microRNAs a serem estudados (*TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* e *Megaplex™ RT Primers*, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 3). Num volume final 15 μL , a reação foi feita com 500ng de RNA total, *Megaplex™ RT Primers*, dNTPs, a enzima transcriptase reversa *MultiScribe™*, tampão do kit, MgCl_2 , inibidor de RNases e água livre de nucleases. O tubo contendo a reação foi incubado no gelo por 5 minutos e, em seguida, colocado no termociclador (*Veriti® 96-Well Thermal Cycler*, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), com potência a 60%, sob as seguintes condições de corrida: 40 Ciclos (16°C por 2 min., 42°C por 1 min., 50°C por 1 seg.), seguidos de 85°C por 5 min. Após a reação, o cDNA foi mantido a -20°C até o uso.

Tabela 3. **Sequência dos miRNAs maduros humanos (hsa) estudados e dos RNAs nucleares (RNUs) utilizados como genes de endógenos na normalização da reação de *Real Time PCR*.** O número de acesso no banco de dados (miRbase.com, org) corresponde à sequência madura dos microRNA.

microRNA	mirBase ID	Sequência do microRNA maduro
hsa-miR-21	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-29a-5p	MIMAT0004503	ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG
hsa-miR-146a	MIMAT0000449	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
hsa-miR-155	MIMAT0000646	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
hsa-miR-188	MIMAT0000457	CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGG
hsa-miR- 214-5p	MIMAT0004564	UGCCUGUCUACACUUGCUGUGC
hsa-miR- 491-5p	MIMAT0002807	AGUGGGGAACCCUCCAUGAGG
hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	UCCAUAACACUACCCUGCCUCU
RNA nuclear	NCB Acc#	Sequência do RNA nuclear
RNU44	NR_002750	CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGACTGAACATGAAGG TCTTAATTAGCTCTAACTGACT

5.4.3. Real time PCR (qRT-PCR) para microRNAs

A reação de *Real Time PCR* foi feita utilizando sondas de hidrólise *TaqMan*® com especificidade para o cDNA feito para os microRNAs a serem estudados. As sondas *TaqMan*® que foram utilizadas apresentam na terminação 5' o fluoróforo 6-carboxifluoresceína FAM™, e na terminação 3' um *nonfluorescent quencher* (NFQ). A terminação 3' da sequência da sonda apresenta ainda uma modificação *Minor Groove Binder* (MGB). A sequência e a concentração da sonda são propriedade industrial do fabricante. A reação de qRT-PCR foi feita segundo o protocolo do fabricante *TaqMan*® *MicroRNA Assays* (*Applied Biosystems, Foster City*) e *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix, No AmpErase*® *UNG* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*), este último contendo a enzima *AmpliTaq Gold*® *DNA polymerase*, os desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), tampão de enzima otimizado, MgCl₂, e a referência passiva de fluorescência ROX®, sem *AmpErase*® *UNG*. Um volume exato de 1,33µL de cDNA foi analisado em 20µL de volume final de reação. A reação de qRT-PCR foi feita no equipamento *ABI PRISM*® *7500 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*), com o termociclador programado para 1º ciclo de 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos cada um dos quais com 15 segundos a 95°C seguidos de um minuto a 60°C.

5.4.4. Quantificação da expressão relativa dos microRNAs analisados

A quantificação da expressão relativa dos microRNA avaliados foi realizada como já descrito para a expressão gênica das MMPs, TIMPs e RECK o cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (176, 177). Com esses valores plotados foi feito o cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) utilizando o programa *GraphPad InStat software* (versão 5.0, *GraphPad*). Os valores de P foram considerados significativos se < 0.05 .

5.5. Análise da expressão proteica das MMPs e TIMPs por “*Western Blotting*”

5.5.1. Extração Proteica

Os extratos proteicos das amostras com aproximadamente 100mg da parede lateral esquerdo de coração de 5 pacientes com CCC, 5 pacientes com CDI e 5 amostras controle, foram obtidos através de homogeneização feita com a solução de lise RIPA, contendo 100mM Tris-HCL pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 150mM de NaCl, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) acrescido de inibidores de proteases, 1% de aprotinina e 1mM de PMSF (do inglês, “phenylmethy sufonyl fluoride”). Em tubos com esferas de cerâmica e o equipamento *Precellys* (*Bertin Technologies*) a 6.000rpm, 3 ciclos de 15 segundos e pausa de 20 segundos cada. Em seguida, o homogenato foi sonificado (*60 Sonic Dismembrator*, *Fischer Scientific*) por 3 ciclos de 10 segundos cada a 10 Watts e centrifugado a 12.000xg por 30 min a 4°C para remoção de partículas insolúveis (debris celulares), e o sobrenadante coletado, para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (*Biorad*). As amostras foram preparadas de modo que

estivessem livres de contaminantes como sais. Este extrato proteico foi utilizado para análise de expressão proteica pelo método de *western blotting* e para análise da atividade proteolítica pelo método de zimografia. Os homogenatos proteicos foram armazenados a -80°C.

5.5.2. “*Western Blotting*” para MMPs e TIMPs

Os extratos das amostras do miocárdio de 5 pacientes com CCC, 5 pacientes com CDI e 5 controles, contendo 70µg de proteínas foram aquecidos por 5 minutos a 95°C na presença do SDS (sulfato dodecil de sódio) e do reagente thiol (2 mercaptoetanol), que desnatura as proteínas e quebra as pontes dissulfetos. As proteínas reagem com SDS para formar complexos SDS – micelas carregadas negativamente e foram submetidas à eletroforese unidimensional (SDS – PAGE), utilizando gel de poliacrilamida 12,5%. Para este procedimento foi utilizado o sistema de eletroforese vertical SE600 Ruby (*Armstrong Biosciences/GE healthcare*). A voltagem aplicada foi de 70 volts/gel até a entrada da amostra do gel *Resolution*, e de 140 volts/gel até o fim da corrida. Após, a eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema TE – Semi-Dry transfer Unit (*Armstrong Biosciences/GE healthcare*). Após, a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com ponceau para confirmar a transferências das proteínas e lavadas com água miliQ e bloqueada por 2 horas com solução tampão, contendo TBS 1%, Tween 0,1% e 5% de leite em pó. Para verificar a expressão proteica foram utilizados os anticorpos: anti-MMP-1 (1:500), anti-MMP2

(1:1000), anti-MMP-3 (1:500), anti-MMP-8 (1:500), anti-MMP9 (1:1000), anti-MMP-12 (1:1000), anti-MMP13 (1:1000), anti-TIMP1(1:1000), anti-TIMP-2(1:1000), anti-RECK (1:1000), (*Abcam*), TIMP-3 (1:500), TIMP-4 (1:500) e EMMPRIN (1:500), (*Santa Cruz, Biotechnology*) e anti-beta-actina (1:1000), (*R&D System*). Em seguida, cada membrana foi submetida à incubação com o anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase (HRP). As membranas bloqueadas com os anticorpos: anti-MMP2, anti-MMP-3, anti-MMP-8, anti-MMP9 e anti-MMP13, foram reveladas por quimioluminescência, utilizando o *kit ECL Western Blotting Detection Reagents (Armesham Biosciences/GE healthcare)*. Membranas bloqueadas com anticorpos: MMP-12, TIMP-3, TIMP-4 e EMMPRIN, foram incubadas com anticorpos secundários fluorescentes em espectro infravermelho e detectando-se o sinal pelo Odyssey (LiCor). A análise da densitometria foi realizada utilizando o programa ImageQuant TL (*Armesham Biosciences/GE healthcare*).

5.5.3. Coloração e aquisição de imagens dos géis unidimensionais (1D)

Após o término da transferência das proteínas os géis foram fixados em solução 40% de metanol e 10% de ácido acético. Em seguida, os géis foram corados com solução “*Coomassie Blue Colloidal*”, contendo 8% de sulfato de amônio, 0,8% de ácido fosfórico 0,08% de “*Coomassie Blue G250*” e 20% de metanol, por aproximadamente cinco dias. Em seguida os géis foram descorados em água até a obtenção de bandas visíveis e mantidos em solução contendo 15% de etanol. Após a etapa de coloração, os géis foram escaneados pelo

equipamento “Image Scanner” (*Armstrong Biosciences/GE healthcare*), utilizando o filtro verde e modo transparente e 300dpi de resolução (Anexo F).

5.6. Análise da atividade proteolítica das MMP-2 e MMP-9 por Zimografia

A zimografia é um método usado para analisar a atividade proteolítica das MMPs em amostras biológicas. Essa técnica envolve a separação de proteínas por eletroforese, sob condição de denaturação pelo SDS, mas não de redução (sem 2 mercaptoetanol), através de um gel de poliacrilamida contendo gelatina (substrato). Os extratos das amostras do miocárdio de 5 com pacientes CCC, 5 pacientes com CDI e 5 amostras controles, contendo 70µg de proteínas com 5µl de tampão de amostra (2% SDS, 60mM Tris pH 6.8, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol). As proteínas foram submetidas à eletroforese 1D (SDS – PAGE), utilizando gel de poliacrilamida 10%, contendo 0,2 % de gelatina tipo A “*porcine skin*” (Sigma). Para este procedimento foi utilizado o sistema de eletroforese vertical SE260 Ruby (*Armstrong Biosciences/GE healthcare*). A voltagem aplicada foi de 15mA/gel até a entrada da amostra aplicada no gel de resolução. Em seguida, aplicamos 30mA/gel até o término da corrida, durante toda corrida o sistema de eletroforese foi mantido no gelo, para que as proteínas não perdessem sua atividade proteolítica. Em seguida, transferimos o gel para um recipiente contendo 2,5% de Triton X-100 diluído em água miliQ, para remoção do SDS e renaturação das proteínas, procedemos com duas lavagens de 15 minutos cada. Após, as lavagens incubamos o gel em solução tampão reveladora (50mM de Tris pH 8.8, 5mM CaCl₂, 0,02% NaN₃) por 20 horas a 37°C. Após a incubação

em solução tampão reveladora, fixamos o gel em solução descorante (40% metanol, 10% de ácido acético, 40% de água) por 15 minutos sob agitação e temperatura ambiente. Descartamos a solução descorante e coramos o gel com “*Coomassie Brilliant Blue R-250*” (Armestham Biosciences/GE healthcare) por cinco dias. Em seguida os géis foram descorados em água até a obtenção de bandas visíveis. Os géis foram mantidos em solução contendo 15% de etanol. O mesmo método de aquisição de imagens de gel 1D foi utilizado neste método. A análise da densitometria foi realizada utilizando o programa ImageQuant TL (Armestham Biosciences/GE healthcare).

Como controle da atividade das MMPs, adicionamos ao tampão de revelação dos zimogramas 5mM de EDTA (quelante de cálcio) e 10mM de 1, 10 fenantrolina (um quelante de metais pesados). Esses quelantes inibem a ação das MMPs e, conseqüentemente, a formação das bandas gelatinolíticas claras, observadas nos zimogramas. Aplicamos nas canaletas do gel os *pools* de cada grupo (Controle, CCC e CDI), todos contendo 70µg de proteína e submetemos a eletroforese, como descrito acima. Em seguida o gel foi dividido em três partes e transferimos cada gel para seu devido recipiente, contendo as seguintes soluções tampão:

- A. solução tampão reveladora (50mM de Tris pH 8.8, 5mM CaCl₂, 0,02% NaN₃).
- B. solução tampão reveladora (50mM de Tris pH 8.8, 5mM CaCl₂, 0,02% NaN₃,) e 100mM de EDTA que é quelante de cálcio.
- C. Solução tampão reveladora (50mM de Tris pH 8.8, 5mM CaCl₂, 0,02% NaN₃) 20mM de 1,10 fenantrolina, que é um quelante de metais pesados.

Nos três tratamentos descritos acima, observamos a presença de bandas gelatinolíticas claras apenas no gel A, enquanto que os géis B e C não as apresentam. Como já mencionado, que as MMPs necessitam de cálcio e zinco para sua estabilidade e atividade enzimática, respectivamente. Com isso podemos concluir que as bandas do gel A são resultado da atividade enzimática das MMPs (Anexo G). Com a etapa do controle da atividade das MMPs realizada, iniciamos nossos experimentos de atividade proteolítica.

