

Participação de metaloproteínas (MMP) no processo de regressão espontânea da fibrose cardíaca e de músculo esquelético de *Calomys callosus* infectado por *Trypanosoma cruzi*

Participation of metalloproteinases (MMP) in the process of spontaneous regression of cardiac and skeletal muscle fibrosis in Calomys callosus infected with Trypanosoma cruzi.

Isis Fernandes Magalhães-Santos¹, Sonia Gumes Andrade (*in memoriam*)²

¹Doutora em Patologia Humana, Professora do Centro Universitário UniFTC, BA; ²Médica, Doutora em Patologia Humana, Instituto Gonçalo Moniz, Professora Emérita do Curso de Medicina da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Resumo

Introdução: a doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é um grave problema de saúde pública na América Latina, afetando milhões de pessoas. O *Calomys callosus*, um roedor, reservatório natural da espécie *T. cruzi*, tem sido visto como um modelo animal importante para o estudo da patogênese da doença de Chagas. A fibrose cardíaca, uma das principais complicações da doença em humanos, caracterizada pela deposição excessiva de colágeno no miocárdio, leva à disfunção cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva. **Objetivo:** avaliar a participação de metaloproteínas na modulação da fibrose cardíaca e no músculo esquelético do *C. callosus* infectado com a cepa colombiana do *Trypanosoma cruzi*. **Metodologia:** foram utilizados casos representativos referentes a estudos anteriores com fragmentos de coração e músculo esquelético de *C. callosus* infectados com a cepa colombiana do *T. cruzi* nos períodos correspondentes aos dias 15^o, 20^o, 25^o, 35^o, 45^o e 65^o para realização de imunomarcagem de metaloproteínas MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9. **Resultados:** foram verificados depósitos mais evidentes de MMP-2, variando de discretos a moderados, com distribuição focal e difusa no miocárdio e distribuição intensa e difusa no músculo esquelético no 25^o e no 35^o dia de infecção. A MMP-9, no coração e no músculo esquelético, apresentou depósitos intensos e difusos a partir do 15^o dia de infecção, quando comparada à MMP-1, que apresentou depósitos discretos e focais no 25^o dia de infecção e a MMP-3, sem marcações relevantes. **Conclusão:** os resultados sugerem que o *C. callosus* infectado pode estar desencadeando mecanismos de modulação de reparo tecidual de forma precoce.

Palavras-chave: *Calomys callosus*; *Trypanosoma cruzi*; fibrose; metaloproteínas.

Abstract

Introduction – Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a serious public health problem in Latin America, affecting millions of people. *Calomys callosus*, a rodent and natural reservoir of the species *T. cruzi*, has been recognised as an important animal model for the study of the pathogenesis of Chagas disease. Cardiac fibrosis, one of the main complications of the disease in humans, is characterised by excessive deposition of collagen in the myocardium, which leads to cardiac dysfunction and congestive heart failure. **Objective** – to evaluate the participation of metalloproteinases in the modulation of cardiac and skeletal muscle fibrosis in *C. callosus* infected with the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*. **Methodology** – representative cases from previous studies were used with fragments of heart and skeletal muscle of *C. callosus* infected with the Colombian strain of *T. cruzi*, on days 15th, 20th, 25th, 35th, 45th and 65th to perform immunostaining of metalloproteinases MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MMP-9. **Results** – more evident deposits of MMP-2 were observed, ranging from mild to moderate, with focal and diffuse distribution in the myocardium and intense and diffuse distribution in skeletal muscle on days 25th and 35th days of infection. MMP-9, in the heart and skeletal muscle, presented intense and diffuse deposits from day 15th day of infection compared to MMP-1, which showed mild and focal deposits on day 25th day of infection, and MMP-3 exhibited no relevant markings. **Conclusion** – the results suggest that infected *C. callosus* may be triggering early tissue repair modulation mechanisms.

Keywords: *Calomys callosus*; *Trypanosoma cruzi*; Fibrosis; Metalloproteinases.

INTRODUÇÃO

Calomys callosus Renger 1830 (Rodentia, Cricetidae) é um roedor descrito como reservatório natural de cepas silvestres do protozoário *Trypanosoma cruzi*¹

e, apesar de poucos relatos na literatura, essa espécie vem sendo utilizada como modelo experimental para o estudo da patogenia da doença de Chagas²⁻⁴.

Estudos prévios têm demonstrado que o *Calomys callosus* infectado com diferentes cepas da espécie *T. cruzi* apresenta um quadro evolutivo da infecção, acompanhado do aumento da parasitemia, com alterações características da miocardite chagásica, que

Correspondente, corresponding: *Isis Fernandes Magalhães Santos – End: UniFTC, Av. Luís Viana Filho, 8812 – Paralela, Salvador – BA, 41741-590, Coordenação do Curso de Farmácia – E-mail: isantos.ssa@ftc.edu.br

evoluem rapidamente, sem haver, contudo, registros de mortalidade durante o período experimental. Interessantemente, durante o curso da infecção, observa-se que a parasitemia é controlada pelo hospedeiro, tornando-se negativa em torno de 40 dias de infecção, e as lesões fibrótico-inflamatórias começam a ser moduladas espontaneamente, também nessa fase^{3,5,6}.

Estudos prévios com esse modelo⁷ demonstraram que, embora exista um padrão de alterações histopatológicas distintas durante a infecção determinada por diferentes cepas, o perfil de resposta imune, referente ao controle parasitário e à resolução das lesões teciduais, não se modifica nos diferentes grupos.

