Aline Siqueira Bossa

**Patogênese da endomiocardiofibrose: perfil
imunológico e análise proteômica de tecido cardíaco**

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

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bossa, Aline Siqueira

Patogênese da endomiocardiofibrose : perfil imunológico e análise proteômica
de tecido cardíaco / Aline Siqueira Bossa. -- São Paulo, 2013.

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

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Edecio Cunha Neto.

Descritores: 1. Fibrose endomiocárdica 2. Insuficiência cardíaca 3. Doenças negligenciadas 4. Inflamação 5. Resposta de fase aguda 6. Citocinas/análise 7. Eosinofilia 8. Imunoglobulina E 9. Proteômica 10. Espectrometria de massas 11. Matriz extracelular 12. Estudos retrospectivos

USP/FM/DBD-000/13

Dedico esta dissertação a todos os pacientes com endomiocardiofibrose e as três pessoas mais importantes da minha vida: aos meus pais, Nely Siqueira e Luiz Bossa por sempre terem estado ao meu lado me incentivando a seguir e ao meu verdadeiro amor, Max Aveiro, pela eterna paciência, companhia, amizade, carinho.

Obrigada por tudo. Amo vocês.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Edecio Cunha Neto, a quem eu admiro como pessoa e pesquisador, por ter me dado um voto de confiança e a oportunidade de realizar um projeto no qual tanto me identifiquei com a causa e no qual pude adquirir maturidade profissional e científica. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com um grupo de pesquisadores tão importante para a ciência em nosso país. Agradeço pela orientação, pelos seus ensinamentos, por sua paciência e compreensão.

Agradeço a Prof^a. Dra Vera Maria Cury Salemi, minha co-orientadora, pelo imenso suporte oferecido nesse projeto, pela confiança em mim depositada, por acreditar nesse trabalho, por se dedicar tanto aos pacientes com endomiocardiofibrose, além de todo o apoio pessoal e profissional. Obrigada pelas correções, conselhos e pela disponibilidade em me auxiliar nessa fase.

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Kalil por todas as discussões, críticas e sugestões, pelo apoio técnico-científico e financeiro durante o desenvolvimento desse trabalho. Com certeza, um grande exemplo de pesquisador.

A equipe de Miocardiopatias e a equipe de cirurgias do Instituto do Coração, principalmente ao Dr Ricardo Dias, pela ajuda na obtenção das amostras para esse estudo e ao Dr Luiz Benvenuti, do setor de Anatomia Patológica, por disponibilizar fotos dos cortes histopatológicos para esta dissertação.

Agradeço a Dra Ludmila R. P. Ferreira, pelas contribuições científicas e sua boa vontade em ajudar desde sua entrada no laboratório. Sua participação foi fundamental para conclusão dessa pesquisa. Obrigada!

A equipe do Laboratório de Espectrometria de Massas – Instituto Butantan, em especial, a Dra Júlia Cunha, quem muito contribuiu para os dados proteômicos apresentados nesse trabalho e por suas opiniões muito pertinentes, e a equipe do Laboratório de Sorologia, Setor de Hematologia do Hospital das Clínicas/FMUSP, principalmente a Dra Ester Sabino e Suzete Spina Lombardi.

A equipe do Laboratório de Análises Clínicas do InCor, pelas dosagens de proteína C reativa e a Comissão Científica pela ajuda na elaboração dos termos de

consentimento, pelo esclarecimento de dúvidas e pela análise científica e ética do projeto.

Aos colegas do LIM60, pelas discussões sempre enriquecedoras, especialmente a Dra Cristina Kokron, Carlos Palma pela ajuda com as análises de imunoglobulinas, a Dra Susan Ribeiro e Prof^a Dra Daniela Santoro, da Universidade Federal de São Paulo, pela ajuda com a citometria de fluxo.

As doutoras Keity Santos, Letícia Labriola e Bárbara Ianni, pelas pertinentes observações em minha qualificação.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Imunologia – InCor, que contribuíram com discussões, apoio técnico e me ensinaram muito do que sei: Carlo Martins, Priscila Teixeira e Andréia Kuramoto.

A todos os amigos que tive a oportunidade de conhecer nesse laboratório, pelo convívio nesses anos, e em especial as minhas queridas Taccyanna “Maria” Mikulski (pela grande paciência em ler minha dissertação e meter “colheres” sempre bem vindas no meu trabalho), Nathália Moreira Santos (*mí compañera de congresos*), Monique Baron, “Ana P” Pacanaro, Janaína Baptista, Priscila Carmona, Karine Marafigo de Amicis, Isabela Navarro e a Dra Rosemeire Aparecida Silva. Agradeço a vocês pelas risadas e conselhos, por acreditarem em mim e me apoiarem nos bons e maus momentos, pelo incentivo, pela companhia sempre bem vinda e pela amizade sincera. Obrigada de coração! A pós-graduação não teria sido a mesma sem a participação de vocês (e eu já sinto saudades).

Ao programa de pós-graduação da Alergia e Imunopatologia, aos amigos da secretaria do InCor, Seu Jair, Gisele e Sônia, e as minhas queridas Raí, Gê e Elaine e ao Washington.

Ao Instituto do Coração e a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por serem referências em ensino e pesquisa e por terem participado do desenvolvimento deste trabalho.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) por permitir que eu me dedicasse exclusivamente a este projeto e divulgasse os resultados em importantes congressos de imunologia.

Aos meus amigos de longa data, Iris Milena, Renan Cardoso, Alessandra Lino e Thais Bonine.

Aos meus familiares, principalmente a minha mãe Nely, ao meu pai Luiz, ao meu padrasto Júnior, aos meus avós Ilda e Nelson, a todos os meus tios – principalmente aos meus padrinhos Nilva e Paulo, as tias Nilene e Nilcéia, e a todas as minhas primas queridas, quero agradecer pelo suporte incondicional e por compartilharem comigo parte dos desafios dessa jornada. Vocês são muito especiais na minha vida. Obrigada por tudo! Faço ainda um agradecimento especial a Prof^a. Delma, minha tia avó, que gentilmente corrigiu essa dissertação.

Ao meu amado Max Aveiro, pelo amor, paciência, dedicação e doação nesses anos, pelo companheirismo nos momentos bons e difíceis, pelo incentivo, por todos os sonhos já compartilhados e vividos e por todos aqueles que lutamos para conquistar. Obrigada por ser quem você é na minha vida.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*Tenho a impressão de ter sido uma criança
brincando a beira-mar, divertindo-me em
descobrir uma pedrinha mais lisa, ou uma concha
mais bonita que as outras, enquanto o imenso
oceano da verdade continua misterioso diante dos
meus olhos*

(Isaac Newton)

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Endomiocardiofibrose: patologia, clínica e epidemiologia.....	1
1.2 Hipóteses etiológicas da endomiocardiofibrose.....	4
1.3 Processos inflamatórios, insuficiência cardíaca e reparo tecidual em outras doenças cardiovasculares.....	8
1.4 Análise proteômica em doenças cardiovasculares.....	11
1.5 Hipótese e justificativa do estudo.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Caracterização da população de estudo.....	17
3.1.1 Critérios para descrição de dados demográficos e clínicos sobre capacidade cardíaca dos pacientes.....	17
3.1.2 Critérios para determinação de eosinofilia em sangue periférico	
3.2 Análises laboratoriais.....	18
3.2.1 Quantificação de imunoglobulina E <i>in vitro</i>	18
3.2.1.1 Amostras de soro.....	18
3.2.1.2 Quantificação de imunoglobulina E total e específica <i>in</i> <i>vitro</i>	19
3.2.1.3 Seleção dos alérgenos testados.....	19
3.2.1.4 Análise estatística dos resultados de IgE total.....	20

3.2.2	Quantificação de citocinas plasmáticas circulantes por Citometria de fluxo.....	20
3.2.2.1	Amostras de plasma.....	20
3.2.2.2	Detecção das citocinas.....	20
3.2.2.3	Procedimentos de análise.....	21
3.2.2.4	Curva padrão.....	21
3.2.2.5	Preparo das <i>beads</i> de captura.....	21
3.2.2.6	Preparo das amostras.....	22
3.2.2.7	Ensaio de CBA.....	22
3.2.2.8	Análise de dados CBA.....	22
3.2.2.9	Análise estatística dos dados das citocinas.....	22
3.2.3	Dosagem de proteína C reativa ultrasensível.....	23
3.2.3.1	Amostras de plasma.....	23
3.2.3.2	Quantificação de PCRus.....	23
3.2.3.3	Análise estatística da quantificação de PCRus.....	23
3.3	Testes estatísticos de associação e correlação entre dados clínicos e laboratoriais.....	24
3.3.1	Testes de correlação estatística.....	24
3.4	Análise proteômica.....	24
3.4.1	Amostras de endomiocárdio de pacientes com EMF.....	24
3.4.2	Preparação das amostras para a extração proteica.....	24
3.4.2.1	Tampão de lise.....	24
3.4.2.2	Procedimento de extração.....	25
3.4.3	Quantificação de proteínas totais.....	25
3.4.4	Eletroforese unidimensional.....	25
3.4.5	Eletroforese bidimensional.....	25
3.4.5.1	Primeira dimensão.....	25
3.4.5.2	Segunda dimensão.....	26
3.4.6	Coloração dos géis.....	26
3.4.7	Aquisição e análise das imagens.....	27
3.4.8	Processamento dos géis.....	27
3.4.9	Análise por espectrometria de massas.....	28