5.7. Análise Morfométrica Quantitativa

Para análise morfométrica quantitativa, fragmentos do miocárdio (parede lateral do ventrículo esquerdo) de 5 amostras de pacientes com CCC, 5 pacientes com CDI e 5 amostras controle, foram fixados em solução tamponada (pH=7,2) contendo 10% de formalina e posteriormente processados pelo método de inclusão em parafina. Os fragmentos foram cortados transversalmente em secções de 5µm e foram corados por Picrosirius red, coloração específico para colágenos. Para quantificação da fração do volume de colágeno intersticial, cada corte de cada amostra estudada foi analisada pelo programa “QWIN Plus Image Processing and Analysis Software” (Leica Microsystems Cambrigde Ltda.), aclopado à microscopia ótica. A quantificação da fração da área de colágeno intersticial foi determinada calculando-se a percentagem de área de colágeno sobre a área total de miocárdio, analisando-se aleatoriamente 15 campos de cada corte de cada amostra utilizando-se a objetiva 10x, aplicando-se a fórmula baixo e conforme demonstrado na Figura 5.

$$\text{FVCI (\%)} = \frac{\text{Área de colágeno}}{\text{Área total do miocárdio}} \times 100$$

Figura 5. **Quantificação da fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo do miocárdio.** **A.** lâmina total, **B.** quantificação da área de colágeno (azul) e **C.** quantificação da área total do ventrículo esquerdo do miocárdio (azul).

5.8. Análise Estatística

Análise feita para escolha dos genes de referência candidatos a normalizadores, foram feitas com base na média dos Ct e desvio padrão de cada gene.

A expressão gênica das MMPs, TIMPs e RECK, bem como de microRNA, foram calculadas pelo “Método do Ciclo do Limiar de Fluorescência” (*Threshold Cycle Method*), através da quantificação relativa, representada por $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ amostra controle})$, onde calculamos inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraímos o Ct do gene alvo dos valores do Ct do gene de referência (176, 177). As análises estatísticas utilizadas foram “One Way Anova”, seguido por teste não paramétrico “*Mann-Whitney Rank Sum Test*”, os valores de P foram considerados significativos se < 0.05 .

A expressão proteica das MMPs, TIMPs e RECK, foram normalizadas pelo gene de referência normalizador, em seguida foram feitas as análises estatísticas “One Way Anova”, seguido por teste não paramétrico “*Mann-Whitney Rank Sum Test*”, os valores de P foram considerados significativos se < 0.05 . A atividade proteolítica das MMPs, foram feitas pelas análises estatísticas “One Way Anova”, seguido por “*Mann-Whitney Rank Sum Test*”, sendo $p < 0.05$.

A quantificação morfométrica do colágeno, foi baseada na percentagem da área de colágeno sobre a área total de miocárdio e as análises estatísticas realizadas foram “One Way Anova”, seguido por teste não paramétrico “*Mann-Whitney Rank Sum Test*”, sendo $p < 0.05$.

As análises de correlações foram feitas entre os valores da expressão gênica, proteica e atividade das MMPs, TIMPs e microRNAs e dados clínicos, utilizando-se o teste de *Spearman*, sendo $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa “GraphPad Prism versão 5.0” (*GraphPad InStat software*).

5.9. Análises Bioinformáticas

Foi utilizado o *software Ingenuity Pathway Analysis v8.0-2602 (IPA, Ingenuity® Systems, Redwood City, CA, EUA - www.ingenuity.com)*, para análises *in silico* dos microRNAs relacionados com as MMPs e TIMPs.

Foi realizada uma análise de predição das MMPs, TIMPs e RECK associados aos microRNAs, sendo selecionados apenas aqueles experimentalmente observados e/ou fortemente preditos nas seguintes bases de

dados: *TarBase*, *TargetScan*, *Ingenuity Expert Findings* e *miRecord*. A partir da lista gerada com estes genes, foi feita uma *core analysis* considerando relações diretas e indiretas, experimentalmente observadas e/ou fortemente preditas em humanos, ratos ou camundongos.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização das amostras de miocárdio humano

Neste estudo, foram utilizadas amostras da parede lateral do ventrículo esquerdo do miocárdio de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI), submetidos ao transplante e de corações de indivíduos com morte encefálica, sem cardiomiopatia (Controle), que doaram seus órgãos e que por motivos técnicos o coração não pôde ser utilizado para o transplante. Os dados dos pacientes foram obtidos a partir da ficha eletrônica disponível no sistema de prontuários do InCor, o Si3.

As características clínicas das amostras estão descritas na tabela 4. Ambos os grupos de pacientes apresentavam alteração na função diastólica e sistólica. A disfunção diastólica do ventrículo esquerdo é considerada como uma alteração precoce, que precede a disfunção sistólica em CCC (179-181). Essas alterações na função diastólica e sistólica estão associadas com o aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE), do átrio esquerdo, índice de massa do miocárdio e da espessura da parede, bem como a diminuição da fração de ejeção (FE) e do encurtamento da FE (181).

As disfunções ventriculares diastólicas e sistólicas levam ao aumento da pressão atrial na tentativa de manter um enchimento ventricular adequado, este aumento da pressão no átrio esquerdo ocasiona a dilatação e conseqüentemente o aumento do volume do átrio esquerdo (181, 182). O átrio esquerdo dos pacientes com CCC e CDI apresentavam aumentados. Em conjunto essas alterações na função ventricular do miocárdio ocasionam a diminuição da fração

de ejeção (FE), indicando os níveis de disfunção cardíaca (capacidade do coração bombear o sangue) e distúrbios de condução elétrica. A fração de ejeção é classificada como grave quando é $\leq 40\%$, ou seja, quanto menor a fração de ejeção maior o comprometimento cardíaco. Ambos os grupos de pacientes apresentaram uma diminuição no encurtamento da FE (valores normais 25-43%), indicando disfunção cardíaca. O septo ventricular, a parede posterior do ventrículo esquerdo e o seio aórtico em pacientes com CCC e pacientes com CDI, apresentavam-se preservadas.

Tabela 4. Dados clínicos dos pacientes cujas amostras de miocárdio foram utilizadas no estudo.

	Grupo CCC (n=17)	Grupo CDI (n=12)	Grupo Controle (n=6)
Idade	47,8 ±14,2	40,6±17,1	28,3 ± 11,0
Sexo, n (%)	M 6 (35%)	M 9 (75%)	M 6 (100%)
SC (m²)	1,6 ± 0,3	1,7±0,1	-
Ecocardiograma			
Fração de Ejeção - FE (%)	23,59 ± 8,5	21,6±7,9	-
Encurtamento da FE (%)	11,94 ± 7,3	12,2±3,7	-
DDVE (mm)	62,12 ± 98	70,6 ±19,8	-
DSVE (mm)	48,82 ± 15,6	62,7±20,1	-
Septo Ventricular (mm)	8,53± 1,7	8,3±1,4	-
Parede Post. VE (mm)	8,5± 1,8	8,6±1,4	-
Átrio Esquerdo (mm)	49,18 ± 5,5	52,1±7,4	-
Seio Aórtico (mm)	29,53 ± 3,1	31,8± 5,3	-
Índice de massa miocárdio (g/m²)	187,88± 69,3	233,8±76,6	-
Espessura Relativa da Parede	0,68± 0,5	0,60± 0,1	-
Volume diastólico (ml)	288,41± 136,6	349,9± 131,8	-
Volume sistólico (ml)	194,06± 131,8	267,5± 127,4	-

A tabela mostra os dados clínicos dos pacientes, cujas amostras de ventrículo esquerdo foram utilizadas no estudo. Etiol: etiologia, FE: fração de ejeção (em porcentagem), DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (em cm), Sup. Corpórea: superfície corpórea (em cm²), Átrio esquerdo (em mm), Septo VE: Septo do ventrículo esquerdo (em mm), Parede Post. VE: Parede. Sexo: M: masculino. Valores normais: FE (%): >55%; Encurtamento da FE (%): 25-43; DDVE (mm): 42-59mm; DSVE (mm): 25-39mm; Septo Ventricular: 6-10mm; Parede Post. VE (mm): 6-10mm; Átrio Esquerdo (mm): 30-40mm; Seio Aórtico (mm): 31-47mm; Índice de massa miocárdio (g/m²): 49-115 (g/m²); Espessura Relativa da Parede: <0,42.

A tabela 5 cita se o paciente estava na lista de prioridade para o transplante cardíaco. Os pacientes em lista de prioridade em geral possuem um pior prognóstico e estão fazendo uso de drogas vasoativas, como catecolaminas, e podem também dependendo de seu estado clínico, estar sob uso de assistência circulatória mecânica (balão intra-aórtico).

Tabela 5. Dados de priorização e histopatológicos os pacientes, cujas amostras de miocárdio foram utilizadas no estudo.

Etiol	Pacientes	Priorização	Hipertrofia	Fibrose	Miocardite
Cardiomiopatia Chagásica Crônica	CCC-01	N	S	2+	2/3+
	CCC-02	N	S	3+	3+
	CCC-03	S (Catec.)	S	2+	2/3+
	CCC-04	S (Catec.)	S	1+	1+
	CCC-05	S (Catec.)	S	1+	0/1+
	CCC-06	S (Catec.)	S	1+	1+
	CCC-07	S (Catec.)	S	2+	3+
	CCC-08	S (Catec.)	S	2+	2/3+
	CCC-09	S (Catec.)	S	2+	2+
	CCC-10	N	S	2+	2+
	CCC-11	N	S	1+	2/3+
	CCC-12	N	S	2+	3+
	CCC-13	N	S	1/2+	0
	CCC-14	S (Catec.)	S	2/3+	3+
	CCC-15	S (Mecan.)	S	2/3+	3+
	CCC-16	N	S	1+	2+
	CCC-17	S (Catec.)	S	2+	3+
Cardiomiopatia Dilatada Idiopática	CDI-01	S (Catec.)	S	0/1+	0
	CDI-02	S (Catec.)	S	1/2+	0
	CDI-03	S (Catec.)	S	3+	0
	CDI-04	S (Catec.)	S	2+	0
	CDI-05	S (Catec.)	S	2+	0
	CDI-06	S (Catec.)	S	0/1+	0
	CDI-07	S (Catec.)	S	0/1+	1+
	CDI-08	N	S	2+	0
	CDI-09	N	S	1+	0
	CDI-10	S (Catec.)	S	3+	0
	CDI-11	S (Catec.)	S	2+	1+
	CDI-12	S (Catec.)	S	1+	0
Controle	01	-	-	-	-
	02	-	-	-	-
	03	-	-	-	-
	04	-	-	-	-
	05	-	-	-	-
	06	--	-	-	-

A tabela mostra os dados de priorização dos pacientes, cujas amostras do ventrículo esquerdo foram utilizadas no estudo. Priorização: S (sim – paciente em lista de prioridade para o transplante), N (não- paciente sem prioridade para o transplante), Catec.: Paciente em prioridade por fazer uso de drogas vasoativas/catecolaminas, Mecan.: Paciente em prioridade por, além de fazer uso de drogas vasoativas, também fazer uso de assistência circulatória mecânica / balão intra-aórtico, Arritmia: Paciente em priorização por apresentar quadros de arritmia, Hipert.: Presença (S-sim) ou ausência (N-não) de hipertrofia, Miocardite e Fibrose: Valores referentes a presença: 0: ausente, 1+: discreto, 2+: moderado, 3+: intenso. Hipertrofia, miocardite e fibrose determinados por estudos histopatológicos.

6.1.1. Análise histopatológica das amostras de miocárdio

As amostras de ventrículo esquerdo foram enviadas para o Serviço de Patologia do Instituto do Coração para estudos histopatológicos. Os cortes transversais, corados com hematoxilina e eosina (HE) e com Picrosirius red, mostraram que amostras de pacientes com CCC apresentavam intenso infiltrado inflamatório (miocardite), fibrose e hipertrofia em graus variáveis como também pode ser observado na tabela 5. A maioria das amostras de pacientes com CDI apresentaram hipertrofia de cardiomiócitos e fibrose. A figura a seguir (figura 6) mostra alguns exemplos dos cortes corados com HE (coluna esquerda) e com Picrosirius red (coluna direita) utilizados para o laudo histopatológico.

Figura 6. **Análise histopatológica do tecido cardíaco de pacientes com CCC, CDI e controle.** Cortes transversais representativos do tecido cardíaco (parede lateral do ventrículo esquerdo) submetidos à coloração por HE (coluna esquerda) e Picrosirius red (coluna direita), aumento de 20X.

6.2. Análise da expressão gênica, proteica e atividade proteolíticas das MMPs e TIMPs

A seção dos resultados das MMPs está subdividida de acordo com sua classificação, gelatinases, estromelisina, colagenases, metaloeslastase, EMMPRIN e seus inibidores TIMPs e RECK.