Uma pesquisa de caráter comparativo entre camundongo e *C. callosus* infectados com a cepa F da espécie *T. cruzi* mostrou que ambos os modelos não apresentam o mesmo padrão tecidual de resposta à infecção⁶. Nesse estudo⁶ foi observado que as lesões miocárdicas apresentam alterações histopatológicas distintas durante o curso da infecção, sugerindo que o *Calomys* é um modelo que desenvolve bem um mecanismo imune de adaptação na relação entre parasito e hospedeiro, o que o torna um importante reservatório do parasito.

Aspectos referentes à resolução da fibrose cardíaca e do músculo esquelético, no *Calomys* infectado com a cepa colombiana da espécie *T. cruzi*, foram avaliados através da imunomarcagem de componentes da matriz extracelular, como colágeno Tipo I, III e IV, laminina e fibronectina⁸. Os achados demonstraram que esses componentes matriciais estão presentes nas diferentes fases evolutivas da fibrose, e a degradação dessa matriz ocorre rápida e espontaneamente, independentemente das espécies de colágeno presentes. Esses aspectos, entretanto, diferem no camundongo, pois já foi bem discutido que, nas diferentes fases evolutivas da doença, os depósitos matriciais observados no interstício são distintos, com predomínio de fibronectina na fase inicial da infecção e de laminina e colágeno IV na fase crônica⁹.

Evidentemente, deve-se considerar que esses aspectos fibrogênicos e de fibroclasia estão diretamente ligados à participação de mediadores químicos, como citocinas e fatores de crescimento, os quais contribuem na modulação de uma fibrose^{10,11}.

No modelo do *Calomys callosus*, foi demonstrada a participação de citocinas *in situ*, como interferon gama (IFN-g), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) na imunomodulação das alterações fibrótico-inflamatórias do coração e do músculo esquelético de *C. callosus* infectado com a cepa colombiana do protozoário, bem como no controle da multiplicação do parasito nos tecidos, sugerindo uma forte associação dessas citocinas no processo evolutivo da miocardite chagásica crônica¹², fenômeno já demonstrado anteriormente em estudos com o camundongo^{13,14}.

No modelo experimental do rato infectado por *T. cruzi*, durante o processo de modulação da fibrose miocárdica, foi observado que as mesmas células, que sintetizam esses componentes da matriz cicatricial, são também estimuladas por citocinas a liberar enzimas denominadas colagenases ou metaloproteinases (MMP, *Matrix Metalloproteinase*), que têm a função de clivar moléculas de colágeno, proteoglicanos e elastina, levando à sua desintegração¹⁵.

Estudos *in situ*, referentes ao papel de metaloproteinases no mecanismo de reabsorção da fibrose cardíaca causada pelo parasito, são escassos na literatura. E considerando a capacidade de o *C. callosus* controlar naturalmente essa infecção, pelas evidências de seu potencial de degradação do tecido fibroso durante a infecção, e pelo fato de, até o momento, os estudos referentes à participação das metaloproteinases na modulação da fibrose serem avaliadas por zimografia e sorologia^{16,17}, este trabalho tem como objetivo avaliar, *in situ*, a participação de metaloproteinases na modulação da fibrose cardíaca e no músculo esquelético do *C. callosus* infectado com a cepa colombiana da espécie *T. cruzi*.

METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados blocos de parafina de casos representativos referentes a estudos anteriores com *C. callosus* normais e infectados com a forma tripomastigota da cepa colombiana do protozoário *Trypanosoma cruzi*^{8,18}. E todos os animais, neste estudo prévio, foram manuseados seguindo-se as recomendações do Biotério do Instituto Gonçalo Moniz FIOCRUZ (BA), no ano de 2001. Foram, então, selecionados do acervo do Laboratório de Doença de Chagas Experimental e Imunologia Celular (FIOCRUZ-Ba) blocos de parafina correspondentes a três casos para cada grupo experimental, com fragmentos de coração ou músculo esquelético de *Calomys callosus* normais e infectados, avaliados no período de 15, 20, 25, 35, 45 e 65 dias de infecção, para realização de imunomarcagem *in situ* e detecção de metaloproteinases (MMPs).

Anticorpos

Foram eles: Goat anti-human MMP-1 (C-18), Rabbit anti-human MMP-2 (H-76), Goat anti-human MMP-3 (C-19) e Rabbit anti-human MMP-9 (H129) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Goat anti-Rabbit IgG peroxidase, Rabbit anti-Goat IgG peroxidase e Rabbit anti-mouse IgG conjugado a peroxidase (SIGMA).

Imunohistoquímica

Lâminas pré-tratadas com Poly-L-lisina (SIGMA), que continham cortes de coração ou de músculo es-

quelético, foram desparafinizadas sequencialmente em xilol, acetona e álcool e tratadas com tampão citrato (pH 6.0), em micro-ondas, para exposição antigênica. A peroxidase endógena foi bloqueada em metanol com água oxigenada a 3%. Em seguida, foi realizado um segundo bloqueio de ligações inespecíficas com leite desnatado diluído a 10% em PBS, seguindo-se a adição dos respectivos anticorpos primários anti-MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9), diluídos nesse mesmo tampão de bloqueio (1:1000) e incubados, durante a noite, a 4 °C. Como anticorpos secundários, foram utilizados anticorpos anti-coelho e anti-cabra, conjugados à peroxidase, para detecção de anticorpos anti MMP-2 e MMP-9 (produzidos em coelho) e anticorpos anti MMP-1 e MMP-3 (produzidos em cabra), respectivamente, todos diluídos 1:1000 em tampão de bloqueio. Todas as diluições dos anticorpos foram previamente padronizadas. Para a revelação, foi utilizado, como substrato, 3,3' tetrahidrocloro diaminobenzidina (DAB), diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7.4, contendo H₂O₂ (0,1%) e 1% de dimethylsulfoxide (DMSO). As lâminas foram contrainformadas com Metil Green a 1% e montadas com bálsamo do Canadá para avaliação em microscópio ótico.