3.4.10	Identificação das proteínas.....	29
3.4.11	Análise funcional de proteínas	29
3.4.12	Análise da expressão de genes em tecido específico.....	30
3.4.13	Análise de redes de vias de sinalização e vias canônicas relacionadas.....	30
4.	RESULTADOS.....	32
4.1	Avaliação de dados clínicos da capacidade cardíaca e laboratoriais sobre resposta inflamatória na endomiocardiofibrose	32
4.1.1	Caracterização da população de estudo: dados demográficos e clínicos dos pacientes com endomiocardiofibrose	32
4.1.2	Dados sobre capacidade e comprometimento cardíaco nos pacientes com endomiocardiofibrose	36
4.1.3	Eosinofilia em sangue periférico em pacientes com endomiocardiofibrose	39
4.1.4	Determinação de citocinas plasmáticas predominantes na endomiocardiofibrose	40
4.1.4.1	Correlação de citocinas	44
4.1.5	Dosagem de proteína C reativa ultrasensível	47
4.1.6	Quantificação de imunoglobulina E total sérica.....	48
4.1.7	Quantificação de imunoglobulina E alérgeno-específico	48
4.2	Análise proteômica	50
4.2.1	Perfil de expressão proteica no tecido acometido pela fibrose em pacientes com endomiocardiofibrose	50
4.2.2	Rede das vias de sinalização relacionadas à endomiocardiofibrose a partir dos dados proteômicos	58
5.	DISCUSSÃO.....	66
5.1	Considerações finais	78
6.	CONCLUSÕES.....	80
7.	ANEXOS.....	83
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Diferenças entre parâmetros da endomiocardiofibrose e síndromes hipereosinofílicas	7
Tabela 2 –	Dados demográficos de pacientes com endomiocardiofibrose	34
Tabela 3 -	Dados clínicos de pacientes com endomiocardiofibrose	37
Tabela 4 –	Perfil de citocinas plasmáticas de pacientes com endomiocardiofibrose	41
Tabela 5 –	Perfil de citocinas plasmáticas nos controlos saudáveis	42
Tabela 6 –	Níveis de IgE específico aos alérgenos testados em pacientes com endomiocardiofibrose	49
Tabela 7-	Proteínas identificadas no tecido fibroso do endomiocárdio de pacientes com endomiocardiofibrose.....	51
Tabela 8 –	Moléculas na rede das principais funções sugeridas pelo Ingenuity	59

Lista de Figuras

Figura 1 -	Aspecto histológico do endomiocárdio de pacientes com endomiocardiofibrose	3
Figura 2 –	Relação entre inflamação, fibrose e insuficiência cardíaca.....	9
Figura 3 –	Marcação imunohistoquímica para α -actina em endomiocárdio de pacientes com endomiocardiofibrose.....	11
Figura 4-	Comorbidades associadas ao grupo de pacientes com endomiocardiofibrose.....	33
Figura 5 –	Menor e maior contagem de eosinófilos no sangue periféricos em pacientes com endomiocardiofibrose.....	39
Figura 6 -	Níveis plasmáticos de citocinas Th1/Th2 de pacientes com endomiocardiofibrose.....	43
Figura 7 –	Correlação dos níveis de IL-6 plasmáticos com os níveis de citocinas pró-inflamatórias na endomiocardiofibrose.....	44
Figura 8 –	Correlação dos níveis de TNF- α , IL-4 e IL-2 plasmáticos com os níveis de citocinas pró-inflamatórias na endomiocardiofibrose.....	45
Figura 9 –	Correlação dos níveis de IL-10 plasmáticos com os níveis de citocinas pró-inflamatórias na endomiocardiofibrose.....	46
Figura 10-	Níveis de proteína C reativa em pacientes com endomiocardiofibrose e indivíduos saudáveis.....	47
Figura 11 -	Níveis de IgE total em soro de pacientes com endomiocardiofibrose e grupo controle.....	48
Figura 12 –	Porcentagem da classificação funcional das proteínas identificadas no tecido cardíaco de pacientes com endomiocardiofibrose.....	58
Figura 13 –	Representação esquemática da rede de relação dos genes codificadores das proteínas identificadas com os principais indutores de expressão	60
Figura 14 -	Principais funções relacionadas com as proteínas identificadas no tecido cardíaco de pacientes com endomiocardiofibrose.....	61
Figura 15 –	Via canônica de resposta de fase aguda.....	62

Figura 16 –	Escala de expressão de genes codificadores de proteínas de fase aguda identificados pela análise proteômica em tecido cardíaco de pacientes com endomiocardiofibrose.....	63
Figura 17 –	Escala de expressão de genes codificadores de proteínas de fase aguda identificados pela análise proteômica em tecido conjuntivo de pacientes com endomiocardiofibrose.....	64

Lista de Abreviaturas

Blotr	<i>Blomia tropicalis</i>
CBA	do inglês <i>cytometric bead-array</i>
Céls	células
CID	dissociação induzida por colisão
CD	do inglês - <i>cluster of differentiation</i>
cols	colaboradores
<i>Cut-off</i>	corte / limiar
CV	cardiovascular
DAI	doenças autoimunes
Derpt	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DDA	aquisição dependente de dados
DTT	ditiotreitol
ECG	eletrocardiograma
ECO	ecocardiografia
ECP	proteína catiônica eosinofílica
EDN	neurotoxina derivada de eosinófilos
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EE	endocardite eosinofílica
EEx	enriquecimento de expressão
EMF	endomiocardiofibrose
EP	eosinofilia periférica
EPO	peroxidase eosinofílica
F	gênero feminino
FA	fibrilação atrial
FcεRI	receptor de alta afinidade para IgE
FE	fração de ejeção
FEIA	fluoroenzimaimunoensaio
Gel 1D	eletroforese em gel unidimensional
Gel 2D	eletroforese em gel bidimensional
GM-CSF	fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC	insuficiência cardíaca
IEF	focalização isoeletrica
IFN γ	interferon gama
IgE	imunoglobulina E
IL	interleucina
IM	insuficiência da valva mitral
IT	insuficiência da valva tricúspide
L	linear
LC-ESI-MS	cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas do tipo <i>Eletrospray</i> (do inglês <i>Liquid chromatography - Electrospray ionization mass spectrometer</i>)
LPS	lipopolissacarídeo

LT	linfócito T
LTQ	do inglês <i>Linear Trap Quadrupole</i>
M	gênero masculino
MBP	proteína básica principal de eosinófilos
MEC	matriz extracelular
mRNA	RNA mensageiro
MS/MS	espectrometria de massas
P	plasma
PCR	proteína C reativa
PCR us	proteína C reativa ultrassensível
PE	phicoeritrina
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
PM	peso molecular
PMF	Impressão digital peptídica (do inglês <i>Peptide Mass Fingerprint</i>)
<i>pool</i>	mistura
Si3	sistema de prontuário médico eletrônico do Instituto do Coração - InCor
SDS-PAGE	eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio – poliacrilamida (do inglês <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SHE	síndrome hipereosinofílica
So	soro
<i>Spot</i>	ponto no gel bidimensional
TC	tecido cardíaco
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFβ	fator de transformação do crescimento beta
Th1	T auxiliador 1 (do inglês - <i>T helper 1</i>)
Th2	T auxiliador 2 (do inglês - <i>T helper 2</i>)
TIGER	Regulação e expressão gênica em tecido específico (do inglês <i>Tissue-specific Gene Expression and Regulation</i>)
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
TPP	do inglês <i>Trans Proteomic Pipeline</i>
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo

Lista de Símbolos

A	Ampêre
mA	miliampere
=	igual a
±	Mais ou menos (desvio padrão)
W	watt
>	maior que
≥	maior ou igual que
<	menor que
≤	menor ou igual que
&	e
%	por cento
~	aproximadamente
...	dado desconhecido
°C	graus Celsius
cm	centímetros
n°	número
N	número amostral
mm	milímetros
mm ³	milímetro cúbico
kUA/l	quilounidade de anticorpo por litro
μl	microlitros
nl	nanolitros
P	Valor de P
-log(P value)	Logaritmo do valor de P
pg	picogramas
mg	miligramas
μg	microgramas
g	giros
gr	gramas
mL	mililitros
min	minutos
seg	segundos
M	mol
mM	mili-mol
m/z	razão massa/carga
kVh	quilowatts por hora
dpi	pontos por polegada (do inglês <i>dots per inch</i>)
Da	Dalton
kDa	quilo-Dalton
ppm	partes por milhão
rcf	força relativa de centrifugação (do inglês <i>relative centrifugal force</i>)
rpm	rotações por minuto
V	volts
x	vezes

Lista de Siglas

CAPPEsq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAT/CEPID	Laboratório de Espectrometria de Massas do Centro de Toxinologia Aplicada – Instituto Butantan
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
InCor	Instituto do Coração
IPA	programa de análise de vias (do inglês <i>Ingenuity pathway analysis</i>)
HC - FMUSP	Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LIM60	Laboratório de Investigação Médica 60
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