6.2.1. Expressão gênica e proteica das gelatinases MMP-2 e MMP-9

A Figura 7 mostra os níveis de expressão de RNAm e proteica da MMP-2 e -9 no miocárdio de pacientes com CCC, pacientes com CDI e controle. Pode-se observar que a expressão de RNAm da MMP-2 está significativamente aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI quando comparamos com amostras controle ($p=0,0001$ e $p=0,0001$, respectivamente) (Figura 7A). Observamos também que a expressão proteica da MMP-2 está significativamente aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI quando comparamos com amostras controle ($p=0,007$ e $p=0,007$, respectivamente; Figura 7B).

A expressão de RNAm da MMP-9 está significativamente aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI quando comparamos com amostras controle ($p=0,002$ e $p=0,0002$, respectivamente; Figura 7C). Observamos também que a expressão proteica da MMP-9 está significativamente aumentada em amostras de pacientes com CCC quando comparamos com amostras controle ($p=0,01$; Figura 7D).

Figura 7. **Expressão relativa do RNAm e Expressão Proteica da MMP-2 e -9.** **(A)** Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa RNAm da MMP-2 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=17), pacientes com CDI (n=12) e controle (n=6). **(B)** Valores de expressão proteica da MMP-2 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5). **(C)** Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa RNAm da MMP-9 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=17), pacientes com CDI (n=12) e controle (n=6). **(D)** Valores de expressão proteica da MMP-9 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5). Os valores da expressão proteica calculados foram normalizados pela proteína β -actina. O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

6.2.2 . Atividade Proteolítica das gelatinases MMP-2 e MMP-9

Após analisarmos a expressão gênica e proteica da MMP-2 e MMP-9, nós avaliamos a atividade destas proteínas em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, pacientes com CDI e controle. Os resultados mostram que a atividade da MMP-2 está significativamente aumentada em amostras de pacientes com CCC ($p=0,007$) quando comparamos com amostras controle e quando comparamos com amostras de pacientes com CDI ($p=0,03$; Figura 8 A).

A MMP-9 está com a atividade significativamente aumentada em amostras de pacientes com CCC quando comparamos com amostras controle ($p=0,02$) e quando comparamos com amostras de pacientes com CDI ($p=0,03$; Figura 8 B).

Em conjunto, os resultados sugerem que embora haja produção tanto de RNAm e proteica da MMP-2 e MMP-9 em amostras de pacientes com CCC e CDI, estas estão mais ativas em amostras de pacientes com CCC.

Figura 8. **Atividade Proteolítica da MMP-2 e MMP-9.** (A) Atividade Proteolítica da MMP-2 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5). (B) Atividade Proteolítica da MMP-9 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5). O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

6.2.3. Análise da expressão gênica e proteica da estromelisina MMP-3

Nós avaliamos a expressão gênica e proteica da MMP-3 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, pacientes com CDI e controle. A expressão do RNAm da MMP-3 não foi detectada em nossas amostras. Em relação à expressão proteica da MMP-3, não observamos diferença significativa entre as amostras do grupo estudado (CCC, CDI e controle) (Figura 9A).

Figura 9. **Expressão Proteica MMP-3.** (A) Expressão Proteica MMP-3 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5). Os valores calculados foram normalizados pela proteína β-actina. O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

6.2.4. Análise da expressão gênica e proteica das collagenases MMP-1, MMP-8, MMP-13 e metaloestrolase MMP-12

Em nossa análise de expressão gênica não detectamos o RNAm da MMP-8 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI. A Figura 10A mostra que não houve diferença significativa da expressão proteica da MMP-8 no miocárdio de pacientes com CCC e CDI. A expressão do RNAm da MMP-13 está significativamente aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI quando comparamos com amostras controle ($p=0,0002$ e $p=0,0001$, respectivamente) (Figura 10B). Observamos que não houve diferença significativa da expressão proteica da MMP-13 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI (Figura 10C). Não observamos expressão do RNAm e proteica da MMP-1.

A expressão do RNAm da MMP-12 está significativamente aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI quando comparamos com amostras controle ($p=0,0001$ e $p=0,04$, respectivamente; Figura 11A). Em relação à expressão proteica não observamos diferença significativa em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI (Figura 11B).

Figura10. Expressão Proteica da MMP-8 e MMP-13 Expressão relativa do RNAm MMP-13. (A) Valores de expressão proteica da MMP-8 em amostras de miocárdio de ventrículo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5). (B) Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa RNAm da MMP-13 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=17), pacientes com CDI (n=12) e controle (n=6). (C) Valores de expressão proteica da MMP-13 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5). Os valores da expressão proteica calculados foram normalizados pela proteína β-actina. O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

Figura 11. **Expressão relativa do RNAm e expressão Proteica da MMP-12.** **(A)** Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa RNAm da MMP-12 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=17), pacientes com CDI (n=12) e controle (n=6). **(B)** Valores de expressão proteica da MMP-12 em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5). Os valores calculados foram normalizados pela proteína β -actina. O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

6.2.5. Análise da expressão gênica e proteica de EMMPRIN (CD147)

Para avaliar um indutor de produção das MMPs, avaliamos a expressão gênica e proteica do EMMPRIN (CD147).

Nossos resultados mostram que a expressão do RNAm do EMMPRIN em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI é significativamente aumentada quando comparada com amostras controle ($p=0,0006$ e $p=0,0001$, respectivamente; Figura 12A). Não observamos diferença significativa da expressão proteica do EMMPRIN em amostras de miocárdio dos grupos estudados (Figura 12B).

Figura 12. **Expressão relativa do RNAm e expressão Proteica do EMMPRIN (CD147).** (A) Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa RNAm do EMMPRIN em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=17), pacientes com CDI (n=12) e controle (n=6). (B) Valores de expressão proteica do EMMPRIN em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5). Os valores calculados foram normalizados pela proteína β-actina. O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

6.2.6. Análise da expressão gênica e proteica dos inibidores TIMP-1, -2, -3 e -4 e RECK

Com o objetivo de avaliar inibidores específicos das MMPs, avaliamos a expressão gênica e proteica dos TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e o TIMP-4 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, pacientes com CDI e controle. Os resultados mostram que a expressão do RNAm do TIMP-1 está aumentada significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI quando comparamos com amostras controle ($p=0,01$ e $p=0,02$, respectivamente; Figura 13A). Não observamos diferença significativa da expressão proteica em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI (Figura 13B).

Observamos também que a expressão do RNAm do TIMP-2 está aumentada significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC ($p=0,0001$) e pacientes com CDI ($p=0,0001$) quando comparamos com amostras controle (Figura 13 C). A expressão proteica do TIMP-2 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI está significativamente aumentada quando comparamos com amostras controle ($p=0,008$ e $p=0,008$, respectivamente; Figura 13D).

A expressão do RNAm do TIMP-3 está aumentada significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC ($p=0,0004$) e pacientes com CDI ($p=0,0001$) quando comparamos com amostras controle (Figura 13 E). Não observamos diferença significativa da expressão proteica em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI (Figura 13F). A expressão do RNAm do TIMP-4 está aumentada em amostras de pacientes com CCC e CDI quando

comparamos amostras controle ($p= 0,03$ e $p= 0,0008$, respectivamente; Figura 13G). Não observamos diferença significativa da expressão proteica do TIMP-4 em amostra de miocárdio dos grupos estudados (Figura 13H).

Figura 13. **Expressão relativa do RNAm e expressão Proteica dos inibidores TIMPs.** Para os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa do RNAm do TIMP-1, -2, -3 e -4 utilizamos amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=17), pacientes com CDI (n=12) e controle (n=6) e para expressão proteica utilizamos amostras de miocárdio de ventrículo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5). **(A)** Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa RNAm do TIMP-1. **(B)** Valores de expressão proteica do TIMP-1. **(C)** Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa RNAm do TIMP-2. **(D)** Valores de expressão proteica do TIMP-2. **(E)** Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa RNAm do TIMP-3. **(F)** Valores de expressão proteica do TIMP-3. **(G)** Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa RNAm do TIMP-4. **(H)** Valores de expressão proteica do TIMP-4. Os valores da expressão proteica calculados foram normalizados pela proteína β -actina. O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

Para avaliar o único inibidor da MMP-2 e MMP-9 ancorado à membrana celular, avaliamos a expressão gênica e proteica da proteína RECK. Observamos um aumento significativo na expressão do RNAm da RECK em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI quando comparamos com amostra controle ($p=0,0001$ e $p=0,0001$, respectivamente; Figura 14A). A expressão proteica da RECK também está aumentada significativamente em amostras de pacientes com CCC ($p=0,007$) e CDI ($p=0,008$) quando comparamos com amostras controle (Figura 14B).

Figura14. Expressão relativa do RNAm e expressão Proteica da RECK. (A) Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expressão relativa RNAm da RECK em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC ($n=17$), pacientes com CDI ($n=12$) e controle ($n=6$). **(B)** Valores de expressão proteica da RECK em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC ($n=5$) e pacientes com CDI ($n=5$) e controle ($n=5$) os valores calculados foram normalizados pela proteína β -actina. O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

6.3. Análise da Razão entre atividade da MMP-2, MMP-9 e TIMPs

Observando as diferenças na atividade da MMP-2 e MMP-9 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC em relação a amostras de pacientes com CDI e controle, questionamos se estas proteínas estariam em desequilíbrio com seus inibidores TIMPs e RECK. Para tal, calculamos a razão entre a atividade da MMP-2 e MMP-9 e os níveis proteicos dos TIMP-1, -2, -3, -4 e RECK. Na figura 14 estão representadas as razões da MMP-2 e TIMPs e RECK. Pode-se observar que a razão entre MMP-2/TIMP-1 está aumentada significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparamos com amostras de pacientes com CDI e amostras controle ($p=0.008$ e $p=0.008$, respectivamente; Figura 15A). A razão entre MMP-2/TIMP-2 em amostras de miocárdio de pacientes está aumentada significativamente ($p=0,03$) quando comparamos amostras controle (Figura 15B). Observamos também a razão entre a MMP-2/TIMP-3 está aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparamos com amostras de pacientes com CDI e controle ($p=0,008$ e $p=0,008$, respectivamente; Figura 15C). A razão entre MMP-2/TIMP-4 está aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparada com amostras controle ($p=0,008$; Figura 15D). Não observamos diferença entre a razão MMP-2/RECK (Figura 15E).

As razões entre MMP-9/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 estão aumentadas significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparamos com amostras de miocárdio de pacientes com CDI ($p=0,01$ e $p=0,01$,

respectivamente; Figura 16A e B). Observamos também que a razão entre MMP9/TIMP-3 está aumentada significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparamos com amostras de miocárdio de pacientes com CDI ($p=0,007$; Figura 16C). Não observamos diferença entre as razões MMP-9/TIMP-4 e MMP-9/RECK (Figura 16D e E).

Em conjunto, os resultados sugerem um aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 e a diminuição dos TIMPs-1, -2, -3 e -4 e TIMPs -1, -2 e -3, respectivamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC.

Figura 15. **Razão entre atividade da MMP-2 e TIMPs.** Para os valores da razão entre a atividade da MMP-2 com os níveis proteicos do TIMP-1, -2, -3, -4 e RECK utilizamos amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5), os valores são apresentados em unidades arbitrárias. **(A)** Valores da razão entre a atividade da MMP-2 com o nível proteico do TIMP-1 (MMP-2/TIMP-1). **(B)** Valores da razão entre a atividade da MMP-2 com o nível proteico do TIMP-2 (MMP-2/TIMP-2). **(C)** Valores da razão entre a atividade da MMP-2 com o nível proteico do TIMP-3 (MMP-2/TIMP-3). **(D)** Valores da razão entre a atividade da MMP-2 com o nível proteico do TIMP-4 (MMP-2/TIMP-4). **(E)** Valores da razão entre a atividade da MMP-2 com o nível proteico do RECK (MMP-2/RECK). O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

Figura 16. **Razão entre atividade da MMP-9 e TIMPs.** Para os valores da razão entre a atividade da MMP-9 com os níveis proteicos do TIMP-1, -2, -3, -4 e RECK utilizamos amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=5) e pacientes com CDI (n=5) e controle (n=5), os valores são apresentados em unidades arbitrárias. **(A)** Valores da razão entre a atividade da MMP-2 com o nível proteico do TIMP-1 (MMP-9/TIMP-1). **(B)** Valores da razão entre a atividade da MMP-2 com o nível proteico do TIMP-2 (MMP-9/TIMP-2). **(C)** Valores da razão entre a atividade da MMP-2 com o nível proteico do TIMP-3 (MMP-9/TIMP-3). **(D)** Valores da razão entre a atividade da MMP-2 com o nível proteico do TIMP-4 (MMP-9/TIMP-4). **(E)** Valores da razão entre a atividade da MMP-2 com o nível proteico do RECK (MMP-9/RECK). O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

Após analisar o perfil de expressão gênica e proteica das MMPs -2, -3, -8, -9, -12, -13, EMMPRIN e dos inibidores TIMPs -1, -2, -3, -4 e RECK e atividade da MMP-2 e MMP-9, iniciamos as análises de correlação entre estes resultados com dados clínicos. Não observamos correlação entre os valores de expressão gênica, proteica e atividade com dados clínicos (dados não mostrados).