A distribuição de marcação de MMPs no coração e no músculo esquelético, visualizadas nos campos microscópicos, foram graduadas subjetivamente como leve (+), moderada (++) e intensa (+++), usando-se parâmetros histopatológicos pré-estabelecidos¹⁹, e as lâminas, em triplicata para cada período de infecção, foram avaliadas em duplo cego.

Controle positivo

Foi utilizado, como controle positivo, cortes de placenta de camundongo, pois tem sido demonstrado que diferentes tipos de metaloproteinases estão envolvidas na modulação da matriz extracelular da placenta e do útero de mamíferos, durante a gestação²⁰.

Controle negativo

Para descartar a possibilidade de reações inespecíficas no teste, secções de coração e de músculo esquelético de animais infectados e normais foram selecionadas para histoquímica, excluindo-se a etapa de incubação com anticorpo primário (anti-MMPs) e mantendo-se a etapa de incubação com o anticorpo secundário. Também, para excluir possibilidade de reação inespecífica, foi incluído um outro controle negativo com IgG de camundongo (inespecífica), uma vez que não há disponibilidade de IgG de *C. callosus* no mercado.

Critérios éticos

Durante o experimento, os animais foram mantidos em condições que atenderam a suas necessidades fisiológicas e comportamentais e monitorados conti-

nuamente para detectar sinais de sofrimento. Quanto ao procedimento de eutanásia, ele foi realizado utilizando-se métodos humanitários, o que compreendeu a aplicação de anestésico injetável, conforme indica Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal CONCEA (2018), que preconiza: “Um método adequado de eutanásia deve garantir a perda da consciência de forma rápida, irreversível e desprovida de experiência emocional ou física desagradável, ou seja, o animal não deve apresentar dor, estresse, apreensão ou ansiedade.”

RESULTADOS

Histopatologia

Como foi previamente descrito em outros estudos realizados pelo presente grupo²⁰, as alterações histopatológicas foram bastante representativas em músculo cardíaco e esquelético na infecção com a cepa colombiana da espécie *T. cruzi* no modelo do *C. callosus*. Observou-se moderado infiltrado inflamatório e lesões necróticas de miocélulas parasitadas entre o 15º e o 20º dia de infecção, principalmente no miocárdio. Entre o 25º e o 30º dia de infecção, as lesões cardíacas evoluíram, apresentando infiltrado de moderado a intenso, difuso e focal, com proliferação de fibroblastos e depósitos de matriz fibrótica. A regressão das lesões fibrótico-inflamatórias ocorreu a partir do 40º dia de infecção. No músculo esquelético, o infiltrado inflamatório permaneceu intenso até o 40º dia de infecção, reduzindo-se no 45º dia, quando foram observados apenas focos isolados de células inflamatórias.

Imunohistoquímica

A partir da análise histopatológica (coração e músculo esquelético), casos representativos (triplicata) de diferentes fases da infecção (dias: 15º, 20º, 25º, 35º, 45º e 65º) e controles foram selecionados para avaliar a presença, *in situ*, das metaloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9), pelo método da imunoperoxidase.

Controle positivo

A placenta apresentou marcação positiva para: MMP-1, com distribuição intersticial; MMP-2, com deposição perivascular; MMP-3, permeando células endoteliais; e MMP-9, presente tanto no interstício como em região perivascular.

Controle negativo

Os controles testados sem a presença do anticorpo primário não apresentaram marcação positiva para as MMPs, confirmando a especificidade dos anticorpos antimetaloproteinases. O teste com a IgG inespecífica de camundongo também não apresentou reação cruzada alguma com o tecido cardíaco e muscular esquelético.

MMP-1

Os controles normais apresentaram resultados negativos no coração e no músculo esquelético. No grupo experimental, foram observados depósitos de MMP-1 apenas a partir do 25º dia de infecção no coração, com imunomarcação positiva em foco isolado no átrio, com aspecto filamentososo e com distribuição intersticial discreta (+). No músculo esquelético, nessa mesma fase, observou-se positividade em foco isolado, em área de necrose com discreto infiltrado inflamatório focal. Nos demais períodos, não foram evidenciadas marcações positivas para MMP-1 (Quadro 1).

MMP-2

Dos controles normais, o coração (Figura 1A) e o músculo esquelético (Figura 1B) apresentaram imunomarcação discreta e em focos perivascularares. Com 15 dias de infecção, observou-se, no miocárdio, discreta (+) marcação positiva em forma de feixes, em foco isolado de necrose. No 25º e 35º dia de infecção, foi observado aumento do depósito da MMP-2, que variava de discreto (+) a moderado (++) com distribuição focal e difusa no miocárdio. Nessa fase, foi identificado apenas um vaso com marcação positiva, de intensidade moderada, em meio a infiltrado inflamatório perivascular discreto, com necrose de fibras e proliferação de fibroblastos. A partir do 40º dia de infecção, não houve marcação positiva para MMP-2 (Figura 2A).

No músculo esquelético, observou-se, com 15 dias de infecção, marcação positiva perivascular e intersticial focal moderada (++) de MMP-2, em áreas de necrose de fibra com infiltrado inflamatório moderado e focal. Em algumas células inflamatórias, foi observada marcação positiva em membrana. Do 20º ao 25º dia de infecção, a distribuição da MMP-2, no músculo esquelético, foi intensa (+++), com distribuição focal e difusa em focos necrótico-inflamatórios, correspondendo a áreas de feixes colagênicos. Também foram observadas células gigantes, com membrana imunomarcada positivamente. A partir do 35º dia de infecção, os depósitos de MMP-2 intersticiais passaram a ser de distribuição moderada (++) e desapareceram completamente no 45º e no 65º dia de infecção, correspondendo a áreas de regressão do tecido fibroso (Figura 2B e Quadro 1).