Resumo

Bossa AS. Patogênese da endomiocardiofibrose: perfil imunológico e análise proteômica de tecido cardíaco [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A endomiocardiofibrose (EMF) é uma doença típica de países tropicais, na qual ocorre a deposição de uma capa fibrosa na região endomiocárdica com graves consequências clínicas. A patogenia da EMF ainda não foi elucidada, mas uma das principais hipóteses etiológicas sugere que a EMF seja consequência de um processo inflamatório crônico com envolvimento de respostas imunes Th2 pós-infestação helmíntica, mediada por eosinófilos nas fases iniciais da doença. Neste estudo avaliamos o perfil da resposta imune e inflamatória, assim como o perfil de proteínas expressas no endomiocárdio afetado, para compreender melhor os mecanismos envolvidos na patogênese da EMF. **MÉTODOS:** Foram coletadas amostras de plasma e soro de pacientes com diagnóstico de EMF e de indivíduos saudáveis, para dosagens de 6 citocinas plasmáticas do perfil Th1/Th2, Proteína C Reativa ultrasensível (PCRus), IgE total e IgE específico contra aero-alérgenos prevalentes e alérgenos de helmintos. A análise proteômica do endomiocárdio afetado de quatro pacientes com EMF submetidos à ressecção cirúrgica da fibrose, levou à identificação por espectrometria de massas, de proteínas separadas previamente por gel 1D e 2D. Análises *in silico* de vias funcionais e redes ligando as proteínas identificadas também foram realizadas. Eosinofilia em sangue periférico, assim como dados clínicos e ecocardiográficos, foram avaliados retrospectivamente. **RESULTADOS:** Foram selecionados 27 pacientes em estágio avançado da EMF, portadores de disfunção diastólica e/ou valvar. Todas as amostras de plasma analisadas apresentaram níveis detectáveis de pelo menos uma das citocinas avaliadas. As citocinas IL-6, TNF- α , IL-10 e IL-4 foram detectadas em pelo menos 74% das amostras, sendo que os níveis de IL-6, TNF- α e IL-10 se apresentaram significativamente elevados em comparação com os detectados nos indivíduos saudáveis. Foi observada correlação positiva entre os níveis de todas as citocinas avaliadas. Apenas 33% dos pacientes apresentaram algum episódio isolado de eosinofilia periférica ao longo do tempo, sendo que 11% apresentaram hipereosinofilia. Os níveis de IgE total foram semelhantes aos observados na população controle. A análise proteômica permitiu identificar 140 proteínas distintas no tecido endomiocárdico, das quais 18 eram provenientes da matriz extracelular. As análises *in silico* indicaram IL-6 e TNF- α como dois dos principais indutores da expressão das proteínas identificadas e a principal via canônica envolvida nas proteínas identificadas foi a: “Resposta de Fase Aguda”. Coincidentemente, os níveis de PCRus encontraram-se significativamente aumentados nos portadores de EMF. **CONCLUSÕES:** Elevados níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e de PCRus sugerem a presença de perfil inflamatório misto (Th1/Th2) nas fases avançadas da patogênese da EMF. A pouca expressão da eosinofilia descarta sua participação ativa na patogênese da fase avançada da doença, mas não é possível excluir sua participação nas fases iniciais. Nossos dados permitem levantar a hipótese que os níveis elevados de citocinas inflamatórias modulem a expressão de proteínas—

incluindo as de fase aguda- no tecido endomiocárdico de pacientes portadores de EMF.

Descritores: 1. Fibrose endomiocárdica 2. Insuficiência cardíaca 3. Doenças negligenciadas 4. Inflamação 5. Resposta de fase aguda 6. Citocinas/análise 7. Eosinofilia 8. Imunoglobulina E 9. Proteômica 10. Espectrometria de massas 11. Matriz extracelular 12. Estudos retrospectivos

Summary

Bossa AS. Endomyocardial fibrosis pathogenesis: Immunological profile and proteomics analysis of cardiac tissue [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUCTION: Endomyocardial fibrosis (EMF) is a typical disease in tropical countries, characterized by the fibrous deposition in the endomyocardium, with severe clinical manifestations. EMF pathogenesis is still unclear, but one of the major hypothesis suggests that EMF could be a consequence of a chronic inflammatory process with possible involvement of a Th2 immune responses after helminthiasis, mediated by eosinophils, which could contribute to pathogenesis in the early stages of the disease. In this study, we evaluated the inflammatory response profile and the protein expression profile of the affected endomyocardium, to understand the mechanisms involved in this pathogenesis. **METHODS:** Plasma and serum samples were collected from the 27 patients diagnosed with advanced stage EMF and from healthy controls, to measure plasma levels of 6 cytokines belonging to the Th1/Th2 cytokine profiles, ultrasensitive C Reactive Protein (CRP), total and allergen-specific serum IgE against prevalent and helminthic allergens. Proteomic analysis of tissue samples obtained from 4 EMF patients submitted to surgical resection of affected endomyocardial tissue allowed the identification of proteins by mass spectrometry, after separation by 1D and 2D electrophoresis. In silico analysis of functional pathways and networks connecting the proteins identified in the EMF cardiac tissue was also performed. Blood peripheral eosinophilia, clinical and echocardiography data were evaluated retrospectively. **RESULTS:** All EMF patients displayed detectable plasma levels of at least one of the cytokines tested. We found that TNF- α , IL-6, IL-4 and IL-10 were each detected in at least 74% of tested sera, and plasma levels of IL10, IL6 and TNF- α were significantly higher than controls. Plasma levels of such cytokines positively correlated with each other. Only 33% of the patients presented any episode of blood eosinophilia along time, and 11% of these patients presented hypereosinophilia. Total IgE levels were similar to those from healthy subjects. Proteomic analysis allowed the identification of 140 distinct proteins from the resected endomyocardium of the EMF patients, 18 of which belonging to the extracellular matrix. In silico analysis indicated IL-6 and TNF- α as two of the major gene expression inducers of the identified proteins in our analysis, and the Acute Phase Response was identified as the major canonical pathway involved with the identified set of proteins. Similarly, CRP levels were significantly increased in the EMF patients. **CONCLUSIONS:** Increased levels of an inflammatory/anti-inflammatory circulating cytokines (Th1/Th2), along with increased CRP levels, suggested the presence of a mixed inflammatory profile in EMF advanced stage. The number of EMF patients with blood eosinophilia does not support the active participation of eosinophils in pathogenesis of advanced EMF. However, it is not possible to exclude the participation in the pathogenesis early stages. Our data support the hypothesis that the increased levels of inflammatory cytokines modulate protein expression –including proteins of the acute phase response – in the endomyocardial tissue of EMF patients.

Descriptors: 1.Endomyocardial fibrosis 2.Heart Failure 3.Neglected diseases
4.Inflammation 5.Acute phase reaction 6.cytokines/analysis 7.Eosinophilia
8.Immunoglobulin E 9.Proteomics 10.Mass spectrometry 11.Extracellular matrix
extracelular 12.Retrospective studies

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Endomiocardiofibrose: patologia, clínica e epidemiologia

Endomiocardiofibrose (EMF) é uma cardiomiopatia restritiva crônica caracterizada por fibrose (deposição excessiva e progressiva de colágeno durante a reparação estrutural de um tecido frente a persistência de um estímulo inflamatório) do endomiocárdio ventricular que se estende a partir do ápice para a via de entrada e frequentemente recobre os músculos papilares, provocando espessamento e encurtamento das cordas tendíneas, levando a insuficiência valvar, diminuindo de modo acentuado o volume diastólico e a complacência das câmaras ventriculares afetadas. A fibrose na EMF pode acometer apenas um ou ambos os ventrículos cardíacos. A presença de trombos também é um achado relativamente comum na EMF, assim como pontos de calcificação.⁽¹⁻³⁾ O quadro clínico depende, portanto, da câmara acometida, do grau de fibrose e da presença de regurgitação valvar, geralmente culminando em insuficiência cardíaca (IC) progressiva, principalmente relacionada à disfunção diastólica e valvar, e em alguns casos mais avançados, em disfunção sistólica.^(4, 5) O prognóstico é grave, com alta taxa de morbi-mortalidade.^(1, 6, 7)

O diagnóstico geralmente é feito com base nos sinais clínicos, exames de imagem, biópsia endomiocárdica ou ainda durante a necropsia.^(5, 8) O tratamento de escolha se faz com base no uso da classe funcional dada pelo *New York Heart Association* (NYHA), em que os pacientes mais graves são classificados nos estágios III e IV. Estes pacientes são indicados à realização de ressecção cirúrgica da fibrose, e quando necessário plastia das valvas atrioventriculares, que possibilita melhora sintomática da IC.^(5, 9)

Estima-se que a EMF seja a cardiomiopatia restritiva mais comum e uma das principais causas de morte por doença cardíaca nas áreas onde é endêmica.^(4, 10) Os

casos de EMF são predominantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo que os países mais acometidos são Uganda, Nigéria, Moçambique, Costa do Marfim, Índia e Brasil. Na África equatorial, de 15 a 25% dos óbitos por doenças cardíacas são atribuídos a EMF, e em Uganda é considerada uma das doenças cardíacas mais comuns, correspondendo a quase 20% dos diagnósticos de ecocardiografia (ECO). No Brasil, a incidência de casos é intermediária. ^(10, 11)

A EMF na região africana acomete, principalmente, crianças e adultos jovens e possui uma frequência de pico bimodal nas faixas etárias de 10 e 30 anos, sendo que os casos na infância ocorrem com a mesma frequência em ambos os gêneros. Já os estudos brasileiros apontam sobre a prevalência de casos em mulheres por volta de quarenta anos de idade. A EMF acomete com mais frequência indivíduos de baixo nível socioeconômico, geralmente com histórico de residência em zonas rurais e de deficiências nutricionais na infância. ^(7, 9)

Estudos anteriores indicam a participação de um processo inflamatório (mecanismo de defesa caracterizado pelo acúmulo de células imunológicas e de diversos fatores químicos no microambiente inflamado) na patogênese da EMF onde foi visto por histopatologia a presença de linfócitos T (LT) e macrófagos, de grau leve - moderado em torno de vasos no endomiocárdio desses pacientes (Figura 1). ⁽¹²⁾

Figura 1 – Aspecto histológico do endomiocárdio de pacientes com endomiocardiofibrose. A- Aspecto histológico do endomiocárdio de ressecção cirúrgica do ventrículo direito na EMF (Biópsia B07/193), aumento 40x. Densa camada fibrosa superficial, seguida de tecido fibroconjuntivo apresentando neovascularização e infiltrado inflamatório em região subendocárdica junto ao miocárdio. **B-** Infiltrado inflamatório na faixa fibrosa com predomínio de linfomononucleares, notando-se também deposição de pigmento acastanhado (hemosiderina)– aumento de 200x. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). (Fotos gentilmente fornecidas pelo Dr Luis Benvenuti – Anatomia patológica, InCor).