6.4. Análise morfométrica quantitativa do colágeno intersticial

Após avaliar o perfil de expressão gênica, proteica e atividade das MMPs, TIMPs e RECK, questionamos como estaria a quantidade de colágeno em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, com CDI e doadores saudáveis. A fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo FVCIVE (%) foi significativamente aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI quando comparamos com amostras controle ($p=0,007$ e $p=0,008$, respectivamente) (Figura 17 A e B).

Figura 17. **Análise morfométrica do colágeno intersticial do tecido de pacientes com CCC, CDI e controle. (A)** Cortes transversais representativos do tecido cardíaco (parede lateral do ventrículo esquerdo) submetidos à coloração por Picrosirius red, marcação do colágeno na cor vermelha, aumento de 10X. **(B)** Valores da fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo. Para quantificação utilizamos cortes transversais de amostras de pacientes com CCC (n=5), com CDI (5) e controle (n=5). A quantificação da FVCIVE (%) foi determinada calculando-se a percentagem de área de colágeno sobre a área total de miocárdio, analisando-se aleatoriamente 15 campos de cada corte de cada amostra, utilizando-se a objetiva 10x. O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

6.5. Análise de bioinformática para identificação de microRNAs regulatórios das MMPs e TIMPs

Com objetivo de verificar se estas MMPs e seus inibidores TIMPs e RECK estavam sob regulação pós-transcricional, analisamos possíveis microRNAs que possuem interação com estas proteínas. Primeiramente, realizamos análises de bioinformática para selecionar os microRNAs.

O *software Ingenuity Pathway Analysis* permite examinar interações entre microRNAs e RNAs alvos preditos por ferramentas bioinformáticas e/ou demonstrados experimentalmente, sendo possível selecionar o nível de confiança da predição, o contexto biológico, o tipo de célula ou tecido e a doença à qual o microRNA está possivelmente associado. Foi realizada uma análise de predição das MMPs, TIMPs e RECK estudados e associados aos microRNAs, sem restrição de órgão, tecido ou doença. Foram selecionados apenas os microRNAs testados experimentalmente ou com predição altamente confiável. A seleção dos microRNAs também foi baseado na literatura (Figura 18). Ao analisar a rede formada, foram selecionados os microRNAs que possuem regulação tanto direta quanto indireta das MMPs, TIMPs e RECK. Assim, os microRNAs escolhidos para este estudo, foram: miR-21, miR-29-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-188-5p, miR-214-3p, miR-491-5p e miR-885-5p (moléculas laranja, figura 18).

Figura 18. **Via de associação das MMPs, TIMPs e RECK como alvos preditos para microRNAs.** As MMPs (moléculas azuis), TIMPs e RECK (moléculas vermelhas), microRNAs (moléculas cinzas) e os microRNAs selecionados para análise (moléculas laranjas), linhas pontilhadas (relação indireta), linhas contínuas (relação direta), sem restrição de órgão, tecido ou doença. Figura produzida no software IPA (www.ingenuity.com), no dia 20 de maio de 2014.

6.6. Análise da expressão gênica dos microRNAs regulatórios das MMPs, TIMPs e RECK

A Figura 19 mostra os níveis de expressão dos microRNAs regulatórios direta ou indiretamente das MMPs, TIMPs e RECK no miocárdio de pacientes com CCC, pacientes com CDI e amostra controle. Pode-se observar que a expressão do miR-29-5p está aumentado significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e com CDI quando comparamos com amostras controle ($p=0,01$ e $p=0,003$, respectivamente; Figura 19A). Observamos também que a expressão do miR-146-5p está aumentada significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparamos com amostras de miocárdio de pacientes com CDI ($p=0,003$) e com controle ($p=0,01$; Figura 19B). A expressão do miR155-5p está aumentada significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e com CDI quando comparamos com amostras controle ($p=0,0001$ e $p=0,002$, respectivamente; Figura 19C). A expressão do miR-214-5p está aumentada significativamente em amostras de miocárdio de paciente com CCC quando comparamos com amostras controle ($p=0,04$; Figura 19D). Observamos também que a expressão do miR-491-5p está aumentada significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CDI quando comparamos com amostras de miocárdio com CCC e com amostras controle ($p=0,005$ e $p=0,002$, respectivamente; Figura 19E). Não observamos diferença significativa dos miRs-21, -188-5p e -885-5p. Após analisamos a expressão destes microRNAs realizamos as análises de correlação entre as MMPs e TIMP. Não

observamos correlação entre os microRNAs e MMPs e TIMPs estudados (dados não mostrados).

Figura 19. **Expressão relativa dos microRNAs regulatórios das MMP e TIMPS.** Para os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expressão relativa dos miR- 21, -29-5p, -146^a-5p, -155-5p, -188-5p, 214-3p, 491-5p e -885-5p, utilizamos amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de doadores saudáveis (Controle; n=6), pacientes com CDI (n=12) e pacientes com CCC (n=17). **(A)** miR-29-5p. **(B)** Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expressão relativa do miR-146-5p. **(C)** Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expressão relativa do miR-155-5p. **(C)** Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expressão relativa do miR-214-3p. **(D)** Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expressão relativa do miR-491-5p. **(E)** Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expressão relativa do miR-491-5p. **(F)** Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expressão relativa do miR-21. **(G)** Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expressão relativa do miR-188-5p. **(H)** Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expressão relativa do miR-885-5p. O cálculo estatístico não paramétrico (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) foi feito entre os grupos os valores foram considerados significativos $p < 0.05$.

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi analisada a expressão gênica e proteica no miocárdio de pacientes com CCC e CDI de MMPs e seus inibidores TIMPs e RECK. Com esta análise obtivemos um perfil de expressão destas proteínas envolvidas com a degradação de componentes da MEC do miocárdio, síntese e deposição de colágeno no processo de fibrose e remodelamento cardíaco (8, 9). Em nossos resultados observamos a expressão gênica das gelatinases MMP-2 e MMP-9, aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI quando comparada com amostras controle (Figura 7A e C). Observamos também o aumento da expressão proteica da MMP-2 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI e o aumento da MMP-9 em amostras de pacientes com CCC quando comparadas com amostras controle (Figura 7B e D). A atividade da MMP-2 e MMP-9 está aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparada com amostras de pacientes com CDI e controle (Figura 8A e B). A expressão gênica dos inibidores TIMP-1, -2, -3 e -4 está aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI (Figuras 13 A, C, E, G). Observando a expressão proteica desses inibidores, verificamos que somente a expressão do TIMP-2 está aumentada em amostras pacientes com CCC e CDI (Figura 13D). Através da razão entre a atividade da MMP-2 e MMP-9 com a expressão proteica dos inibidores TIMPs, observamos o aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 e a diminuição dos TIMPs: -1, -2, -3 e -4 e TIMPs -1, -2 e -3, respectivamente em pacientes com CCC, ocasionando um desequilíbrio entre sua ativação e inibição (Figura 15 A, B, C, D e 16 A, B, C e D). Observamos também o

aumento da fração de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo em pacientes com CCC e CDI, quando comparamos com amostras controle (Figura 17B).

É importante ressaltar que a principal característica do tecido cardíaco dos pacientes com CCC é a presença de uma miocardite difusa com aspectos focais, e esse infiltrado inflamatório ocasiona a ativação das MMPs, enquanto que em amostras de miocárdio de pacientes com CDI a presença de infiltrado é ausente e poucas células inflamatórias são encontradas (Figura 6). Isto explicaria a diferença entre a massa e atividade da MMP-2 e MMP-9 em amostras de pacientes com CDI. A expressão da MMP-2 e MMP-9 em amostras de pacientes com CDI em nosso estudo poderia ser proveniente de cardiomiócitos ou fibroblastos intersticiais. Além disso, sabe-se que as células do infiltrado inflamatório mononucleares de pacientes com CCC, produzem citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-15 (67, 76). Foi observado que macrófagos humanos infectados com *T. cruzi* aumentou os níveis de MMP-9, que foi relacionada com a produção de TNF- α e IL-6 (183). O TNF- α tem sido associado à patogênese de outras doenças cardiovasculares, sendo inclusive, estudado como alvo terapêutico (184). A ativação dos receptores do TNF- α pode induzir a síntese da MMP-9, através da ativação dos fatores de transcrição AP-1 (do inglês, “*activator protein – 1*”) e NF- κ B (do inglês, “*factor nuclear kappa B*”), presentes na sequência da região promotora da MMP-9 (185, 186). Foi observado em modelo animal de infarte do miocárdio, que o aumento do TNF- α no miocárdio está diretamente relacionado com o aumento e ativação de MMP-9. Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram que o bloqueio do TNF- α , diminuiu a dilatação do ventrículo

esquerdo que foi associado com uma diminuição da produção e atividade da MMP-9, assim os autores sugerem que o TNF- α contribui com o remodelamento do miocárdio através da indução da MMP-9 (187). Tomadas em conjunto, tais informações indicam que o TNF- α pode contribuir com a produção e ativação da MMP-9 no tecido de pacientes com CCC.

O aumento da expressão e/ou atividade proteolítica da MMP-2 e MMP-9 no soro, plasma ou nos tecidos cardíacos têm sido relatados em diversos estudos clínicos e experimentais de doenças cardiovasculares (188, 189).

Na infecção aguda experimental pelo *T. cruzi* foi observado que o aumento atividade da MMP-2 e MMP-9 coincidiu com a intensidade do infiltrado inflamatório, e essa atividade tem sido associada com a degradação da arquitetura da MEC miocárdica e invasão das células inflamatórias migratórias no tecido contribuindo para miocardite chagásica (157). Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que o tratamento com doxiciclina, um inibidor de MMP reduziu a intensidade do infiltrado inflamatório, e os níveis locais de TNF- α , IFN- γ e NO e aumentou a sobrevida dos animais (157). Em outro trabalho com modelo murino de miocardite autoimune e subsequente cardiomiopatia dilatada, os autores sugerem que a MMP-9 é produzida por macrófagos durante a fase inflamatória e estaria envolvida com progressão da doença, enquanto que na fase crônica a MMP-2 seria produzida por cardiomiócitos participando do processo de fibrose (190).

Observamos em amostras de miocárdio de pacientes com CCC o aumento da expressão gênica, proteica e atividade da MMP-2 e o aumento exclusivo da proteína MMP-9 (Figura 7 e 8) e através da razão proteica entre MMP-2/MMP-9 observamos o aumento da MMP-2 em relação MMP-9 (dado não mostrado). Em um trabalho, foi observado em plasma de pacientes com CCC o aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 em comparação com pacientes com forma assintomática da doença e que o nível sérico da MMP-9 foi maior do que a MMP-2 (191). Os autores levantaram a hipótese de que a predominância dos níveis da MMP-9 intensifica o remodelamento cardíaco e favorece a evolução da forma cardíaca da doença de Chagas, mas quando os níveis da MMP-2 predominam o remodelamento cardíaco é menos intenso (191). Nesse estudo, também foi demonstrado que enquanto a MMP-2 está negativamente correlacionada com a produção de citocinas pró-inflamatórias, com TNF- α a MMP-9 se correlaciona positivamente (191). Okamoto e colaboradores também demonstraram em soro de pacientes com CCC o aumento dos níveis séricos da MMP-9 em relação MMP-2, mas os autores observaram que somente o nível sérico da MMP-2 aumentou progressivamente de acordo com a gravidade dos pacientes infectados com *T. cruzi*, e que a razão entre MMP-2/MMP-9 também associou-se com a gravidade desses pacientes (192). Nesse trabalho os autores sugerem que a MMP-2 está relacionada com o desenvolvimento da fibrose e a MMP-9 com a miocardite inflamatória, e que a razão entre MMP-2/MMP-9 pode refletir o equilíbrio entre inflamação e fibrose (192). Entretanto, a diferença entre o aumento da MMP-9 em

relação a MMP-2 observada pode ser devido ao uso de amostras e tipos de metodologias distintos dos usados em nosso trabalho.