MMP-3

Quanto aos controles normais, o coração só apresentou marcação positiva em forma de depósitos discretos (+) em região perivascular. E, no músculo esquelético normal, não houve marcação positiva para MMP-3. Quanto aos casos estudados, não se observaram marcações relevantes no miocárdio e no músculo esquelético nos dias 15º, 20º, 25º, 35º, 45º e 65º de infecção, assemelhando-se ao controle normal (Quadro 1).

MMP-9

Quanto aos controles normais, houve marcação positiva perivascular moderada (++) em vasos isolados e também marcação em áreas com colágeno, que normalmente constituem o tecido cardíaco (Figura 1C). E, no músculo esquelético, a MMP-9 foi observada de forma discreta (+) permeando vasos e presente no interstício correspondente a áreas em que, normalmente, se encontra colágeno constituindo o órgão (Figura 1D). O coração e o músculo esquelético dos animais infectados já apresentavam depósitos intensos (+++) de MMP-9, com distribuição difusa a partir do 15º dia de infecção. No coração, a imunomarcação para a MMP-9 foi bem evidente em áreas perivascularares associada a infiltrado inflamatório moderado e difuso. Foram observadas células inflamatórias com marcação intracelular e em membrana. O padrão de marcação acompanha áreas que correspondem a depósitos de colágeno, em focos de necrose de fibras (Figura 2C). Quanto à presença da MMP-9 no músculo esquelético, observou-se marcação positiva perivascular e intersticial intensa (+++) e difusa, que se manteve até o 25º dia de infecção (Quadro 1). No 35º dia de infecção, apesar do infiltrado moderado difuso, a MMP-9 ficou restrita a focos isolados perivascularares permeados por infiltrado inflamatório discreto, assemelhando-se ao padrão normal (Figura 2D). Pôde-se observar também presença de fibroblastos e macrófagos marcados positivamente para a MMP-9 na membrana, e também alguns ninhos isolados que apresentam marcação positiva.

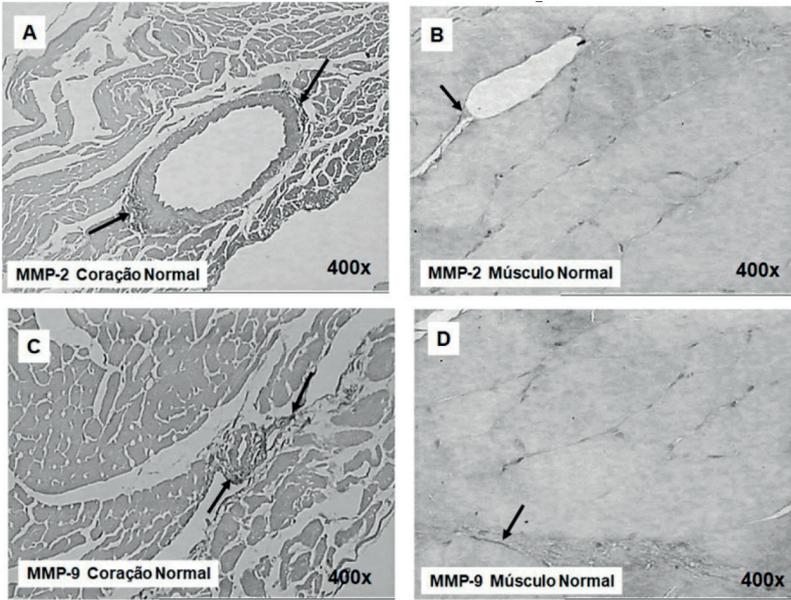
Quadro 1 – Avaliação das metaloproteinases MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9 pelo método da imunoperoxidase em cortes histológicos de coração e músculo esquelético de *Calomys callosus* infectados por *Trypanosoma cruzi*.

TEMPO	ÓRGÃO	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9
15 dias	Coração	-	+ f	-/+ f	+++ d
	Músculo	-	++ f	-	+++ d
20 dias	Coração	-	+ f	-	+++ d
	Músculo	-	+++ d	-	+++ d
25 dias	Coração	+ f	+ /+++ d	-	++ d
	Músculo	+ f	+++ f	+ f	++ f
35 dias	Coração	-	++ d	-	++ f
	Músculo	-	++ f	-	++ f
45 dias	Coração	+ f	-	+ f	++ f
	Músculo	-	-	+ f	-
65 dias	Coração	-	-	-	-
	Músculo	-	-	-	-

Legenda – - não detectado; + discreta detecção; ++ moderada detecção; +++ intensa detecção; f, distribuição focal; d, distribuição difusa¹⁹.