Como não se conhecem as fases iniciais da EMF, não é possível afirmar se o infiltrado inflamatório crônico é consequência de uma inflamação aguda ou não.

Ademais, dados da literatura divergem sobre início insidioso e relatos de febre em pacientes com EMF previamente ao diagnóstico.⁽¹³⁾ Logo, um contexto imunopatológico parece estar envolvido com o remodelamento cardíaco e consequentemente, com a patogênese. No entanto, pouco se sabe sobre inflamação na EMF.

1.2 Hipóteses etiológicas da endomiocardiofibrose

Várias hipóteses etiológicas tentam explicar a patogenia levando em consideração os achados clínicos, a distribuição geográfica, faixa etária e gênero predominantemente acometidos na EMF. Também foi levantada a hipótese da participação da resposta imune contra agentes patogênicos na doença, tais como: infecções virais, por protozoários e helmintos, assim como processos de hipersensibilidade, processos reumáticos, deficiências nutricionais e contaminação por substâncias tóxicas.^(9, 10)

A hipótese etiológica mais difundida sugere que a EMF compartilhe a mesma etiopatogenia de lesão final que a endocardite eosinofílica (EE) de Loeffler, o que sugere a relação entre EMF e a desgranulação de eosinófilos no tecido cardíaco, como consequência de uma eosinofilia temporária induzida por parasitoses.^(13, 14)

Eosinófilos são leucócitos granulocíticos presentes em baixo número no sangue periférico (1-4% dos leucócitos totais) que, a princípio, foram consideradas células efetoras associadas à resposta imune contra parasitos e reações de hipersensibilidade do tipo I, ambas desencadeadas por respostas do perfil Th2. Atualmente, estes têm sido descritos como células multifuncionais envolvidas inclusive no remodelamento tecidual.^(15, 16) Seus grânulos específicos são compostos principalmente por proteínas catiônicas citotóxicas, como a proteína básica principal (MBP), peroxidase eosinofílica (EPO); e as RNases proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN), além de citocinas representantes de respostas imunes Th1 e Th2, tais como as interleucinas (IL)-2, IL-4; IL-5; IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), quimiocinas (eotaxinas) –

que promovem migração e infiltração dos eosinófilos nos tecidos, e fatores de crescimento, tais como fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF).⁽¹⁷⁻²⁴⁾ As proteínas catiônicas possuem ação anti-helmíntica e propriedades citotóxicas em vários tecidos, inclusive o cardíaco.^(15, 16)

A hipótese do envolvimento de eosinofilia pós helmintose na patogênese da EMF foi fortalecida por um estudo em que se observou uma forte correlação entre hipereosinofilia e doenças do tipo filariase em paciente com EMF na Nigéria, sugerindo que a doença seria decorrente de eosinofilia temporária induzida por helmintos.⁽²⁵⁾ Além disso, há relatos de casos de europeus residentes temporariamente no Congo que desenvolveram EMF, atribuídos a filariose com severa eosinofilia. Em conjunto, esses estudos apontam para uma importante causa ambiental associada a doença, e a participação de parasitoses na patogênese explicaria a restrição da EMF nas regiões tropicais e subtropicais.^(7, 10, 13, 14)

Rashwan e cols,⁽²⁶⁾ em 1995 descreveram alguns casos de EMF em pacientes com histórico de infestação por *Schistosoma mansoni*. Carneiro e cols, em 2011⁽²⁷⁾ relataram um caso de EMF associado diretamente à infestação por *S. mansoni*, sendo este um agente frequentemente correlacionado à indução de hipereosinofilia durante a fase de migração larval.⁽¹³⁾ Embora essas observações associem a fibrose endomiocárdica com a presença de helmintose, os mecanismos pelos quais a hipereosinofilia induzida por estes helmintos causariam danos ao tecido cardíaco na EMF ainda não foram totalmente esclarecidos.^(13, 28, 29)

Quanto a sua atividade como célula efetora, há evidências sobre a relação entre os grânulos de eosinófilos e processos fibróticos em doenças humanas, como já observado no remodelamento das vias aéreas em pacientes com asma e no desenvolvimento de fibrose endomiocárdica em alguns pacientes com hipereosinofilia.⁽¹⁵⁾ Estudos indicam que quando eosinófilos desgranulam, as proteínas básicas causam dano ao miocárdio em culturas celulares *in vitro* e que esse efeito citotóxico ocorre de forma dose-dependente, por meio da inibição de múltiplas vias enzimáticas.^(30, 31)

As síndromes hipereosinofílicas (SHE) compreendem um grupo de patologias heterogêneas que levam ao desenvolvimento de fibrose em diversos órgãos em

consequência da desgranulação de eosinófilos, inclusive no coração. Embora haja relatos de caso de EE idiopática sem a presença de eosinofilia periférica, a SHE geralmente está associada com hipereosinofilia pronunciada, ⁽³²⁾ e estão divididas cronologicamente em três estágios: necrose aguda, trombose e fibrose. ⁽³³⁻³⁵⁾

A fase aguda é caracterizada pela infiltração eosinofílica no miocárdio. É nesse período que os eosinófilos desgranulam e que suas proteínas tóxicas promovem a necrose tecidual. A necrose do miocárdio está diretamente relacionada à extensão do infiltrado inflamatório. Trata-se de uma fase de curta duração (entre 5 e 6 semanas), em geral assintomática. ⁽²⁹⁾

Após a necrose aguda, observa-se a formação de trombos murais nos ventrículos. Sabe-se que em pacientes com SHE, o estímulo mais associado à formação de trombos é o dano vascular na parede dos ventrículos, gerado em decorrência da desgranulação. Além disso, os grânulos dos eosinófilos contêm altos níveis precursores do fator de ativação das plaquetas e proteínas catiônicas, que se ligam a trombomodulina, formando um complexo que aumenta a formação de trombos endomiocárdicos. Outro fator que contribui para a formação de trombos é o baixo fluxo sanguíneo na superfície do endocárdio, particularmente no ápice dos ventrículos. Essa lentificação do fluxo permite o acúmulo de fatores de coagulação e sua ativação. Por fim, a organização tecidual do trombo gera a fibrose, sendo esta a fase final e sintomática da SHE. ⁽²⁹⁾

A associação entre hipereosinofilia e fibrose endomiocárdica está bem estabelecida na SHE. ^(36, 37) Assim como a EMF, a SHE é uma cardiomiopatia restritiva. Patofisiologicamente, ambas compartilham o mesmo estágio fibrótico de lesão final. Apesar da semelhança entre as lesões finais de EMF com a SHE, há características peculiares que diferenciam estas doenças, descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Diferenças entre parâmetros da endomiocardiofibrose e síndromes hipereosinofílicas

Parâmetros	EMF	SHE
Contagem diferencial eosinófilos (mm3)	~1.000	> 1.500
Distribuição geográfica	Trópicos	Países de clima temperado
Órgão(s) afetado(s)	Coração	Coração, pulmões, pele, intestino
Infiltrado eosinofílico	Raramente descrito	Comum nas fases iniciais (necrótica)
Faixa etária dos afetados	Crianças e jovens adultos	Idosos
Predominância do gênero afetado	Sem predominância na infância / predominância mulheres adultas	Homens

FONTE: Olsen, 1972 ⁽²⁸⁾; Bukhman, Ziegler & Parry, 2008 ⁽¹⁰⁾ e Falase e Ogah, 2012 ⁽³⁸⁾

Legenda: EMF (endomiocardiofibrose), SHE (síndrome hipereosinofílica); ~ (aproximadamente); > (maior).

Portanto, os eosinófilos e a fibrose estão intimamente relacionados aos processos inflamatórios com ativação de linfócitos, especialmente os do tipo Th2. Nestas respostas imunes, estas células são rapidamente recrutadas para os sítios de inflamação, onde liberam uma série de citocinas e mediadores lipídicos que promovem inflamação e ao mesmo tempo estimulam o reparo do tecido, uma vez que expressam em seus grânulos citocinas e fatores de crescimento com propriedades de reparação tecidual. ⁽³⁹⁾

TGF- β é a principal citocina com função na reparação tecidual produzida por eosinófilos. ⁽¹⁵⁾ Quanto aos mediadores de reparação tecidual relacionados com resposta Th2, a participação da IL-4 destaca-se por ativar a síntese de colágenos tipos I e III por fibroblastos, contribuindo significadamente para progressão da fibrose. ⁽⁴⁰⁾ IL-4 induz a diferenciação de LT CD4+ naive em LT CD4+ efetores produtores de citocinas Th2 sendo, portanto, responsável por promover esta resposta inflamatória.