Baustista-López e colaboradores também observaram em soro de pacientes com CCC o aumento da expressão e atividade da MMP-2 e MMP-9, quando comparado com pacientes na fase assintomática da doença de Chagas. Nesse estudo os autores também observaram que o aumento da atividade da MMP-2 se correlacionou positivamente entre o tempo de relaxamento isovolumétrico, sugerindo que o relaxamento anormal poderia ser devido a um processo de remodelação miocárdica, no qual a MMP-2 está envolvida (193). Outro grupo observou que o aumento do níveis séricos da MMP-2, correlacionou com o remodelamento do ventrículo esquerdo e mau prognóstico em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica (194). Em outro trabalho foi observado o aumento de MMP-9 no plasma de pacientes em risco de doenças cardiovasculares, e essa foi associada com o aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e da espessura da parede (195). Em conjunto nossos resultados com a literatura podemos sugerir que a produção da MMP-9 é induzida por citocinas inflamatórias localmente encontrada no miocárdio de pacientes com CCC, e que a miocardite difusa induz a atividade da MMP-2 e MMP-9 e ambas contribuem com o remodelamento cardíaco e fibrose progressiva.

Em nosso trabalho também investigamos a expressão gênica e proteica da estromelisina MMP-3, das collagenases MMP-1, MMP-8, MMP-13 e a metaloestase MMP-12, entre os grupos de amostras de miocárdio pacientes com

CCC e CDI e controle. A expressão gênica da MMP-1, MMP-3 e MMP-8 não foi detectada em nenhuma amostra de miocárdio (CCC, CDI e controle). A expressão proteica da MMP-3 e MMP-8 não se mostrou aumentada entre as amostras de miocárdio dos grupos estudados (CCC, CDI e controle) (Figura 9 e 10A), também não detectamos a expressão proteica da MMP-1. Vale ressaltar que o RNAm da MMP-1 contém um elemento desestabilizante de RNAm (sequência AUUUA) que reduz sua meia-vida (195). Além disso, dados da literatura mostram que a transcrição da MMP-1 pode ser regulada por diversos mecanismos transcricionais e vias de sinalização (196-198). A ativação transcricional da MMP-1 pode ser mediada pela citocina pró-inflamatória IL-1 β , essa citocina é um potente ativador de transcrição da MMP-1 (197). A transcrição dessa MMP pela IL-1 β é através da ativação de vários fatores de transcrição, entre eles o NF-kB, AP-1 e PEA-3 (do inglês, "*Polyomavirus enhancer activator 3*") (197). No entanto, dado não publicado do nosso grupo demonstrou que não há produção da IL-1 β no miocárdio de pacientes com CCC e CDI, o que corrobora com a ausência da MMP-1 em nosso trabalho. O RNAm da MMP-3, não apresenta esse elemento desestabilizante de RNAm, implicando em uma meia-vida mais longa, porém como a maioria dos genes a MMP-3 só é transcrita até ser necessária, o que poderia explicar em parte a incompatibilidade da expressão gênica e proteica observadas nos grupos de pacientes estudados (CCC e CDI) (199, 200). A MMP-8 pode ser armazenada em grânulos de neutrófilos circulantes e liberadas quando esses são ativados, enquanto que em fibroblastos são transcritas de acordo com a

necessidade, o que explica o fato de não detectarmos a expressão do RNAm da MMP-8 (201).

Observando a expressão gênica e proteica da MMP-13 e MMP-12 no tecido cardíaco de pacientes com CCC, CDI e controle, verificamos que o RNAm dessas MMPs está aumentado no tecido cardíaco de pacientes com CCC e CDI quando comparado com amostras controle (Figura 10B e 11A). A expressão proteica da MMP-13 e MMP-12 não se mostrou aumentada entre as amostras de miocárdio (CCC, CDI e controle) (Figura 10C e 11B). Sabe-se que o TNF- α também pode induzir a síntese da MMP-13, através dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B, o que explicaria o aumento da expressão gênica da MMP-13 em amostras de pacientes com CCC (186). O aumento da expressão gênica da MMP-13 observada em amostras de pacientes com CDI, pode ser mediada pela citocina anti-inflamatória TGF- β 1 (202). Em um trabalho foi observado o aumento da expressão da MMP-13 no miocárdio de pacientes com cardiomiopatias em fase terminal, o que pode resultar na degradação do colágeno fibrilar do miocárdio, porém há poucos relatos sobre a MMP-13 em doenças cardiovasculares (203, 204). A MMP-12 é produzida especificamente por macrófagos e pode facilitar a migração das células do infiltrado inflamatório através de processos de degradação da MEC (205). Foi observado em modelo murino de miocardite viral o aumento da expressão gênica da MMP-12 na fase aguda e crônica, os autores sugerem que MMP-12 pode desempenhar um papel importante do remodelamento cardíaco e gravidade da doença (206). Outro grupo mostrou em modelo experimental de aterosclerose que camundongos duplo nocaute em MMP-

12/apolipoproteína E tem redução da placa aterosclerótica e da progressão da lesão, sugerindo que a MMP-12 desempenha uma função prejudicial na aterosclerose (207). Assim, podemos sugerir que o conjunto de estímulos presente na lesão de pacientes com CCC poderia favorecer o aumento da expressão gênica da MMP-12 por macrófagos, que compõem 50% do infiltrado inflamatório (208).

Em nosso trabalho, observamos o aumento da expressão gênica de EMMPRIN em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI, mas a expressão proteica não se mostrou aumentada entre os grupos (Figura 12A e 12B). Foi observado em modelo experimental que a expressão de EMMPRIN no miocárdio de camundongo, induziu o aumento da expressão da MMP-2, o qual foi relacionado com o aumento da atividade da MMP-2, os autores sugerem que a associação entre EMMPRIN e MMP-2 contribuiu com o remodelamento do miocárdio, dilatação do ventrículo esquerdo e fibrose (209). Outro trabalho mostrou que a citocina IL-18 induz o aumento da expressão da gênica de EMMPRIN em cultura de cardiomiócitos, através da ativação dependente dos fatores de transcrição Sp1 (do inglês, "*Specificity Protein 1*") e JNK (do inglês, "*c-Jun N-terminal Kinases*"). Nesse mesmo trabalho, os autores demonstram que o aumento da expressão de EMMPRIN via IL-18, estimula a expressão e atividade da MMP-9, contribuindo com o remodelamento do miocárdio (210). Nosso grupo mostrou o aumento da expressão da IL-18 em amostras de miocárdio de paciente com CCC (211). Tomadas em conjunto, tais informações, podemos sugerir que o aumento da expressão da IL-18 durante a lesão e inflamação em pacientes com

CCC, pode induzir o aumento da expressão de EMMPRIN, que por sua vez, aumentará a expressão e atividade de MMP-9, observada em nosso trabalho contribuindo com o remodelamento do miocárdio e disfunção cardíaca. Porém, não podemos descartar a possibilidade de que o EMMPRIN também possa induzir o aumento da expressão e atividade da MMP-2 observado em pacientes com CCC.

Entretanto, nossos resultados mostraram incompatibilidade entre os níveis de RNAm dos genes MMP-12, MMP-13 e EMMPRIN e de suas proteínas. O aumento do RNAm na ausência do aumento da proteína poderia ser uma tentativa do tecido para substituir a perda da proteína correspondente.

Avaliamos também a expressão gênica e proteica dos inibidores específicos das MMP, são eles TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e o TIMP-4. Nossos resultados mostram que a expressão gênica do TIMP-1, -2, -3 e -4 está aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI (Figuras 13 A, C, E, G). Observando a expressão proteica desses inibidores, verificamos que somente a expressão do TIMP-2 está aumentada em amostras pacientes com CCC e CDI (Figura 13D). Observamos também que o aumento do nível do RNAm do TIMP-1, -3 e -4 ocorreu sem o aumento do nível proteico, o que poderia ser uma tentativa de substituir ou aumentar a sua proteína. Foi observado em modelo murino após o infarto do miocárdio, o aumento da expressão gênica de TIMPs, mas não de sua proteína, os autores sugerem que o aumento do RNAm dos TIMPs, pode ocorrer sem mudança nos níveis de suas proteínas, porém não explicam o que poderia

influenciar essa incompatibilidade (212). No entanto, sabe-se que os TIMPs são inibidores proteicos e exercem sua função através da formação de complexos MMP-TIMP e o desequilíbrio em suas proporções ocasionam a degradação da MEC (150, 213). Desta forma, avaliamos se a diferença encontrada na atividade da MMP-2 e MMP-9 em pacientes com CCC estariam em desequilíbrio com seus inibidores TIMPs. Através da razão entre a atividade da MMP-2 e MMP-9 e os níveis proteicos dos TIMP-1, -2, -3 e -4, observamos o aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 e a diminuição dos TIMPs-1, -2,3,4 e TIMPs-1, -2, e -3, respectivamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, sugerindo um desequilíbrio entre sua ativação e inibição (Figura 15 A, B, C, D e 16 A, B, C e D). Diversos dados da literatura demonstram que esse desequilíbrio entre MMP e TIMP contribui com o remodelamento do miocárdio, disfunção cardíaca e progressão de doenças cardiovasculares (100, 214, 215). Foi observado no tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia isquêmica, a diminuição do TIMP-1,-3,-4 e aumento da atividade da MMP-9, favorecendo a degradação da MEC, remodelamento cardíaco e dilatação ventricular (216). Outro trabalho demonstrou em camundongos com insuficiência cardíaca hipertensiva, que o aumento da expressão do TIMP-2 refletiu em uma resposta compensatória ao aumento da atividade da MMP-2 (217). Assim, podemos sugerir que o aumento da expressão gênica e proteica do TIMP-2 observado em pacientes com CCC, pode ser um mecanismo compensatório em relação ao aumento da atividade da MMP-2. Em conjunto nossos resultados com a literatura podemos sugerir que a expressão dos TIMPs não é suficiente para inibir a ação da MMP-2 e MMP-9, causando um

desequilíbrio entre a ativação e inibição, contribuindo com o remodelamento do miocárdio e disfunção ventricular observado em pacientes com CCC.

Em nosso trabalho, também avaliamos a expressão gênica e proteica da RECK, esse é o único inibidor da MMP-2 e MMP-9 ancorado à membrana celular. Observamos o aumento da expressão gênica e proteica da RECK em amostras de pacientes com CCC e CDI quando comparada com amostras controle (Figura 14 A e B). Em um trabalho foi observado em cultura de fibroblasto cardíaco que o aumento da expressão da proteína RECK inibiu a expressão da MMP-2 e MMP-9 (218). No entanto, não observamos diferença entre as razões da atividade da MMP-2 e MMP-9 e o nível proteico da RECK, sugerindo que a proteína RECK não exerce a função de inibição da MMP-2 e MMP-9 em amostras de miocárdio dos grupos estudados (CCC, CDI e controle (Figura 15 E e 16 E). Embora, a RECK seja bastante discutida como um inibidor da MMP-2 e MMP-9 em doenças tumorais, pouco se sabe até o presente momento qual outra função essa pode desempenhar e qual sua relação com doenças cardiovasculares.

Adicionalmente, observando o desequilíbrio entre a MMP-2 e MMP-9 e seus inibidores, avaliamos a quantidade de colágeno em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CDI. Observamos o aumento da fração de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo em pacientes com CCC e CDI, quando comparamos com amostras controle (Figura 17B). Foi observado que o aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9, está associado à maturação de colágeno I e III em pacientes com insuficiência cardíaca, contribuindo com a deposição de

colágeno no processo de fibrose (7). Outro grupo mostrou em modelo murino de insuficiência cardíaca, o aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 acompanhado com aumento da síntese e deposição e desnaturação do colágeno, induzindo a dilatação ventricular e fibrose (219).

Dados da literatura, mostram que teoricamente o aumento da atividade da MMP resultaria na diminuição do colágeno, mas pode ocorrer o contrário, isto é, um aumento da atividade da MMP associado com aumento de fibrose, enquanto que a inibição da atividade da MMP está associada com menor deposição de tecido fibroso (220-222). Este paradoxo é devido ao fato que o colágeno da matriz passa por processos de síntese e degradação, que no remodelamento cardíaco patológico se torna um ciclo vicioso resultando em deposição de fibrose mal estruturado no miocárdio (8, 219, 223). O resultado final é, muitas vezes, aumento das MMPs acompanhado da fibrose (219). Tomadas em conjunto, tais informações, o aumento de colágeno associado com aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 encontrada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, sugere que estas proteínas estão modulando a síntese, degradação e organização do colágeno, contribuindo com a fibrose e alterando a arquitetura miocárdica ocasionando disfunção cardíaca

Em nosso trabalho, também avaliamos possíveis microRNA reguladores das MMPs, TIMPs e RECK em amostras de pacientes com CCC e CDI. A análise de predição entre microRNAs e RNAm alvos, foi feita com ferramentas de bioinformática e baseada na literatura. Foram selecionados microRNAs

experimentalmente observados ou com predição bastante confiável para geração de rede de interação molecular. Na análise feita, selecionamos os seguintes microRNAs: miR-21, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-188-5p, miR-491-5p e miR-885-5p (Figura 18). Observamos a expressão aumentada do miR-29-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p em amostras de pacientes com CCC e CDI (Figura 19 A, B e C). A expressão do miR-214-3p está aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparada com amostras controle (Figura 19D). Observamos também que a expressão do miR-491-5p está aumentada em amostras de pacientes com CDI quando comparada com amostras de pacientes com CCC e com amostras controle (Figura 19E). Não observamos diferença significativa dos miRs-21, -188-5p e -885-5p (Figura 19 F, G e H). Também não observamos correlação entre os microRNAs e MMPs e TIMPs estudados (dados não mostrados).