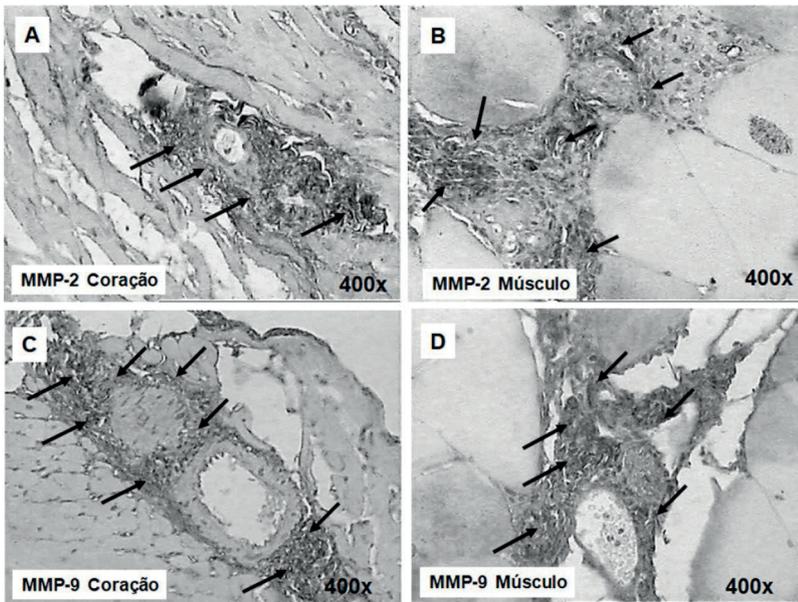
Fonte: dados da pesquisa

Figura 1 – Controles normais para imunomarcção (setas) de metaloproteinases (MMPs) em *Calomys calossus*. **A:** MMP-2 em coração normal; **B:** MMP-2 em músculo esquelético normal; **C:** MMP-9 em coração normal; **D:** MMP-9 em músculo esquelético normal.



Fonte: autoria própria

Figura 2 – Imunomarcção (setas) de metaloproteinases (MMPs) em *Calomys calossus* no 15º dia de infecção por *Trypanosoma cruzi*. **A:** MMP-2 em coração; **B:** MMP-2 em músculo esquelético; **C:** MMP-9 em coração; **D:** MMP-9 em músculo esquelético.



Fonte: autoria própria

DISCUSSÃO

O presente estudo procurou avaliar, *in situ*, a participação de metaloproteinases (MMP) no processo de regressão espontânea da fibrose cardíaca e de músculo esquelético de *Calomys calossus* infectado por *Trypanosoma cruzi*, uma vez que esse roedor silvestre é um hospedeiro tolerante natural à infecção causada pelo protozoário.

Os resultados mostraram que, em diferentes períodos da infecção experimental e do reparo tecidual, as metaloproteinases MMP-1 e MMP-3 foram pouco detectadas pela imunomarcção, apresentando uma deposição leve e focal entre o 25º e o 45º dia de infecção.

No processo de reparo tecidual, existe, inicialmente, um acúmulo de proteínas fibrosantes e depósitos de colágeno, produzidos por fibroblastos, principalmente, que

se dispõem nas áreas da lesão no sentido de reconstituir espaços intersticiais danificados. Nessa fase, verifica-se que o colágeno III é um dos primeiros componentes da matriz a ser depositado no interstício. Na reorganização dessa matriz, os fibroblastos iniciam deposição do colágeno tipo I, considerado importante constituinte da cicatriz e que logo se sobrepõe, em quantidade, aos depósitos de colágeno tipo III, que diminuem gradativamente²¹.

A MMP-1, produzida principalmente por fibroblastos, também é chamada de collagenase 1 e apresenta uma importante função na degradação do colágeno tipo I, o qual corresponde ao maior componente da matriz extracelular. Tem sua síntese aumentada no período após infarto de humanos e porcos e, além disso, é capaz de ter ação enzimática sobre outros tipos de colágeno, como o tipo II e tipo III^{22,23}.

Durante um processo de dano tecidual, a MMP-1 é normalmente secretada por fibroblasto, e células endoteliais, também em estágios mais tardios, na fase de remodelação da cicatrização de feridas, são detectadas em baixas concentrações²⁴. Esses achados corroboram os resultados do presente estudo, no qual foi detectada, de forma discreta, a presença de MMP1 no tecido cardíaco e no músculo esquelético do *C. callosus* com 25 dias e 45 dias de infecção.

Um estudo experimental com ratos, expostos a isquemia-reperfusão miocárdica, foi realizado para avaliar o papel da regulação do TGF- β 1 sobre a expressão de MMP-1, em cultura de miócitos. Os resultados mostraram, inicialmente, que a presença de MMP-1 estava associada à morte de miócitos, de maneira dose-dependente. E quando as células foram tratadas com TGF- β 1, a morte dos miócitos em cultura se reduziu. Diante desses resultados, os autores sugeriram que a inibição da MMP-1 pelo TGF- β 1 pode ser, pelo menos em parte, um importante mecanismo de cardioproteção determinada pelo TGF- β 1²⁵.

Pesquisas anteriores²⁶ já vinham demonstrando que, no modelo do camundongo, nas fases aguda e crônica da infecção por *T. cruzi* no miocárdio, persistem citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, e que, possivelmente, esses fatores podem estar determinando o padrão de resposta celular tecidual, bem como o grau de severidade da infecção.

Na miocardite chagásica, no modelo experimental do *C. callosus*, foi relatada a presença de TGF- β no citoplasma de macrófagos, em áreas de lesões necróticas, até o 45º dia de infecção, diminuindo sua intensidade até o completo desaparecimento por volta do 65º dia, o que se correlacionou com a regressão das lesões miocárdicas¹².

A metaloproteinase 3 (MMP-3), também conhecida como estromelisin-1, é uma enzima multifacetada, que desempenha um papel crucial em diversos processos biológicos, incluindo lesão celular, cicatrização e reparo tecidual. Sua atividade proteolítica é essencial para remodelação da matriz extracelular, migração celular e remoção de *debris* celulares. No entanto, a atividade

excessiva da MMP3 pode ser prejudicial, levando a degradação descontrolada da matriz extracelular, disfunção tecidual e doenças inflamatórias crônicas²⁷.