⁽⁴¹⁾ Em estudos anteriores, foi demonstrada a produção de IL-4 por eosinófilos em modelos experimentais de infecção parasitária. ⁽⁴²⁾

Além da indução de eosinofilia, as citocinas do perfil Th2, especialmente IL-4, também induzem a síntese de imunoglobulina E (IgE), após sensibilização a alérgenos (antígeno que pode induzir uma resposta alérgica). Sua associação com processos de hipersensibilidade do tipo I foi estabelecida pelo fato de várias células imunológicas envolvidas na reação alérgica, incluindo os eosinófilos, expressarem receptor de alta afinidade para IgE, o FcεRI. ⁽⁴³⁾ Apesar de altos níveis de IgE serem sempre observados em reações de hipersensibilidade do tipo I, indivíduos atópicos nem sempre apresentam altos níveis de IgE no soro. Além disso, infecções parasitárias e não-parasitárias, doenças inflamatórias ou malignas podem estar associadas a níveis elevados dessa imunoglobulina, independente da predisposição alérgica do indivíduo. Apesar dessa divergência, os níveis de IgE são utilizados na clínica para diagnóstico de reações alérgicas mediadas por esta imunoglobulina. Os níveis de IgE específico contra alérgenos prevalentes também tem sido utilizados na clínica para diagnóstico complementar de alergias e fatores de risco. ⁽⁴⁴⁾

Portanto, de acordo com a hipótese e com os dados da literatura, assume-se que a patogênese da EMF esteja relacionada a um processo inflamatório relacionado a uma resposta imune do tipo Th2, uma vez que este perfil de resposta está diretamente envolvido no recrutamento e ativação de eosinófilos, imunidade contra helmintos e processos fibróticos. Esse processo inflamatório inicial provocaria danos do endomiocárdio, a reparação tecidual levaria a fibrose, que promoveria disfunções cardíacas e valvares, culminando na IC, comum na evolução clínica da maioria dos pacientes acometidos. ⁽⁴⁵⁾

1.3 Processos inflamatórios, insuficiência cardíaca e reparo tecidual em outras doenças cardiovasculares

O processo inflamatório participa de diferentes cardiopatias, tais como a doença cardíaca isquêmica, o infarto do miocárdio, hipertensão arterial, na formação da fibrose e IC, conforme apresentado no esquema abaixo (Figura 2). ^(46, 47)

Figura 2 – Relação entre inflamação, fibrose e insuficiência cardíaca. Esquema da cascata de eventos relacionadas a formação da fibrose e sua contribuição para estabelecimento da IC. Adaptado de Nicoletti & Michel, 1999 ⁽⁴⁶⁾ e Falase & Ogah, 2012 ⁽³⁸⁾. VE (ventrículo esquerdo), céls (células), IL (interleucina), TNF (fator de necrose tumoral), IC (insuficiência cardíaca).

A IC ocorre em consequência de eventos celulares e moleculares que levam a mudanças funcionais e estruturais, dentre as quais: hipertrofia, alterações na morfologia e dinâmica da cavidade ventricular, aumento de apoptose, desenvolvimento de fibrose envolvendo mudanças qualitativas e quantitativas nas proteínas da matriz extracelular (MEC). ⁽⁴⁸⁾ Apesar da etiologia poder afetar os níveis e o perfil de citocinas circulantes, a produção de IL-6 e TNF- α compreende uma via patogênica comum na IC, uma vez que estes são os principais mediadores na ativação de respostas imunes persistentes em pacientes com IC de diferentes etiologias, agudas ou crônicas, tais como disfunção sistólica, disfunção diastólica e insuficiência valvar, sendo considerados mediadores inflamatórios centrais nestas doenças. ⁽⁴⁹⁾ Não há um consenso sobre o porquê pacientes com IC apresentam elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes, porém as atuais teorias consideram desde auto-imunidade até infecções por agentes variados. ⁽⁵⁰⁾ Mann, em 2003 ⁽⁵¹⁾ propôs que, a princípio, as citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 estão elevadas

como uma resposta adaptativa às condições de injúria com efeitos cardioprotetores, enquanto que o processo crônico é mal adaptado e gera a descompensação cardíaca.

As citocinas IL-6, IL1- β e TNF- α ⁽⁵²⁾ estimulam a via de sinalização “resposta de fase aguda”. Dentre as alterações clínicas e patológicas, temos a elevação de proteínas de fase aguda, como: proteína C reativa (PCR), fibrinogênio, proteína amiloide sérica A, entre outras. Estas compreendem um conjunto de proteínas produzidas por hepatócitos em resposta a diversos estímulos de estresse e insultos patológicos, como por exemplo: agentes infecciosos, inflamatórios e proteínas do choque térmico. ⁽⁵³⁾

Níveis elevados de PCR são marcadores de inflamação aguda e/ou crônica sistêmica, tornando-a um dos principais biomarcadores analisados na prática clínica, ⁽⁵³⁾ sendo que a PCR ultrasensível (PCRus) é o método mais sensível para determinação dos níveis dessa proteína. ⁽⁵⁴⁾ A expressão de PCR é regulada principalmente a nível transcricional, cujo principal indutor é IL-6. Portanto, a quantidade de PCR produzida reflete a intensidade do processo patológico. Estudos anteriores descrevem níveis elevados de PCR em pacientes com IC crônica, IC diastólica e cardiomiopatia dilatada, caracterizando o quadro inflamatório crônico presente nessas patologias. ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾ Ainda não há estudos descrevendo os níveis de PCR ou outros marcadores de inflamação em pacientes com EMF.

A expressão de mediadores anti-inflamatórios e de reparação tecidual, tais como IL-10 e o TGF- β 1, são estimulados durante a inflamação, a fim de controlar a exacerbação da resposta inflamatória, evitar danos excessivos ao hospedeiro, preservar a arquitetura tecidual e restabelecer a homeostase. ^(58, 59) TGF- β é uma potente citocina regulatória da resposta inflamatória e ainda possui efeito pró-fibrótico. Sabe-se que durante injúrias cardíacas TGF- β age estimulando a produção e deposição de colágeno tipo I e III e outras proteínas da MEC, como fibronectina e proteoglicanos por fibroblastos, além de inibir a síntese de collagenases e estimular a síntese de inibidores dessas proteases e promover a diferenciação dessas células para miofibroblastos (expressão de α -actina). ^(60, 61) A presença desse tipo celular foi observada na EMF em estudo anatomopatológico com material de ressecção cirúrgica, no qual se descreveu presença de miofibroblastos principalmente na

fibrose superficial densa (Figura 3). Ademais, estudos anteriores sugerem que a superexpressão de TGF- β 1 esteja envolvida no desenvolvimento de desordens inflamatórias crônicas de ordem fibróticas, sendo responsável por mudanças no padrão inflamatório e fibrose em modelo *in vivo*.⁽⁶²⁾

Figura 3 – Marcação imunohistoquímica para α -actina em endomiocárdio de pacientes com endomiocardiofibrose. Marcação positiva, sugerindo a presença de miofibroblastos no tecido fibroso da lesão endomiocárdica de pacientes com EMF. Aumento de 200x. (Fotos gentilmente fornecidas pelo Dr Luis Benvenuti – Anatomia patológica, InCor).

1.4 Análise proteômica em doenças cardiovasculares

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nos organismos, participando de quase todas as funções biológicas. Entre essas estão, manter a estrutura celular, participar de reações metabólicas, regular a expressão gênica, divisão celular, entre outras.⁽⁶³⁾ A análise proteômica é uma importante ferramenta de pesquisa na era pós-genômica. Técnicas e ferramentas sensíveis na detecção são de fundamental importância na investigação de vários fenômenos biológicos, incluindo transdução de sinal, apoptose, metabolismo e regulação gênica.

Entre as técnicas utilizadas na análise proteômica, estão as eletroforeses em gel, uni (1D) e bidimensional (2D), que são técnicas muito usadas na análise de

misturas complexas de proteínas em extratos de células, tecidos ou outras amostras biológicas. A técnica de eletroforese 2D, especificamente, separa as proteínas de duas formas independentes, a primeira dimensão, chamada focalização isoeletrica (IEF, do inglês *isoelectric focusing*) que segrega as proteínas de acordo com os pontos isoeletricos (pI), e a etapa da segunda dimensão que se trata de um gel de dodecilsulfato de sódio – poliacrilamida (SDS-PAGE) que separa as proteínas de acordo com seu peso molecular (PM). Teoricamente, cada ponto (*spot*) no gel 2D corresponde a uma única proteína da amostra, no entanto, mais de uma identificação pode ser obtida de um mesmo *spot*. Milhares de proteínas diferentes podem ser separadas e a informação como, pI e PM aparente podem ser obtidos. O método mais clássico de identificação de proteínas por espectrometria de massas, que caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga (m/z) de seus íons, consiste em uma “impressão digital peptídica”, em inglês *peptide mass fingerprinting* (PMF). Esta metodologia é baseada na digestão da proteína a ser identificada por uma enzima proteolítica (por exemplo, a tripsina) produzindo peptídeos. As massas desses peptídeos são então determinadas com grande acuidade. *Softwares* especializados permitem comparar o PMF da proteína que se quer identificar com os gerados teoricamente para todas as seqüências de proteínas presentes em diferentes bancos de dados, tais como o “SwissProt” e o “NCBIInr”, e portanto, identificá-la com grande acurácia.⁽⁶⁴⁾ Logo, esta técnica depende da disponibilidade de informações como o genoma da espécie ou caracterização prévia da proteína⁽⁶⁵⁾.

A análise proteômica tem sido bastante aplicada em estudos de doenças cardiovasculares (CV), como em análises de tecido isquêmicos, cardiomiopatia dilatada, hipertrófica e IC.⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾ Os resultados podem levar a novos diagnósticos, prognósticos e marcadores terapêuticos das doenças estudadas. Dados de análise proteômica da cardiomiopatia chagásica crônica realizada pelo nosso grupo identificaram 112 proteínas distintas, envolvidas em apoptose, regulação do sistema imune, processos de estresse e proteínas envolvidas com fatores de transcrição e sinalização celular. Com base na análise de dados por meio de ferramentas de bioinformática, estes resultados sugerem a ocorrência de um processo ativo de apoptose, provavelmente em decorrência de um estresse oxidativo no miocárdio.⁽⁶⁹⁾

1.5 Hipótese e justificativa do estudo

A EMF é uma cardiomiopatia negligenciada cuja etiopatogenia é pouco conhecida e investigada. Apesar da descrição das lesões histopatológicas no tecido acometido pela fibrose e composição do infiltrado inflamatório no subendocárdio, pouco se sabe sobre a sua natureza imunopatológica. Entretanto, o contexto inflamatório parece estar envolvido com o dano tecidual e remodelamento cardíaco e consequentemente, com a patogênese. Uma das principais hipóteses etiológicas sustenta que o processo fibroso na EMF seja consequência de uma resposta imune, mediada por eosinófilos nas fases iniciais da doença, assim como descrito nos casos de EE. Essa resposta imune estaria relacionada a infecções por helmintos (o que explicaria a ocorrência dos casos nos trópicos) A hipótese central deste estudo é que pacientes com EMF apresentem indícios da participação de resposta inflamatória persistente, com perfil Th2 de resposta imune, associado à eosinofilia, ativação funcional de eosinófilos e também a helmintíase. Sendo assim, investigamos citocinas Th2 e IgE no plasma e soro, respectivamente. Sabendo da importância das citocinas pró-inflamatórias e de PCR na patogênese de doenças CV, também avaliamos esses parâmetros em amostras de pacientes com EMF, em comparação a uma população saudável. Também realizamos análise proteômica do tecido cardíaco comprometido pela fibrose de pacientes com EMF, aliada às análises *in silico*. O corolário desta hipótese é que o tecido cardíaco apresenta alterações moleculares e de vias envolvidas com inflamação e remodelamento cardíaco.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar os parâmetros imunológicos e inflamatórios em sangue periférico e identificar as proteínas predominantemente expressas no endomiocárdio de pacientes com EMF, visando esclarecer a patogênese da doença.