Em conjunto nossos resultados sugerem que as MMPs, TIMPs e RECK estudadas em amostras de pacientes com CCC e CDI não estão sob regulação pós- transcricional pelos microRNAs analisados.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos durante este trabalho, do estudo da expressão da MMPs e seus inibidores TIMPs, permitem identificar quais contribuem para o desenvolvimento do remodelamento do miocárdio e fibrose cardíaca na CCC. Embora algumas dessas alterações da expressão das MMPs, TIMPs e RECK tenham sido compartilhadas com a CDI, observamos que os pacientes com CCC apresentam o aumento da atividade da MMP-2 e MMP9, indicando que essas MMPs podem contribuir com o pior prognóstico da doença de Chagas, quando comparada a outras cardiomiopatias de etiologia não inflamatória.

9. ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

SDC: 4002/13/127

PROJETO DE PESQUISA

Título: Análise das Metaloproteinases de Matriz e seus Inibidores no Tecido Cardíaco de Pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica".
Pesquisador Responsável: Edecio Cunha Neto **Versão:** 2
Pesquisador Executante: Monique Andrade Baron **CAAE:** 24748113.6.0000.0068
Co-autores: PRiscila Camillo Teixeira, Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira, Isabela Cunha Navarro, Jorge Kalil, Fábio B. Jatene, Fernando Bacal, Ronaldo Honorato Santos
Finalidade Acadêmica: Mestrado
Orientador: Edecio Cunha Neto
Instituição: HCFMUSP
Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11076
Número do Parecer: 998.639
Data da Relatoria: 25/03/2015
Apresentação do Projeto: Emenda do projeto: Análise das Metaloproteinases e seus inibidores na Cardiomiopatia Chagásica Crônica: Papel dos MiRNAs na sua regulação pós-transcricional
Objetivo da Pesquisa: Estudar as principais MMPs e TIMPs e seus miRNAs regulatórios, que possuem atividade proteolítica e expressão alteradas em amostras de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos para o participante da pesquisa, uma vez que trabalharemos com análises em tecido cardíaco que é de órgão comumente descartado pós-cirurgia. Não há benefício direto e imediato para o participante. Entretanto, a pesquisa ajudará o entendimento sobre a patogênese da Doença de Chagas e também poderá fornecer indícios para novos biomarcadores, o que pode beneficiar outro indivíduo
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Devido a solicitação da Pós-Graduação do Programa Alergia e Imunopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para troca de título de: "Análise das Metaloproteinases e Seus Inibidores na Cardiomiopatia Chagásica Crônica: Papel dos MiRNAs na Sua Regulação Pós-Transcricional", para: "Análise das metaloproteinases de matriz e seus inibidores no tecido cardíaco de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica".
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: adequada
Recomendações: não há
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: aprovado
Situação do Parecer: Aprovado
Necessita Apreciação da CONEP: Não

São Paulo, 01 de Abril de 2015

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
06/04/15
Anna Rucica

Alfredo José Mansur

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO B – Análise da qualidade e integridade das amostras de RNA.

Etiol.	Pacientes	Concentração (µg/µl)	Razão 260/280nm	RIN
Cardiomiopatia Chagásica Crônica	CCC-01	2731,2	1.90	7.9
	CCC-02	2362,2	1.96	7.4
	CCC-03	2504,9	1.90	7.4
	CCC-04	1,9316	1.92	7.2
	CCC-05	1881,6	1,99	9.0
	CCC-06	1,1150	1.89	7.8
	CCC-07	4,6559	1.99	7.7
	CCC-08	2332,1	1.92	7.7
	CCC-09	1826,6	1.92	7.4
	CCC-10	2216,9	1.94	7.9
	CCC-11	1,7401	1,99	8.2
	CCC-12	3,278	1,94	7.4
	CCC-13	2,0194	1,93	7.5
	CCC-14	1,9316	1,94	7.4
	CCC-15	2191,7	1,86	7.2
	CCC-16	2798,7	1,91	7.4
	CCC-17	1,2606	1,97	8,6
Cardiomiopatia Dilatada Idiopática	CDI-01	1,4527	1.94	7.4
	CDI-02	2,3858	1.92	8.8
	CDI-03	2,0905	1.93	7.5
	CDI-04	3,6245	1.98	8.9
	CDI-05	3,9175	1,94	7.4
	CDI-06	1831,1	1.93	7.8
	CDI-07	1747,9	1,93	7.9
	CDI-08	1983,5	1,94	7.4
	CDI-09	1894,3	1,97	8.9
	CDI-10	1684	1,89	7.7
	CDI-11	2316,5	1,99	8.9
	CDI-12	3841,4	1,91	7.9
Controle	Controle-01	1,4527	1.94	7.3
	Controle-02	2,3844	1.92	7.2
	Controle-03	2,0905	1.93	8.4
	Controle-04	3,9175	1,94	8.7
	Controle-05	3,6245	1.98	8.1
	Controle-06	1,76661	1,99	7.9

Análise de qualidade e integridade das amostras de RNA utilizadas para a análise de expressão gênica das MMPs e TIMPs. Etiol. Etiologia; RIN, (RIN, do inglês, *RNA integrity number*).

Avaliação da integridade e concentração de RNA utilizando o equipamento *Bioanalyzer* (Agilent). A imagem representa uma das amostras de RNA que foi quantificada, onde podemos observar a integridade através do número de RIN. A. No gráfico observamos os picos de 18S e 28S. B. gel virtual com as bandas representativas de 28S e 18S.

ANEXO C – Análise de Especificidade e Eficiência dos genes MMPs, TIMPs e RECK.

A. Curva de Amplificação

B. Curva de Dissociação

Análise de Especificidade e Eficiência dos genes MMPs, TIMPs e RECK. **A.** Curva de amplificação, para cálculo da eficiência. **B.** Curva de dissociação, para confirmar especificidade do produto amplificado. Imagem demonstrativa de uns dos experimentos.

Exemplo: (Reck): $E=10^{-1/(\text{Slope})} \rightarrow 10^{(-1/2,5423)} = 2,5$

Análise de Especificidade e Eficiência dos genes MMPs, TIMPs e RECK. Gráfico de eficiência, os gráficos contêm as equações de reta, cujos coeficientes angulares foram utilizados para cálculo da eficiência.

ANEXO D – Análise de Especificidade e Eficiência dos genes de referência candidatos a normalizadores.

Análise de Especificidade e Eficiência dos genes de referência candidatos a normalizadores. **A.** Curva de amplificação, para cálculo da eficiência. **B.** Curva de dissociação, para confirmar especificidade do produto amplificado. **C.** Gráfico de eficiência, os gráficos contêm as equações de reta, cujos coeficientes angulares foram utilizados para cálculo da eficiência.

ANEXO E – Análise da média do Ct dos genes de referência candidatos a normalizadores.

Gráfico da média do Ct dos genes de referência candidatos a normalizadores. Genes RPLP0 (do inglês, “*Ribosomal protein, large, P0*”), GAPDH (do inglês, “*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*”), 18S (do inglês, “*Eukaryotic 18S rRNA*”) e HPRT (do inglês, “*Hypoxanthine phosphoribosyl transferase*”) e números acima da barra indicam média $\pm$ desvio padrão dos Cts avaliados. (n=15). A expressão gênica do gene RPL0 apresentou um menor desvio padrão e expressão homogênea para as amostras.

ANEXO E – Análise da qualidade e integridade das amostras de microRNA.

Etiol.	Pacientes	Concentração (ng/μl)	Razão 260/280nm
Cardiomiopatia Chagásica Crônica	CCC-01	187,2	1.94
	CCC-02	149,6	2.0
	CCC-03	187,21	2.0
	CCC-04	315,9	1.97
	CCC-05	294,9	1,98
	CCC-06	119,6	2.02
	CCC-07	396,9	2.0
	CCC-08	139,3	2.0
	CCC-09	333,7	1.99
	CCC-10	236,3	1.99
	CCC-11	389,6	1,99
	CCC-12	99,3	2.0
	CCC-13	219	1,98
	CCC-14	189,5	1,94
	CCC-15	157,7	2.0
	CCC-16	213,7	2.0
	CCC-17	243,8	1,97
Cardiomiopatia Dilatada Idiopática	CDI-01	286,6	2.0
	CDI-02	253	1.99
	CDI-03	288,9	2.0
	CDI-04	217,2	2.0
	CDI-05	332,8	2.1
	CDI-06	326,7	2.07
	CDI-07	150,5	2.0
	CDI-08	269,3	1,99
	CDI-09	200,9	2.1
	CDI-10	180,7	2.02
	CDI-11	238,1	2.08
	CDI-12	162,3	2.02
Controle	Controle-01	237,2	2.0
	Controle-02	162,7	2.0
	Controle-03	474,1	2.0
	Controle-04	202,5	1,99
	Controle-05	351,1	2.02
	Controle-06	818	1,99

ANEXO F– Análise de qualidade e integridade das amostras proteicas utilizadas para a análise de expressão proteica para Western Blotting e Zimografia.

Coloração, Aquisição e análise de integridade do extrato proteico. A imagem representa um dos géis feitos para visualizar a integridade das proteínas utilizadas nos experimentos de expressão proteica, por “*Western Blotting*” e zimografia. Todos os extratos proteicos utilizados apresentaram integridade.

ANEXO G – Controle da atividade das MMPs.

Controle da atividade das MMPs. O resultado para os três géis: **(A)** Gel incubado com solução reveladora (50mM de Tris pH 8.8, 5mM CaCl₂, 0,02% NaN₃) **(B)** o gel incubado com a solução reveladora, contendo 100mM de EDTA **(C)** O gel incubado com a solução reveladora, contendo 20mM de 1,10 fenantrolina. Podemos observar a presença de bandas gelatinolíticas claras apenas no gel A, enquanto que os géis B e C não as apresentam. Como já mencionado, que as MMPs necessitam de cálcio e zinco para sua estabilidade e atividade enzimática, respectivamente. Com isso podemos concluir que as bandas do gel A são resultado da atividade enzimática das MMPs.

10. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thiene G, Basso C, Calabrese F, Angelini A, Valente M. Twenty years of progress and beckoning frontiers in cardiovascular pathology: cardiomyopathies. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14(4):165-9.
2. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*. 2005;111(21):2837-49.
3. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93(5):841-2.
4. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006;113(14):1807-16.
5. Spinale FG. Novel approaches to retard ventricular remodeling in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 1999;1(1):17-23.
6. Sieravogel MJ, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Strauss BH. Matrix metalloproteinases: a therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*. 2003;9(13):1033-40.
7. Polyakova V, Loeffler I, Hein S, Miyagawa S, Piotrowska I, Dammer S, et al. Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int J Cardiol*. 2011;151(1):18-33.
8. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res*. 2000;46(2):214-24.

9. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):604-13.
10. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(5):376-85.
11. Mishra PK, Givvimani S, Chavali V, Tyagi SC. Cardiac matrix: a clue for future therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2271-6.
12. Chen KC, Wang YS, Hu CY, Chang WC, Liao YC, Dai CY, et al. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB J.* 2011;25(5):1718-28.
13. Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol.* 2000;23(12):883-9.
14. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010;375(9723):1388-402.
15. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973;27:347-82.
16. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol.* 2012;34(6):753-70.
17. Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J, et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(2):e953.
18. Imai K, Maeda T, Sayama Y, Mikita K, Fujikura Y, Misawa K, et al. Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(1):146-8.
19. Coffield DJ, Spagnuolo AM, Shillor M, Mema E, Pell B, Pruzinsky A, et al. A model for Chagas disease with oral and congenital transmission. *PLoS One.* 2013;8(6):e67267.