Em estudo de revisão acerca do papel da MMP-3 na osteoartrite, foi mostrado que a MMP-3 é predominantemente regulada por fatores inflamatórios, tais como TNF- α e Interleucina-1Beta (IL-1 β)²⁸, pois já se discutia previamente que fibroblastos sinoviais tratados com IL-1b apresentavam níveis detectáveis de MMP-3 nos exossomas desses fibroblastos²⁹.

A MMP-3 geralmente está distribuída na parede vascular e em células endoteliais, e tem como substrato o proteoglicano, a fibronectina, a laminina e colágenos tipo III, IV, V, VII, X e XI. Entretanto, a MMP-3 pode estar envolvida na ruptura de plaquetas, durante a formação de placa e ateroma, e ainda funcionar como marcador de doenças cardiovasculares²⁹.

Recentemente, foi demonstrado, no modelo do rato, para diabetes, que a MMP-3 contribui para a lesão vascular, após acidente vascular cerebral, e que a atividade da MMP-3, medida na microvasculatura cerebral, estava significativamente aumentada nesses animais. Isso foi confirmado com a inibição farmacológica da MMP-3, em que houve melhora nos resultados funcionais do animal e redução da lesão vascular³⁰.

No presente estudo, não foram observados comprometimentos vasculares durante o processo de reparo e detecção de MMP-1 e MMP-3 no tecido cardíaco e do músculo esquelético do *C. callosus*. Foram semelhantes ao controle normal, e essa condição leva a discutir a possibilidade da baixa expressão deste zimógeno como um mecanismo de controle do hospedeiro na resolução da fibrose sem comprometimento angiogênico.

Recentemente, foi verificado, em cultura de cardiomiócitos de ratos Wistar³¹, que as expressões de mRNA de metaloproteinases e da proteína solúvel apresentaram perfis distintos de expressão, ou seja, os mRNAs de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-14 foram detectados em cardiomiócitos, embora a transcrição de mRNA e expressão proteica fosse restrita às MMP-2, MMP-9 e MMP-14.

Quando avaliados, no presente estudo, os resultados da imunomarcagem das MMP-2 e MMP-9, os depósitos dessas enzimas, no tecido cardíaco e no músculo esquelético do *C. callosus*, foram mais evidentes, quando comparados às MMP-1 e MMP-3, já discutidas. Os depósitos de MMP-2 e MMP-9 variaram de moderados a intensos entre o 15º e o 45º dia de infecção.

Comparando-se aos achados do estudo realizado com ratos Wistar³⁰, é interessante considerar que o *C. callosus* pode estar ativando esse mesmo mecanismo de controle de transcrição de mRNA para as MMPs de forma precoce, o que pode estar favorecendo a modulação dessa fibrose e o baixo percentual de mortalidade do animal durante o processo de infecção.

Relacionando-se esses achados com o processo fibrótico inflamatório anteriormente descrito no modelo

do *C. callosus* infectado com a cepa Colombiana do *T. cruzi*⁸, a resposta inflamatória e a fibrose presentes no tecido cardíaco e no músculo esquelético do hospedeiro variaram, de moderada a intensa, no período de 24 a 31 dias de infecção. Esse período corresponde com o de maior deposição de MMP-2 e MMP-9 verificada no presente estudo.

As metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 assumem papéis cruciais na migração celular durante a cicatrização de feridas. A MMP-2 atua na proteólise da laminina-5, especialmente na fase prolongada da remodelação, modulando a migração dos queratinócitos, células essenciais para a finalização adequada do processo cicatricial³².

Na doença de Chagas em humanos³³, foram avaliados os níveis séricos de MMPs e sua relação com o TGF- β , e se verificou que os níveis plasmáticos da MMP-9 eram mais elevados que a MMP-2 em pacientes chagásicos crônicos, com ou sem hipertensão associada. E quando foram associadas a MMP-2 e a MMP-9, com a presença do TGF- β , verificou-se uma correlação negativa entre elas, levando à discussão de que o TGF- β pode contrariar o efeito das MMPs no processo de remodelação da matriz extracelular em chagásicos crônicos hipertensos.

Estudo prévio, utilizando citometria de fluxo para avaliar a expressão de MMP-2, MMP-9, IL-1 β , TNF- α , TGF- β e IL-10 em células de pacientes com doença de Chagas e indivíduos não infectados, antes e depois de estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*, revelou que os neutrófilos desempenham um papel significativo na produção de MMPs, enquanto os monócitos são primariamente responsáveis pela produção de citocinas, sugerindo que estimulação com antígenos de *T. cruzi* resulta numa expressão diferencial de MMP-2, que tem uma correlação positiva com IL-10 e negativa com IL-1 β , enquanto a expressão de MMP-9 tem uma correlação negativa com IL-10, aventando possibilidade de que esses antígenos possam regular a expressão de MMPs em neutrófilos e monócitos, especialmente na ausência de alterações cardíacas³⁴.

A infecção causada por *T. cruzi*, no modelo do *C. callosus*, desencadeia uma resposta inflamatória crônica, que culmina em um processo fibrótico intenso no miocárdio e no músculo esquelético, mas que rapidamente regride no período de 45 dias de infecção⁸. A MMP-9 e a MMP-2, diferentemente da MMP-1 e da MMP-3, possivelmente podem estar contribuindo mais diretamente para a degradação dessa matriz fibrótica e a remodelação dos tecidos afetados.

Mas atualmente se discute que o microambiente inflamatório causado pela doença de Chagas possibilita um desequilíbrio na produção, secreção e atividades de MMPs, inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e do TGF- β . A interação dessas moléculas, de diferentes formas, favorece, direta ou indiretamente, tanto na infecção quanto no processo de reparo do tecido cardíaco, causando a fibrose que resulta na cardiopatia chagásica³⁵.