Objetivos Específicos

- Descrever o perfil citocinas plasmáticas (pró- e anti-inflamatórias) predominante nas amostras de pacientes com EMF;
- Avaliar a participação de eosinófilos na patogênese da EMF utilizando-se dados de prontuários e correlacionar com o nível de citocinas (pró- e anti-inflamatórias) quantificadas no plasma de pacientes com EMF;
- Avaliar os níveis de IgE total e IgE específica contra alérgenos prevalentes e de helmintos e correlacionar seus níveis com os níveis de citocinas (pró- e anti-inflamatórias) quantificadas no plasma de pacientes com EMF;
- Correlacionar o nível de citocinas (pró- e anti-inflamatórias) quantificados no plasma de pacientes com EMF com parâmetros de IC (fração de ejeção, índice de função diastólica e classe funcional por NYHA);
- Identificar e descrever os principais grupos de proteínas expressas no endomiocárdio de pacientes com EMF por meio de análise proteômica qualitativa;
- Avaliar os principais indutores envolvidos com a regulação positiva da expressão das proteínas identificadas no tecido comprometido pela fibrose, identificar as vias moleculares associadas ao processo inflamatório e remodelamento cardíaco na patogênese da EMF por ferramentas de bioinformática.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração (SDC 3467/10/056) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), através da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa, CAPPEsq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 0569/10) (Anexo A).

3.1 Caracterização da população de estudo

Para este estudo foram selecionados 27 pacientes diagnosticados com EMF em acompanhamento ambulatorial no Instituto do Coração - Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor – HC-FMUSP), entre os anos de 2003 e 2011. Dentre o grupo analisado, 21 (78%) destes pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica do endomiocárdio. Também foram selecionados 50 indivíduos saudáveis para participar deste estudo como população controle para amostras de soro, e oito (8) destes também como controle para amostras de plasma. Todos os participantes submetidos à coleta de amostras (soro e plasma) foram devidamente notificados sobre o protocolo de pesquisa e demonstraram estar de acordo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.1.1 Critérios para descrição de dados demográficos e clínicos sobre capacidade cardíaca dos pacientes

Dados demográficos dos pacientes com EMF foram obtidos a partir da ficha eletrônica disponível no sistema de prontuários do InCor, o Si3. Neste levantamento, foi dada ênfase nos critérios de: idade do paciente no diagnóstico de EMF, gênero do paciente, tempo de doença e evolução clínica, assim como indicadores de pobreza (escolaridade) e comorbidades associadas ao grupo de pacientes EMF (alergias,

doenças autoimunes (DAIs), distúrbios de coagulação, diabetes mellitus tipo II, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e outras doenças fibróticas) e nos dados laboratoriais para eosinofilia periférica (EP).

Os dados ecocardiográficos foram obtidos a partir de exames realizados próximo à data de coleta de amostras dos pacientes. Para o exame foi utilizado o equipamento Sequóia 512 (Siemens, Mountain View, CA). Foram analisadas as dimensões atrial e ventricular esquerda, fração de ejeção (FE), função diastólica do ventrículo esquerdo (VE) e refluxo das valvas atrioventriculares. As medidas ecocardiográficas foram efetuadas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.⁽⁷⁰⁾ O ritmo cardíaco considerado foi com base nos laudos de eletrocardiogramas (ECG) dos pacientes. Os dados clínicos foram avaliados pela Prof^a. Dra Vera Maria Cury Salemi, cardiologista do ambulatório de miocardiopatias do Instituto do Coração (InCor).

3.1.2 Critérios para determinação de eosinofilia em sangue periférico

De acordo com o valor de referência do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) HC-FMUSP, foram consideradas eosinofilia em sangue periférico contagens superiores a 500 eosinófilos/mm³ e hipereosinofilia em sangue periférico contagens superiores a 1.500 eosinófilos/mm³. A confirmação da ocorrência de eosinofilia se fez com base em valores superiores a 500 eosinófilos/mm³ do ano avaliado, a partir de hemograma disponíveis no banco de dados Si3, entre os anos de 2001 e 2011.

3.2 Análises laboratoriais

3.2.1 Quantificação de imunoglobulina E *in vitro*

3.2.1.1 Amostras de soro

Amostras de soro dos 27 pacientes com EMF foram utilizadas respectivamente para quantificação dos níveis de IgE (total e alérgeno-específico) e quantificação de citocinas plasmáticas. Estas foram coletadas em tubo seco e, posteriormente, aliquotadas e armazenadas a menos (-) 80°C. O soro de indivíduos

saudáveis utilizados neste estudo (N=50) foi obtido a partir de doadores do banco de sangue, pareados com os pacientes por gênero e idade. O material de estudo foi coletado pelo Laboratório de Sorologia, Fundação Pró-Sangue - HC-FMUSP.

3.2.1.2 Quantificação de imunoglobulina E total e específica *in vitro*

Níveis de IgE total e específico contra alérgenos selecionados foram avaliados *in vitro* pelo aparelho ImmunoCAP® 100 (Phadia AB, Uppsala, Suécia), amplamente utilizado para diagnósticos de alergias através da técnica de fluoroenzimo ensaios automatizados (FEIA). O ImmunoCAP® detecta IgE no intervalo de 0 a 100 kUA/l, com um limiar de 0,35 kUA/l e prediz a classe de sensibilidade do paciente contra o alérgeno testado de acordo com os níveis de IgE alérgeno-específico. Para esta análise, utilizou-se 40 µL de soro por alérgeno testado. O valor de referência adotado para IgE total foi de 200kU/l, com base nos valores de referência para população brasileira. Os valores de referência de IgE específico considerados foram obtidos do fabricante do kit de quantificação de IgE específico. As análises foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica LIM60 - FMUSP, com auxílio da Dra Cristina Kokron e equipe.

3.2.1.3 Seleção dos alérgenos testados

Os alérgenos testados no soro de pacientes EMF (aero-alérgenos e alérgenos de helmintos) foram escolhidos com base na prevalência ambiental, garantindo que a maior parte dos pacientes já tivesse tido contato com os mesmos e com base em semelhança de estrutura tridimensional de alérgenos prevalentes. Foram selecionados para avaliar a resposta de IgE específica *in vitro*:

- *Dermatophagoides pteronyssinus* (ImmunoCAP d1)
- *Blomia tropicalis* (ImmunoCAP d201)
- *Ascaris lumbricoides* (ImmunoCAP p1)
- *Echinococcus* spp. (ImmunoCAP p2)
- rDer p 10 tropomyosin, house dust mite (ImmunoCAP d205)

3.2.1.4 Análise estatística dos resultados de imunoglobulina E total

Para análises estatísticas dos níveis de IgE total entre pacientes e controles, utilizou-se o teste não paramétrico Mann Whitney no programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla Califórnia, Estados Unidos). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3.2.2 Quantificação de citocinas plasmáticas circulantes por citometria de fluxo

3.2.2.1 Amostras de plasma

Amostras de plasma dos 27 pacientes com EMF foram utilizadas para quantificação de citocinas plasmáticas. As amostras foram coletadas em tubo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*), aliquotadas e armazenadas -80°C . O plasma de indivíduos controles utilizados neste estudo (N=08) foram obtidos a partir de doadores do banco de sangue, pareados com os pacientes EMF por gênero e idade. O material foi coletado pelo Laboratório de Sorologia, Fundação Pró-Sangue HC-FMUSP.

3.2.2.2 Detecção das citocinas

Para detecção das citocinas no plasma de pacientes EMF, utilizou-se o kit Th1/Th2 II humanos, para análise através da técnica *Cytometric Bead Array* - CBA (BD Biosciences) em um citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences). As citocinas analisadas e seus respectivos limiares de detecção em (pg/mL) são: IL-2 (2,6), IL-4 (2,6), IL-6 (3,0), IL-10 (2,8), TNF- α (2,8) e IFN- γ (7,1).

3.2.2.3 Procedimentos de análise

Para o ensaio, as *beads* do kit Th1/Th2 foram misturadas com o padrão e com a amostra e, posteriormente, incubadas com os anticorpos de detecção conjugados a ficoeritrina (PE) para formar complexos detectados pelo citômetro. A intensidade de fluorescência do PE é diretamente proporcional à quantidade de citocina na amostra.

3.2.2.4 Curva padrão

A curva padrão foi feita a partir de um *pool* de todos os padrões liofilizados, onde são reconstituídos em um volume final de 2mL de diluente. A curva foi composta de 11 diluições de 1 a 256 (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256) e o branco (somente diluente).