20. **Alonso-Vega C, Billot C, Torrico F. Achievements and challenges upon the implementation of a program for national control of congenital Chagas in Bolivia: results 2004-2009. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(7):e2304.**
21. **Fearon MA, Scalia V, Huang M, Dines I, Ndao M, Lagacé-Wiens P. A case of vertical transmission of Chagas disease contracted via blood transfusion in Canada. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2013;24(1):32-4.**
22. **Marques J, Mendoza I, Noya B, Acquatella H, Palacios I, Marques-Mejias M. ECG manifestations of the biggest outbreak of Chagas disease due to oral infection in Latin-America. Arq Bras Cardiol. 2013;101(3):249-54.**
23. **OMS. Chagas Disease (American trypanosomiasis) fact sheet nº 340. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html2013>.**
24. **Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. Nat Rev Cardiol. 2012;9(10):576-89.**
25. **Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. Acta Trop. 2014;130:167-74.**
26. **Bonney KM. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? Parasite. 2014;21:11.**
27. **Salamanca-Dejour D, Blanchet D, Aznar C, La Ruche G, Jeannel D, Gastellu-Etchegorry M. [Chagas disease (American trypanosomiasis) in France]. Med Mal Infect. 2012;42(8):344-8.**
28. **Cortez J, Ramos E, Valente C, Seixas J, Vieira A. [Global expression of Chagas' disease - emerging opportunities and impact in Portugal]. Acta Med Port. 2012;25(5):332-9.**
29. **Assal A, Corbi C. [Chagas disease and blood transfusion: an emerging issue in non-endemic countries]. Transfus Clin Biol. 2011;18(2):286-91.**
30. **OMS. Chagas Disease (American trypanosomiasis) fact sheet nº 340.**
31. **OMS. Sixty-Third World Health Assembly. Provisional Agenda item**
32. **Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. Clin Microbiol Rev. 2011;24(4):655-81.**

33. Salvatella R, Irabedra P, Castellanos LG. Interruption of vector transmission by native vectors and "the art of the possible". *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(1):122-30.
34. Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(2):193-6.
35. Abad-Franch F, Vega MC, Rolón MS, Santos WS, Rojas de Arias A. Community participation in Chagas disease vector surveillance: systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1207.
36. OMS. Chagas Disease (American trypanosomiasis).
37. Musaev SN, Novikova AV, Klimanskaia EV, Shershevskiaia Ala. [Clinico-endoscopic and morphometric characteristics of gastric and duodenal mucosa in children with dermatomyositis]. *Revmatologiya (Mosk)*. 1991(4):21-5.
38. Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:95-7.
39. Abad-Franch F, Santos WS, Schofield CJ. Research needs for Chagas disease prevention. *Acta Trop*. 2010;115(1-2):44-54.
40. Salomon CJ. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *J Pharm Sci*. 2012;101(3):888-94.
41. Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL, Cardiology CoCDotlSo. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(9):767-76.
42. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e29.
43. Linetzky B, Konfino J, Castellana N, De Maio F, Bahit MC, Orlandini A, et al. Risk of cardiovascular events associated with positive serology for Chagas: a systematic review. *Int J Epidemiol*. 2012;41(5):1356-66.

44. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:113-22.
45. Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:17-30.
46. Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgrad Med J*. 2006;82(974):788-98.
47. Parada H, Carrasco HA, Añez N, Fuenmayor C, Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol*. 1997;60(1):49-54.
48. Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:71-80.
49. Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res*. 2010;43(3):323-31.
50. Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(3):287-92.
51. Marinho CR, D'Império Lima MR, Grisotto MG, Alvarez JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun*. 1999;67(1):308-18.
52. Vieira PM, Francisco AF, Machado EM, Nogueira NC, Fonseca KaS, Reis AB, et al. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease. *PLoS One*. 2012;7(3):e32912.
53. Caetano LC, Brazão V, Filipin MeV, Santello FH, Caetano LN, Toldo MP, et al. Effects of repetitive stress during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection on chronic Chagas' disease in rats. *Stress*. 2009;12(2):144-51.
54. Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(4):727-43.
55. Nunes MC, Carmo AA, Rocha MO, Ribeiro AL. Mortality prediction in Chagas heart disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2012;10(9):1173-84.

56. Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(2 Suppl 3):1-48.
57. Mady C, Cardoso RH, Barretto AC, da Luz PL, Bellotti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. *Circulation.* 1994;90(6):3098-102.
58. Barbosa AP, Cardinalli Neto A, Otaviano AP, Rocha BF, Bestetti RB. Comparison of outcome between Chagas cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(6):517-25.
59. Gurgel CB, Ferreira MC, Mendes CR, Coutinho E, Favoritto P, Carneiro F. [Apical lesions in Chagas' heart disease patients: an autopsy study]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(6):709-12.
60. Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 2007;115(3):279-83.
61. Andrade JP, Marin Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arq Bras Cardiol.* 2011;96(6):434-42.
62. Oliveira JS, Mello De Oliveira JA, Frederigue U, Lima Filho EC. Apical aneurysm of Chagas's heart disease. *Br Heart J.* 1981;46(4):432-7.
63. Samuel J, Oliveira M, Correa De Araujo RR, Navarro MA, Muccillo G. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. *Am J Cardiol.* 1983;52(1):147-51.
64. Braga JC, Labrunie A, Villaça F, do Nascimento E, Quijada L. Thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. *Sao Paulo Med J.* 1995;113(2):862-6.
65. Arteaga-Fernández E, Barretto AC, Ianni BM, Mady C, Lopes EA, Vianna CeB, et al. [Cardiac thrombosis and embolism in patients having died of chronic Chagas cardiopathy]. *Arq Bras Cardiol.* 1989;52(4):189-92.

66. Rossi MA. Connective tissue skeleton in the normal left ventricle and in hypertensive left ventricular hypertrophy and chronic chagasic myocarditis. *Med Sci Monit.* 2001;7(4):820-32.
67. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104 Suppl 1:252-8.
68. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 2005;167(2):305-13.
69. Kalil J, Cunha-Neto E. More on Chagas disease cardiomyopathy. *Parasitol Today.* 1997;13(9):362; author reply -3.
70. Newell SJ, Morgan ME, McHugo JM, White RH, Taylor CM, Chapman S, et al. Clinical significance of antenatal calyceal dilatation detected by ultrasound. *Lancet.* 1990;336(8711):372.
71. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 2001;17(1):99-107.
72. Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol.* 1987;10(11):665-70.
73. Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;48(5):637-44.
74. Costa VM, Torres KC, Mendonça RZ, Gresser I, Gollob KJ, Abrahamsohn IA. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2006;177(5):3193-200.

75. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 2003;71(3):1185-93.
76. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 2001;17(1):99-107.
77. Arnaiz MR, Fichera LE, Postan M. Cardiac myocyte hypertrophy and proliferating cell nuclear antigen expression in Wistar rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol.* 2002;88(5):919-25.
78. Petersen CA, Burleigh BA. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infect Immun.* 2003;71(8):4441-7.
79. Chandrasekar B, Melby PC, Pennica D, Freeman GL. Overexpression of cardiotrophin-1 and gp130 during experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Immunol Lett.* 1998;61(2-3):89-95.
80. Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA, Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT, et al. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol.* 2009;104(3):238-46.
81. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.* 2004;38(7):943-50.
82. Kuptsov VV. [Various methodological aspects of the study of morbidity with temporary disability among farm workers]. *Sov Zdravookhr.* 1977(8):41-4.
83. Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med (Berl).* 1997;75(11-12):901-20.
84. Petersen CA, Krumholz KA, Burleigh BA. Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1beta-dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2005;73(10):6974-80.

85. Olbrich HG. [Epidemiology-etiology of dilated cardiomyopathy]. *Z Kardiol.* 2001;90 Suppl 1:2-9.
86. Bocchi EA, Arias A, Verdejo H, Diez M, Gómez E, Castro P, et al. The reality of heart failure in Latin America. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(11):949-58.
87. Everitt MD, Sleeper LA, Lu M, Canter CE, Pahl E, Wilkinson JD, et al. Recovery of echocardiographic function in children with idiopathic dilated cardiomyopathy: results from the pediatric cardiomyopathy registry. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(14):1405-13.
88. İrdem A, Başpınar O, Kervancioğlu M, Kılınç M. Intracardiac thrombus in children with dilated cardiomyopathy. *Türk Kardiyol Dern Ars.* 2014;42(2):161-7.
89. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1994;331(23):1564-75.
90. Spotnitz MD, Lesch M. Idiopathic dilated cardiomyopathy as a late complication of healed viral (Coxsackie B virus) myocarditis: historical analysis, review of the literature, and a postulated unifying hypothesis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2006;49(1):42-57.
91. Yajima T, Knowlton KU. Viral myocarditis: from the perspective of the virus. *Circulation.* 2009;119(19):2615-24.
92. Helin M, Savola J, Lapinleimu K. Cardiac manifestations during a Coxsackie B5 epidemic. *Br Med J.* 1968;3(5610):97-9.
93. Dos Reis FJ, de Sousa TA, Oliveira MS, Dantas N, Silveira M, Braghiroly MI, et al. Is hepatitis C virus a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy? A systematic review of literature. *Braz J Infect Dis.* 2006;10(3):199-202.
94. Wexler RK, Elton T, Pleister A, Feldman D. Cardiomyopathy: an overview. *Am Fam Physician.* 2009;79(9):778-84.
95. Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1101-10.

96. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(12).
97. Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(1):a004903.
98. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol.* 1982;95(2 Pt 1):369-77.
99. Israeli-Rosenberg S, Manso AM, Okada H, Ross RS. Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circ Res.* 2014;114(3):572-86.
100. Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res.* 2000;46(2):225-38.
101. Diwan A, Dibbs Z, Nemoto S, DeFreitas G, Carabello BA, Sivasubramanian N, et al. Targeted overexpression of noncleavable and secreted forms of tumor necrosis factor provokes disparate cardiac phenotypes. *Circulation.* 2004;109(2):262-8.
102. Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1995;30(4):537-43.
103. Chen K, Mehta JL, Li D, Joseph L, Joseph J. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res.* 2004;95(12):1167-73.
104. Dell'Italia LJ, Meng QC, Balcells E, Wei CC, Palmer R, Hageman GR, et al. Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart. Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces. *J Clin Invest.* 1997;100(2):253-8.

105. Ergul A, Walker CA, Goldberg A, Baicu SC, Hendrick JW, King MK, et al. ET-1 in the myocardial interstitium: relation to myocyte ECE activity and expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(6):H2050-6.
106. Spinale FG. Novel approaches to retard ventricular remodeling in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 1999;1(1):17-23.
107. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569-82.
108. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101(25):2981-8.
109. Timonen P, Magga J, Risteli J, Punnonen K, Vanninen E, Turpeinen A, et al. Cytokines, interstitial collagen and ventricular remodelling in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2008;124(3):293-300.
110. Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol*. 1987;10(11):665-70.
111. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999;341(17):1276-83.
112. Karpiński Ł, Witkowska M. [Postinfarction cardiac remodeling--clinical consequences]. *Przegl Lek*. 2009;66(7):380-3.
113. Saini-Chohan HK, Hatch GM. Biological actions and metabolism of currently used pharmacological agents for the treatment of congestive heart failure. *Curr Drug Metab*. 2009;10(3):206-19.
114. Adams KF. Introduction: biomarkers in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2010;15(4):249-50.
115. Garza MA, Wason EA, Zhang JQ. Cardiac remodeling and physical training post myocardial infarction. *World J Cardiol*. 2015;7(2):52-64.

116. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1285-342.
117. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res.* 2000;46(2):250-6.
118. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation.* 2013;128(4):388-400.
119. Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;30(4):604-10.
120. Koshy SK, Reddy HK, Shukla HH. Collagen cross-linking: new dimension to cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2003;57(3):594-8.
121. Higuchi ML, Fukasawa S, De Brito T, Parzianello LC, Bellotti G, Ramires JA. Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. *Heart.* 1999;82(3):279-85.
122. Nunes VL, Ramires FJ, Pimentel WeS, Fernandes F, Ianni BM, Mady C. The role of storage of interstitial myocardial collagen on the overlife rate of patients with idiopathic and Chagasic dilated cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(6):757-62.
123. GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962;48:1014-22.
124. Teronen O, Salo T, Konttinen YT, Rifkin B, Vernillo A, Ramamurthy NS, et al. Identification and characterization of gelatinases/type IV collagenases in jaw cysts. *J Oral Pathol Med.* 1995;24(2):78-84.
125. Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem.* 2012;47(1):27-58.
126. Rosano GM, Vitale C, Silvestri A, Fini M. Metabolic and vascular effect of progestins in post-menopausal women. Implications for cardioprotection. *Maturitas.* 2003;46 Suppl 1:S17-29.