Compreender os mecanismos moleculares pelos quais as MMPs contribuem para a inflamação, a fibrose e a remodelação tecidual na doença de Chagas é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O modelo do *C. callosus*, por apresentar peculiaridades de resolução espontânea dos danos teciduais causados pela infecção, pode abrir possibilidades de novos estudos para a compreensão de possíveis vias de sinalização química do sistema de reparo, ou mesmo identificar moléculas que modulam essa resposta natural na patogênese da doença de Chagas.

CONCLUSÃO

O modelo experimental do *Calomys callosus*, um roedor nativo da América do Sul, é reconhecido como um reservatório natural de cepas silvestres da espécie *T. cruzi*. Esse modelo é notável por sua capacidade de controlar a parasitemia e o processo fibrótico inflamatório, durante a infecção, por meio de mecanismos moleculares, considerando vias de sinalização química, a partir de citocinas anti-inflamatórias e fibrogênicas associadas à produção de metaloproteinases envolvidas na resolução da fibrose tecidual, e que, possivelmente, favorecem a sobrevivência do animal quando infectado.

Como reservatório natural do protozoário *T. cruzi*, os resultados do presente estudo mostraram que a imunomarcagem para MMP-1 apresentou depósitos discretos e focais no 25º dia de infecção. Para a MMP-3, não se observaram marcações relevantes no período estudado. Entretanto, quanto à presença da MMP-2, foi verificado um aumento desse depósito, que variou de discreto a moderado, com distribuição focal e difusa no miocárdio e distribuição intensa e difusa no músculo esquelético, no 25º e no 35º dia de infecção. E a MMP-9, no coração e no músculo esquelético, apresentou depósitos intensos e difusos a partir do 15º dia de infecção. Esses achados corroboram dados da literatura, principalmente em estudo com células humanas, o que favorece o uso do modelo experimental para novas abordagens de investigação de mecanismos de controle e resolução da fibrose miocárdica causada por *T. cruzi*.

Durante a infecção, observou-se que, mesmo quando ocorrem danos no miocárdio sem registros de mortalidade, esses mecanismos moleculares, mediados por citocinas e ativação de MMPs, possivelmente desempenham um papel relevante na resolução da fibrose miocárdica e do músculo esquelético. A fibrose, que inicialmente se manifesta como uma resposta ao dano tecidual, desaparece de forma rápida e gradativa, evidenciando a eficácia dos processos anti-inflamatórios e de reparo tecidual no 15º dia de infecção. Considerando os achados do presente estudo, esse processo natural de imunomodulação da fibrose miocárdica chagásica, torna o *C. callosus* um modelo valioso para o estudo da imunopatogênese dessas lesões, enfatizando o controle desse processo fibrótico inflamatório, o que também o

torna um considerável modelo experimental para a investigação de novas abordagens terapêuticas no tratamento da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