3.2.2.5 Preparo das *beads* de captura

Após determinar o número de tubos do ensaio, homogeneizou-se o *vial* de cada *bead* de captura antes de misturá-lo com a amostra. Foram adicionados 10 μ L da suspensão das *beads* de captura para cada tubo a ser analisado (incluindo os tubos contendo os padrões e o “branco”) e foram novamente misturados. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 200 giros durante 5 minutos (min), e cuidadosamente descartou-se o sobrenadante. O *pellet* das *beads* de captura foi ressuspendido no tampão de plasma, no mesmo volume que havia sido descartado e foram misturados novamente. Por fim, as *beads* foram incubadas à temperatura ambiente, protegidas da luz por 30 min.

3.2.2.6 Preparo das amostras

Utilizou-se a amostra sem diluições, considerando que a curva padrão varia de 20 a 5.000pg/mL e que não se observam altas concentrações (superiores a 5.000pg/mL) de citocinas no plasma mesmo em condições patológicas.

3.2.2.7 Ensaio de CBA

Após a preparação do *pool* das *beads* liofilizadas da curva padrão e do *pool* de *beads* de captura foram adicionados 50µL do *pool* de *beads* em cada tubo de ensaio (incluindo curva) e o branco. Foram adicionados 50µL do *pool* de *beads* em cada tubo de ensaio (incluindo curva) e o branco, posteriormente, 50µL de amostra em cada tubo foi adicionado em cada tubo, com exceção do padrão e do branco. Por fim, fez-se a adição de 50µL do reagente de detecção PE nos tubos. Após homogeneização, a mistura foi incubada por 3 horas à temperatura ambiente e protegida da luz. Após cumprir esta etapa, adicionou-se 1mL do tampão de lavagem em cada tubo de ensaio e centrifugou-se a 200 giros durante 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados no tubo 300µL de tampão de lavagem, homogeneizados e a leitura foi realizada.

3.2.2.8 Análise de dados CBA

Para a análise dos dados, utilizou-se o *software* FCAP Array (BD Biosciences). A detecção de citocinas e a análise dos dados foram realizadas no Laboratório de Imunologia da UNIFESP, em colaboração com a Prof^a. Dra. Daniela Santoro Rosa.

3.2.2.9 Análise estatística dos dados das citocinas

As análises estatísticas entre os níveis de citocinas pacientes e dos controles foram realizadas utilizando-se o teste não paramétrico Mann Whitney no programa

GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla Califórnia, Estados Unidos). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$. As amostras com valores abaixo do limite de detecção foram consideradas na análise estatística.

3.2.3 Dosagem de proteína C reativa ultrasensível

3.2.3.1 Amostras de plasma

Amostras de plasma de 24 pacientes com EMF foram utilizadas para dosagens de PCRus. As amostras foram coletadas em tubo com anticoagulante EDTA, aliquotadas e armazenadas a -80°C . O plasma de indivíduos controles utilizados neste estudo ($N=08$) foi obtido a partir de doadores do banco de sangue, pareados com os pacientes EMF por gênero e idade.

3.2.3.2 Quantificação de PCRus

A mensuração dos níveis de PCRus foi realizada através de anticorpos monoclonais, pelo método de imunonefelometria em equipamento automatizado BN II Systems, utilizando o kit CARDIO PHASE® hs CRP (Siemens Healthcare Diagnostics Products, Marburg, Alemanha). As dosagens foram feitas no LAC - InCor.

3.2.3.3 Análise estatística da quantificação de PCRus

Para análises estatísticas dos níveis de PCRus entre pacientes EMF e indivíduos saudáveis, foram utilizados o teste não paramétrico Mann Whitney no programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla Califórnia, Estados Unidos). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3.3 Testes estatísticos de associação e correlação entre dados clínicos e laboratoriais

3.3.1 Testes de correlação estatística

A correlação entre os níveis de citocinas, níveis de IgE total e específica com índices de FE, disfunção diastólica e PCRus foi feita utilizando o teste estatístico não paramétrico *Spearman*, no *software* GraphPrism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla Califórnia, Estados Unidos). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3.4 Análise proteômica

3.4.1 Amostras de endomiocárdio de pacientes com EMF

Para este estudo foram utilizados quatro fragmentos de biópsias de endomiocárdio de pacientes com EMF (pacientes EMF 08, 09, 10 e 34) obtidos durante a cirurgia de ressecção da fibrose. Macroscopicamente, as amostras são compostas essencialmente de tecido fibroso, todavia contém microfragmentos de endomiocárdio e possível contaminação com plasma sanguíneo. As amostras de tecido cardíaco foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso.

3.4.2 Preparação das amostras para a extração proteica

3.4.2.1 Tampão de lise

Para a obtenção do homogenato de proteínas, foi utilizado tampão composto por 7M uréia, 2M tiouréia, 4% chaps, 10mM tris e 5mM de acetato de magnésio, pH 8,7.

3.4.2.2 Procedimento de extração

Utilizou-se 0,5 mL de tampão para cada 1 miligrama (mg) de tecido, com homogeneização a 5.000 giros, 3 ciclos de 15 segundos e pausa de 20 segundos (seg) cada em tubos com esferas de cerâmica no homogeneizador Precellys (Bertin Technologies). A amostra foi processada em 3 ciclos de 5 seg cada a 10 W (60 Sonic Dismembrator, Fischer Scientific), e em seguida centrifugada a 16.000 giros por 30 min a 4°C para remoção de partículas insolúveis (debris celulares e fibrilas de colágeno tipo II).

3.4.3 Quantificação de proteínas totais

A concentração das proteínas totais foi avaliada pelo método “Bradford” (BioRad).

3.4.4 Eletroforese unidimensional

Foram utilizados géis 10% para eletroforese 1D no sistema SE 260 (GE Healthcare). Sucintamente, o *pool* de amostras foi previamente aquecido a 95°C na presença do SDS e de um reagente tiol (2 mercaptoetanol), para desnaturação e quebra das pontes dissulfeto. A amperagem aplicada foi de 15mA/gel até a entrada da amostra do gel de resolução, e de 30mA/gel até o fim da corrida.

3.4.5 Eletroforese bidimensional

3.4.5.1 Primeira dimensão

Tiras de pH imobilizado (IPG *strip*) na faixa de pH 3 a 10 em gradiente linear (L), 13 centímetros (cm), foram reidratadas *overnight* com a solução de reidratação *DeStreak Rehydration Solution*, contendo 0,5% de IPG *buffer* 3-10L (GE Healthcare). Rapidamente, foi adicionada na solução de reidratação à concentração de 200µg de proteína. Após a reidratação, as tiras foram colocadas no IPG *strip*

holder com a extremidade ácida voltada para o ânodo. Eletrodos foram posicionados nas extremidades da tira e junto com a tira, foi recoberto com óleo mineral, e levados à plataforma do “Ettan IPGphor” para a focalização isoeletrica até o acumulado mínimo de 17 kVh.

3.4.5.2 Segunda dimensão

Após a focalização isoeletrica, as tiras foram submetidas a duas etapas de equilíbrio para a segunda dimensão. A primeira etapa consistiu na redução das proteínas e foi realizada com a solução de equilíbrio (50mM Tris-HCl, 6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e 0,002% de azul de bromofenol, pH 8,8), acrescida de 10mg/mL de ditioneitol (DTT) durante 15 min. A segunda etapa consistiu na alquilação das proteínas também usando o tampão de equilíbrio acrescido de 25mg/mL de iodoacetamida por 15 min.

A segunda dimensão foi realizada em cuba de eletroforese vertical no sistema SE 600 Ruby (GE Healthcare) utilizando SDS-PAGE 10%. O conjunto foi selado com agarose 0,5% em tampão de eletroforese. As corridas eletroforéticas foram realizadas em tampão contendo 25mM de Tris-HCl, 192mM de glicina e 0,1% de SDS, pH 8,3, em uma amperagem de 15 mA/gel por 20 min, e em seguida 30 mA/gel até o final da corrida.

3.4.6 Coloração dos géis

Após o término da corrida de eletroforese, os géis foram fixados em solução 40% de metanol e 10% ácido acético. Em seguida, os géis foram corados com solução *Coomassie Blue Colloidal* (8% de sulfato de amônio, 0,8% de ácido fosfórico, 0,08% de Coomassie Blue G250 e 20% de metanol), por no mínimo 72 horas e descorados em água até a obtenção de bandas ou *spots* visíveis.

3.4.7 Aquisição e análise das imagens

Os géis foram digitalizados pelo equipamento “ImageScanner” (GE Healthcare), utilizando filtro verde, modo transparente e 300dpi de resolução. A detecção das bandas do gel 1D foi feita através do *software* ImageQuant TL versão 7.0 (GE Healthcare) e a detecção de intensidade, volume e área, assim como a contagem dos *spots* correspondentes às várias proteínas presentes nos géis bidimensionais foi feita através do programa “Image Master 2D Platinum” (GE Healthcare). A detecção geral dos *spots* inicialmente se fez de modo automático, através do sinal de intensidade do pixel. Posteriormente, foram empregadas correções manuais das quais foram selecionados os verdadeiros *spots*.

3.4.8 Processamento dos géis

Após a eletroforese unidimensional e coloração, o gel foi dividido em 21 partes, garantindo a maior cobertura da amostra (incluindo proteínas de alto e baixo peso molecular). Cada uma das partes do gel, assim como os *spots* mais intensos provenientes do gel bidimensional (que constituem cerca de 20% dos *spots*), foi selecionada para identificação por espectrometria de massas. O protocolo utilizado consistiu em descorar os fragmentos do gel com solução de 50% metanol e 5% ácido acético em temperatura ambiente *overnight*, desidratar o gel com acetonitrila 100%, reduzir as proteínas por incubação com solução de DTT 10mM e bicarbonato de amônio 100mM por 30 min, alquilar as proteínas (no escuro) com adição de solução de iodoacetamida 50mM com bicarbonato de amônio 100mM e desidratar o gel novamente com acetonitrila 100%. Em seguida, o gel foi reidratado com bicarbonato de amônio 100mM durante 10 min, desidratado novamente e por fim, foram adicionados 16µL da enzima tripsina (50ng/µL em bicarbonato de amônio 50 mM gelado) durante 30 minutos em banho de gelo. Após a retirada do excesso de enzima, foi acrescentado bicarbonato de amônio 50mM e a digestão foi realizada a 37 °C *overnight*. Para a extração dos peptídeos, incubou-se este com ácido fórmico 5% por 10 min à temperatura ambiente e o sobrenadante com 12µL de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% por duas vezes. Após concentrar a amostra em *Speed Vac*

(Eppendorf) por aproximadamente 40 min, esta foi dessalinizada em coluna Zip Tip (Millipore) e foram ressuspensas em 15 µL de uma solução de ácido fórmico 0,1% para análise por espectrometria de massas.