127. Friart A, Stamatakis L, Philippart C. Doppler evaluation of left ventricular filling: effect of verapamil on non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 1990;11(9):839-44.
128. Cauwe B, Martens E, Sagaert X, Dillen C, Geurts N, Li S, et al. Deficiency of gelatinase B/MMP-9 aggravates lpr-induced lymphoproliferation and lupus-like systemic autoimmune disease. *J Autoimmun*. 2011;36(3-4):239-52.
129. Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, Mori H, Okada A, Seiki M. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J Biol Chem*. 1999;274(48):34260-6.
130. Kojima S, Itoh Y, Matsumoto S, Masuho Y, Seiki M. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Lett*. 2000;480(2-3):142-6.
131. Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, et al. Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*. 2004;279(10):8592-601.
132. Geurtsen GJ, van Heugten CM, Martina JD, Rietveld AC, Meijer R, Geurts AC. A prospective study to evaluate a residential community reintegration program for patients with chronic acquired brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2011;92(5):696-704.
133. Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM. Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1528(2-3):61-73.
134. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*. 1990;348(6303):699-704.
135. Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem*. 2001;276(13):10134-44.

136. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 1995;375(6528):244-7.
137. Mazzone M, Baldassarre M, Beznoussenko G, Giacchetti G, Cao J, Zucker S, et al. Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 26):6275-87.
138. Saad F. Androgen Deprivation Therapy in Prostate Cancer: Looking Beyond Prostate-specific Antigen and Testosterone Levels. *Eur Urol*. 2014.
139. Seizer P, Gawaz M, May AE. Cyclophilin A and EMMPRIN (CD147) in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2014;102(1):17-23.
140. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol*. 2007;83(3):283-95.
141. Joghetaei N, Stein A, Byrne RA, Schulz C, King L, May AE, et al. The Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN, CD147) - a potential novel target in atherothrombosis prevention? *Thromb Res*. 2013;131(6):474-80.
142. Levick SP, Brower GL. Regulation of matrix metalloproteinases is at the heart of myocardial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(4):H1375-6.
143. Minond D, Lauer-Fields JL, Cudic M, Overall CM, Pei D, Brew K, et al. The roles of substrate thermal stability and P2 and P1' subsite identity on matrix metalloproteinase triple-helical peptidase activity and collagen specificity. *J Biol Chem*. 2006;281(50):38302-13.
144. Schenk S, Quaranta V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol*. 2003;13(7):366-75.
145. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(1):3-19.
146. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006;69(3):562-73.

147. Kondo S, Shukunami C, Morioka Y, Matsumoto N, Takahashi R, Oh J, et al. Dual effects of the membrane-anchored MMP regulator RECK on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 5):849-57.
148. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell.* 2001;107(6):789-800.
149. Murphy G, Knäuper V, Lee MH, Amour A, Worley JR, Hutton M, et al. Role of TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) in pericellular proteolysis: the specificity is in the detail. *Biochem Soc Symp.* 2003(70):65-80.
150. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):55-71.
151. Dormán G, Cseh S, Hajdú I, Barna L, Kónya D, Kupai K, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors: a critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility. *Drugs.* 2010;70(8):949-64.
152. Li H, Xu H, Liu S. Toll-like receptors 4 induces expression of matrix metalloproteinase-9 in human aortic smooth muscle cells. *Mol Biol Rep.* 2011;38(2):1419-23.
153. Opdenakker G. New insights in the regulation of leukocytosis and the role played by leukocytes in septic shock. *Verh K Acad Geneeskde Belg.* 2001;63(6):531-8; discussion 8-41.
154. Gao CQ, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, Csont T, Wozniak M, Ferdinandy P, et al. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2003;57(2):426-33.
155. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol.* 2007;152(2):189-205.

156. Geurts N, Opdenakker G, Van den Steen PE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacol Ther.* 2012;133(3):257-79.
157. Gutierrez FR, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, et al. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis.* 2008;197(10):1468-76.
158. Frith MC, Pheasant M, Mattick JS. The amazing complexity of the human transcriptome. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(8):894-7.
159. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853-8.
160. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
161. Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. The role of microRNAs in cancer. *Yale J Biol Med.* 2006;79(3-4):131-40.
162. Sotiropoulou G, Pampalakis G, Lianidou E, Mourelatos Z. Emerging roles of microRNAs as molecular switches in the integrated circuit of the cancer cell. *RNA.* 2009;15(8):1443-61.
163. Costa A, Osório C, Dias S. MicroRNA expression profiling in bone marrow: implications in hematological malignancies. *Biotechnol J.* 2009;4(1):88-97.
164. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(5):376-85.
165. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):271-82.
166. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120(1):15-20.

167. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):597-610.
168. Krol J, Busskamp V, Markiewicz I, Stadler MB, Ribi S, Richter J, et al. Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell.* 2010;141(4):618-31.
169. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science.* 2007;316(5824):575-9.
170. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2772-86.
171. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2007;100(3):416-24.
172. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2007;13(5):613-8.
173. Abdellatif M. Differential expression of microRNAs in different disease states. *Circ Res.* 2012;110(4):638-50.
174. Mishra PK, Tyagi N, Kundu S, Tyagi SC. MicroRNAs are involved in homocysteine-induced cardiac remodeling. *Cell Biochem Biophys.* 2009;55(3):153-62.
175. Yan W, Zhang W, Sun L, Liu Y, You G, Wang Y, et al. Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. *Brain Res.* 2011;1411:108-15.
176. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
177. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.

178. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*. 2010;50(4):237-43.
179. Maciel BC, de Almeida Filho OC, Schmidt A, Marin-Neto JA. Ventricular function in Chagas' heart disease. *Sao Paulo Med J*. 1995;113(2):814-20.
180. Mady C, Ianni BM, Arteaga E, Salemi VM, Silva PR, Cardoso RH, et al. [Maximal functional capacity and diastolic function in patients with cardiomyopathy due to Chagas' disease without congestive heart failure]. *Arq Bras Cardiol*. 1997;69(4):237-41.
181. Rassi DoC, Vieira ML, Arruda AL, Hotta VT, Furtado RG, Rassi DT, et al. Echocardiographic parameters and survival in Chagas heart disease with severe systolic dysfunction. *Arq Bras Cardiol*. 2014;102(3):245-52.
182. Nakamura T, Kodama Y, Takano H, Umetani K, Fujioka D, Saito Y, et al. Increase in circulating levels of adiponectin after treatment with statin and fibrate in patients with coronary artery disease and hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2007;193(2):449-51.
183. de Pinho RT, da Silva WS, de Castro Côrtes LM, da Silva Vasconcelos Sousa P, de Araujo Soares RO, Alves CR. Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by Trypanosoma cruzi-infected macrophages. *Exp Parasitol*. 2014;147:72-80.
184. Javed Q, Murtaza I. Therapeutic potential of tumour necrosis factor- α antagonists in patients with chronic heart failure. *Heart Lung Circ*. 2013;22(5):323-7.
185. Deschamps AM, Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res*. 2006;69(3):666-76.
186. Bradham WS, Bozkurt B, Gunasinghe H, Mann D, Spinale FG. Tumor necrosis factor- α and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective. *Cardiovasc Res*. 2002;53(4):822-30.
187. Bradham WS, Moe G, Wendt KA, Scott AA, Konig A, Romanova M, et al. TNF- α and myocardial matrix metalloproteinases in heart failure:

relationship to LV remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(4):H1288-95.

188. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Pusalkar P, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):372.

189. Rizzi E, Castro MM, Fernandes K, Barbosa F, Arisi GM, Garcia-Cairasco N, et al. Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension. *Arch Toxicol*. 2009;83(5):439-49.

190. Matsumoto Y, Park IK, Kohyama K. Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy. *J Immunol*. 2009;183(7):4773-81.

191. Fares RC, Gomes JeA, Garzoni LR, Waghahi MC, Saraiva RM, Medeiros NI, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are differentially expressed in patients with indeterminate and cardiac clinical forms of Chagas disease. *Infect Immun*. 2013;81(10):3600-8.

192. Okamoto EE, Sherbuk JE, Clark EH, Marks MA, Gandarilla O, Galdos-Cardenas G, et al. Biomarkers in Trypanosoma cruzi-infected and uninfected individuals with varying severity of cardiomyopathy in Santa Cruz, Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):e3227.

193. Bautista-López NL, Morillo CA, López-Jaramillo P, Quiroz R, Luengas C, Silva SY, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 as diagnostic markers in the progression to Chagas cardiomyopathy. *Am Heart J*. 2013;165(4):558-66.

194. Kitaoka H, Kubo T, Okawa M, Hayato K, Yamasaki N, Matsumura Y, et al. Impact of metalloproteinases on left ventricular remodeling and heart failure events in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J*. 2010;74(6):1191-6.

195. Sundström J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, et al. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical

cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004;109(23):2850-6.

196. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*. 2007;211(1):19-26.

197. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol*. 2007;213(2):355-64.

198. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.

199. Mochizuki H, Murphy CJ, Brandt JD, Kiuchi Y, Russell P. Altered stability of mRNAs associated with glaucoma progression in human trabecular meshwork cells following oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(4):1734-41.

200. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer: commentary re: A. C. Lockhart et al., Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 9: 00-00, 2003. *Clin Cancer Res*. 2003;9(2):551-4.

201. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(2):197-250.

202. Aharinejad S, Krenn K, Paulus P, Schäfer R, Zuckermann A, Grimm M, et al. Differential role of TGF-beta1/bFGF and ET-1 in graft fibrosis in heart failure patients. *Am J Transplant*. 2005;5(9):2185-92.

203. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation*. 2000;102(16):1944-9.

204. Webb CS, Bonnema DD, Ahmed SH, Leonardi AH, McClure CD, Clark LL, et al. Specific temporal profile of matrix metalloproteinase release occurs

in patients after myocardial infarction: relation to left ventricular remodeling. *Circulation*. 2006;114(10):1020-7.

205. Lambert JM, Lopez EF, Lindsey ML. Macrophage roles following myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2008;130(2):147-58.

206. Cheung CT, Deisher TA, Luo H, Yanagawa B, Bonigut S, Samra A, et al. Neutralizing anti-4-1BBL treatment improves cardiac function in viral myocarditis. *Lab Invest*. 2007;87(7):651-61.

207. Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15575-80.

208. Milei J, Storino R, Fernandez Alonso G, Beigelman R, Vanzulli S, Ferrans VJ. Endomyocardial biopsies in chronic chagasic cardiomyopathy. Immunohistochemical and ultrastructural findings. *Cardiology*. 1992;80(5-6):424-37.

209. Zavadzkas JA, Plyler RA, Bouges S, Koval CN, Rivers WT, Beck CU, et al. Cardiac-restricted overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer causes myocardial remodeling and dysfunction in aging mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(4):H1394-402.

210. Reddy VS, Prabhu SD, Mummidi S, Valente AJ, Venkatesan B, Shanmugam P, et al. Interleukin-18 induces EMMPRIN expression in primary cardiomyocytes via JNK/Sp1 signaling and MMP-9 in part via EMMPRIN and through AP-1 and NF-kappaB activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(4):H1242-54.

211. Nogueira LG, Santos RH, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, Bocchi EA, et al. Myocardial gene expression of T-bet, GATA-3, Ror- γ t, FoxP3, and hallmark cytokines in chronic Chagas disease cardiomyopathy: an essentially unopposed TH1-type response. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:914326.

212. Peterson JT, Li H, Dillon L, Bryant JW. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc Res.* 2000;46(2):307-15.
213. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74(2):111-22.
214. Spinale FG, Villarreal F. Targeting matrix metalloproteinases in heart disease: lessons from endogenous inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2014;90(1):7-15.
215. Moore L, Fan D, Basu R, Kandam V, Kassiri Z. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2012;17(4-5):693-706.
216. Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTiernan CF. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation.* 1998;98(17):1728-34.
217. Li H, Simon H, Bocan TM, Peterson JT. MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE- and MMP-inhibition. *Cardiovasc Res.* 2000;46(2):298-306.
218. Siddesha JM, Valente AJ, Sakamuri SS, Yoshida T, Gardner JD, Somanna N, et al. Angiotensin II stimulates cardiac fibroblast migration via the differential regulation of matrixins and RECK. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;65:9-18.
219. Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTiernan CF, Draviam R, Watkins SC, et al. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(23):12746-51.
220. Dixon IM, Ju H, Reid NL, Scammell-La Fleur T, Werner JP, Jasmin G. Cardiac collagen remodeling in the cardiomyopathic Syrian hamster and the effect of losartan. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(7):1837-50.

221. Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M. Regression of hypertrophied rat pulmonary arteries in organ culture is associated with suppression of proteolytic activity, inhibition of tenascin-C, and smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res.* 1999;84(10):1223-33.
222. Sutherland K, Mahoney JR, Coury AJ, Eaton JW. Degradation of biomaterials by phagocyte-derived oxidants. *J Clin Invest.* 1993;92(5):2360-7.
223. Maquart FX, Pickart L, Laurent M, Gillery P, Monboisse JC, Borel JP. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺. *FEBS Lett.* 1988;238(2):343-6.