1. Ribeiro RD. Novos reservatórios de *Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Biol. 1973 Jan 01; 33(3):429-537.
2. Borges MM, Mello DA, Teixeira ML. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. Rev Saúde Pública. 1982;16(4):233-42. doi: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101982000400004>
3. Borges MM, Andrade SG, Pilatti CG, Prado Junior JC, Kloetzel JK. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992 Dec; 87(4): 493-502. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000400006>
4. Rosa RB, Costa MSD, Teixeira SC, Castro EFD, Dantas WM, Ferro EAV, et al. *Calomys callosus*: um modelo animal experimental aplicado à investigação de doenças parasitárias de interesse para a saúde pública. Patógenos. 2022 Mar 17;11(639):1-14. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens11030369>
5. Mello DA, Teixeira ML. Nota sobre infecção natural do *Calomys expulsus*, Lund 1841, (Rodentia-Cricetidae). Rev Saúde Pública. 1977 Dec;11(4):561-4. doi: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101977000400012>
6. Borges MM, Mello DA. Infectividade de cepas silvestres de *Trypanosoma cruzi* mantidas em cultura, para *Calomys callosus* (Rodentia) e camundongos albinos. Rev Patol Trop. 1980 jul-dec; 9(3-4):145-51. doi: <https://doi.org/10.5216/rpt.v9i3%20e%204.21338>
7. Andrade SG, Kloetzel JK, Borges MM, Ferrans VJ. Morphological aspects of the myocarditis and myositis in *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Fibrogenesis and spontaneous regression of fibrosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994 Sept;89(3):379-93. doi: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000300017>
8. Magalhães-Santos IF, Lima E, Andrade SG. Fibrogenesis and collagen resorption in the heart and skeletal muscle of *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Immunohistochemical identification of extracellular matrix components. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 July; 97(5):703-10. doi: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500021>
9. Andrade SG, Grimaud JA, Stocker-Guerret S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am Trop Med Hyg. 1989 Mar 1;40(3):252-60. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.252>
10. Kovacs EJ. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. Immun. Today. 1991 Jan;12(1):17-23. doi: [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90107-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90107-5).
11. Slavin J. Review article: The role of cytokines in wound healing. J Pathol. 1996 Jan; 178(1):5-10. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199601\)178:1%3C5::AID-PATH443%3E3.O.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199601)178:1%3C5::AID-PATH443%3E3.O.CO;2-W).
12. Magalhães-Santos IF, Andrade SG. Participação de citocinas nas lesões necróticas-inflamatórias no coração e músculos esqueléticos de *Calomys callosus* infectados por *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Aug;100(5):555-61. doi: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000500017>
13. Lima ES, Andrade ZA, Andrade SG. TNF- α expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Int J Exp Path. 2001 Jan 5;82(6):327-36. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2001.00203.x>
14. Araujo-Jorge TC, Waghbi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi ML, Keramidas M, et al. Implication of transforming growth factor- β 1 in Chagas disease myocardial pathology. J Infect Dis. 2002 Dec 15;186(12):1823-8. doi: <https://doi.org/10.1086/345882>
15. Varo N, Iraburu MJ, Varela M, Lopez B, Etayo JC, Diez J. Chronic AT1 blockade stimulates extracellular collagen type I degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 2000 June;35(6):1197-202. doi: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.35.6.1197>
16. Melo ACN de, Meirelles MNL, Porrozzi R, Costa JD, Branquinho MH, Vermelho AB. Reduced activity of matrix metalloproteinase-9 in *Trypanosoma cruzi* infected mouse embryo hepatocyte cell Hepatol Res. 2004 Jan;28(1):49-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2003.09.002>
17. Fares RCG, Gomes JDAS, Garzoni LR, Waghbi 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 Sept; 16;81(10):3600-8. doi: <https://doi.org/10.1128/iai.00153-13>.
18. Magalhães-Santos IF, Souza MM, Lima CSC, Andrade SG. Infecção de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com cepas de diferentes biotipos de *Trypanosoma cruzi*: patogenicidade, histotropismo e indução de fibrose. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 June;99(4):407-13. doi: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000400011>.
19. Andrade SG. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic cardiomyopathy in mice. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;85:17-27.
20. Xu P, Alfairdy N, Challis JRG. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. J Clin Endocr Metab. 2002 Mar 1;87(3):1353-61. doi: <https://doi.org/10.1210/jcem.87.3.8320>
21. Davidson JM, Benn SI. Regulation of angiogenesis and wound repair: Interactive role of the matrix and growth factors. In: Cellular and Molecular Pathogenesis. Philadelphia: Edited by A.E. Sircica Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 79-107.
22. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1993 Jan;4(2):197-250. doi: <https://doi.org/10.1177/10454411930040020401>.
23. Nielsen SH, Mouton AJ, DeLeon-Pennell KY, Genovese F, Karsdal M, Lindsey ML. Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes. Matrix Biol. 2019 Jan;75-76:43-57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.001>
24. Armstrong DG, Jude EB. O papel das metaloproteínas de matriz na cicatrização de feridas. J Am Podiatr Med Assoc. 2002 Jan;92(1):12-8. doi: <https://doi.org/10.7547/87507315-92-1-12>
25. Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. TGF- β 1 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of upregulation of MMP-1. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 May 1;284(5):H1612-7. doi: <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00992.2002>
26. Zhang L, Tarleton RL. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Exp Parasitol. 1996 Nov; 84(2):203-13. doi: <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0106>

27. Wan J, Zhang G, Li X, Qiu X, Ouyang J, Dai J, et al. Matrix metalloproteinase 3: a promoting and destabilizing factor in the pathogenesis of disease and cell differentiation. *Front Physiol.* 2021 July;12(663978):1-10. doi: 10.3389/fphys.2021.663978
28. Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, Nakamura Y, Nakasa T, Lotz MK, et al. Exossomos de fibroblastos sinoviais estimulados por IL-1 β induzem alterações osteoartríticas nos condrócitos articulares. *Pesq Ter Artrite.* 2014 Aug;16(R163):1-11. doi: <http://arthritis-research.com/content/16/4/R163>
29. Olejarz W, Łacheta D, Kubiak-Tomaszewska G. Matrix metalloproteinases as biomarkers of atherosclerotic plaque instability. *Int J Mol Sci.* 2020 May 31;21(11): 1-20. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21113946>.
30. Abdul Y, Jamil S, Li W, Ergul A. Cerebral microvascular matrix metalloproteinase-3 (MMP3) contributes to vascular injury after stroke in female diabetic rats. *Neurochem Int.* 2023 Jan;105462(162):1-25. doi:10.1016/j.neuint.2022.105462
31. Euler G, Locquet F, Kociszewska J, Osygus Y, Heger J, Schreckenberger R, et al. Matrix metalloproteinases repress hypertrophic growth in cardiac myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2021 Jan;35(2):353-65. doi: <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07138-y>
32. Mäkelä M, Larjava H, Pirilä E, Maisi P, Salo T, Sorsa T, et al. Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratinocytes. *Exp Cell Res.* 1999 Aug;251(1):67-78. doi: <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4564>
33. Bestetti RB, Dellalibera-Joviliano R, Rizzi E, Bonacio GF, Faria-Junior M, Furlan-Daniel R, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with chronic Chagas heart disease and systemic arterial hypertension: correlation with TGF-Beta plasma levels. *Cardiol Res Pract.* 2023 Apr;2023(1):8484697. doi: <https://doi.org/10.1155/2023/8484697>
34. Medeiros IN, Mattos T, Fares RCG, Chaves AT, Franco EP, Nunes MCP, et al. Expressão diferencial de metaloproteinases de matriz 2, 9 e citocinas por neutrófilos e monócitos nas formas clínicas da doença de Chagas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(1): e0005284. doi:10.1371/journal.pntd.0005284
35. Costa AWF da, Carmo Neto JR do, Braga YLL, Silva BA, Lamounier AB, Silva BO, et al. Cardiac Chagas disease: MMPs, TIMPs, galectins, and TGF- β as tissue remodelling players. *Dis Mark.* 2019 Nov; 2019(1):3632906. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/3632906>

SUBMISSÃO: 31/05/2025

ACEITE: 15/05/2025