3.4.9 Análise por espectrometria de massas

Os peptídeos provenientes da digestão trípica foram injetados (4,5 µL) em uma pré-coluna (Thermo - C18 de 5 µm, 2 cm x 100 µm) acoplada ao nano HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High-performance liquid chromatography*) (NanoLC-1DPlus, Proxeon). A separação foi realizada em gradiente 2-50% de acetonitrila em ácido fórmico 0.1% por 45 min. Os peptídeos eluídos foram separados e analisados em espectrômetro de massa LTQ (do inglês *Linear Trap Quadrupole*) XL (Thermo Scientific) e em LTQ Velos Orbitrap (Thermo Scientific), sendo que os 10 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) e todos os íons foram analisados em modo positivo de ionização.

As amostras peptídicas provenientes dos *spots* do gel 2D ressuspensas em ácido fórmico 0,1% foram injetadas (4,5 µL) no espectrômetro de massas ESI-Q-TOF-MS (do inglês *Liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry*) - (Waters) através de um cromatógrafo nano (nanoAcquity, Waters) a ele acoplado. Sucintamente, as amostras dessalinizadas foram concentradas usando uma pré-coluna (Symmetry C18, 180 µm x 20 mm -Waters) e a separação dos peptídeos foi realizada em coluna capilar de fase reversa C18 (10cm x 75 µm - Waters) a um fluxo de 600 nL/min. Os peptídeos foram eluídos da coluna em um gradiente linear de 5% a 40% de fase móvel (ácido fórmico 0.1% em 100% de acetonitrila) durante 15 min e por mais 4 min até 80% dessa fase. Estes peptídeos foram diretamente injetados no espectrômetro de massas via *electrospray*. Os espectros MS/MS dos dez picos mais intensos com duas a quatro cargas na função MS foram adquiridos automaticamente, no modo de aquisição dependente dos dados (DDA). A voltagem do capilar e do cone de referência era 3,2 V e 100 V respectivamente. Todas as análises foram efetuadas em modo positivo de ionização.

Os espectros foram adquiridos de 50-2000m/z. As massas foram corrigidas usando como *lock mass* o massa/carga (*m/z*) 784,823 e os dados convertidos em formato pkl no programa ProteinLynx Global Server (Waters).

O resultado obtido foi a uma lista de valores que correspondem à razão *m/z* de cada peptídeo fragmentado, o PMF, que é característico de cada proteína, o que permite sua identificação após comparação com digestão *in silico* nos bancos de dados. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massas do Centro de Toxinologia Aplicada CAT/CEPID- Instituto Butantan.

3.4.10 Identificação das proteínas

Os dados em formato “.raw” foram processados utilizando *Trans Proteomic Pipeline* (TPP) do Instituto de Biologia Sistêmica (Seattle Proteome Center-EUA). A identificação das proteínas foi realizada por comparação dos valores de PMF de cada amostra com valores de PMF resultantes da digestão trípica teórica de uma série de proteínas depositadas em banco de dados. Para a identificação, utilizou-se a ferramenta “Mascot” (disponível em www.matrixscience.com) e “Sequest/Proteome Discover” (Thermo Scientific) em uma busca no banco de dados “SwissProt” com um erro tolerável para massa do peptídeo de $\pm 1,5$ Da e de $\pm 0,8$ Da para massa do fragmento, além de limitar os resultados às proteínas pertencentes à espécie *Homo Sapiens* (humano). Outros parâmetros utilizados foram carbamydomethyl como modificação pós traducional fixa e oxidação da metionina como modificação variável, uma perda de clivagem e valores de massa monoisotópica. Para dados oriundos do LTQ Velos Orbitrap, foi estipulada tolerância MS1 de 10 ppm e MS2 de 0.8 Da.

3.4.11 Análise funcional de proteínas

A análise funcional das proteínas identificadas foi realizada utilizando-se ferramentas de bioinformática “Uniprot” (disponível em www.uniprot.org), para obtenção de informações como o código de acesso da proteína, descrição da localização celular, funções moleculares e os processos biológicos envolvidos.

3.4.12 Análise da expressão de genes em tecido específico

A análise da escala de expressão e regulação de genes codificadores de proteínas identificadas na via canônica “Resposta de Fase Aguda – Ingenuity” foi avaliada através do bando de dados TIGER – *Tissue-specific Gene Expression and Regulation*, da Faculdade de Medicina da Universidade Johns Hopkins, Estados Unidos (disponível em <http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/>).

3.4.13 Análise de redes de vias de sinalização e vias canônicas relacionadas

Para analisar as principais redes de sinalização e vias canônicas relacionadas às proteínas identificadas em um contexto biológico, o programa *Ingenuity Pathways analysis* (IPA) versão 8.0-2602 (Ingenuity Systems) foi utilizado, com avaliação “core analysis”. Os filtros selecionados foram proteínas de “Espécie humana e não categorizado” e “Tecidos”: fígado, coração, rim e todas as caracterizações de células imunológicas (Ex: células T citotóxicas, células dendríticas, células Th1 e Th2, células T *helper* ativadas, células T de memória central/efetora, linfócitos B, neutrófilos, entre outras). Os resultados obtidos são expressos em um *score* em escala - $\log(P \text{ value})$ gerado com base na distribuição hipergeométrica e calculado pelo teste exato de Fischer, e corresponde as chances das moléculas estarem presentes na rede gênica ao acaso. A partir de dados da literatura, os resultados significativos foram racionalizados com as análises da bioinformática para compreensão da relação na EMF.

RESULTADOS

4. Resultados

Os resultados aqui presentes estão subdivididos em duas partes:

- 1) Caracterização demográfica, com dados clínicos e laboratoriais sobre resposta inflamatória do grupo de pacientes com EMF analisados.
- 2) Resultados da análise proteômica contendo as identificações das proteínas por espectrometria de massas e análises dos dados *in silico*.

4.1 Avaliação de dados clínicos da capacidade cardíaca e laboratoriais sobre resposta inflamatória na endomiocardiofibrose

4.1.1 Caracterização da população de estudo: dados demográficos e clínicos dos pacientes com endomiocardiofibrose

Neste estudo foram analisados os históricos clínicos e laboratoriais de 27 pacientes diagnosticados com EMF. De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, o grupo de pacientes é composto em sua grande maioria por indivíduos do gênero feminino - 24 pacientes (89%) e com média de idade para o diagnóstico de $48,4 \pm 14,1$ anos de idade. Quanto ao indicador de escolaridade que reflete as condições socioeconômicas dos pacientes, 60% possuem escolaridade inferior ao ensino fundamental.

O levantamento das comorbidades associadas no grupo de pacientes analisados (baseado no prontuário clínico dos pacientes) indicou que 14/27 (51%) pacientes apresentam HAS, 10/27 (37%) hipotireodismo, 2/27 (7%) doenças reumatológicas, 4/27 (14%) diabetes mellitus tipo II e 1/27 (3%) dislipidemia. Considerando doenças relacionadas à resposta imune, 3/27 (11%) apresentam algum DAI e 4/27 (14%) apresentaram histórico de asma e/ou alergias, conforme apresentado na Figura 4.

Figura 4- Comorbidades associadas ao grupo de pacientes com endomiocardiofibrose. O levantamento dos históricos clínicos foi realizado a partir dos dados relatados no prontuário do sistema eletrônico do InCor, Si3. DAI (doença autoimune).

Foi observado baixo número de relatos sobre distúrbios de coagulação, sendo 2/27 pacientes (EMF 14 e EMF 18) com histórico de tromboembolismo e 2/27 pacientes (EMF 25 e EMF 29) com antecedentes de plaquetopenia (provavelmente associado ao excesso de consumo de plaquetas no endomiocárdio pela formação de trombos murais). Por fim, 2/27 pacientes apresentaram outra doença relacionada à fibrose, sendo estas: fibroma uterino e fibrose pulmonar – como efeito adverso à droga.

Tabela 2 – Dados demográficos de pacientes com endomiocardiofibrose

Pacientes	Idade (anos)	Gênero	Escolaridade	Comorbidades associadas	Amostra
EMF 05	52	M	analfabeto	Lúpus Eritomatoso e hepatopatias	TC
EMF 08	28	F	< 10 anos	Hipotireoidismo e HAS	TC/So/P
EMF 09	42	F	11 anos	Hipotireoidismo e fibroma uterino	TC
EMF 10	60	F	<4 anos	Asma, alergias e HAS	TC/So/P
EMF 34	41	F	<4 anos	HAS	TC/So
EMF 11	36	F	...	...	So/P
EMF 12	52	F	<4 anos	Hipotireoidismo e HAS	So/P
EMF 13	44	F	< 10 anos	Hipotireodismo, nefropatias e artrite reumatóide	So/P
EMF 14	22	M	<4 anos	Hipotireoidismo, HAS, tromboembolismo	So/P
EMF 15	70	F	...	HAS e hipotireoidismo	So/P
EMF 16	42	F	...	Hipotireoidismo	So/P
EMF 17	66	F	analfabeto	Desnutrição, diabetes, colecistopatia, HAS e gastrite	So/P
EMF 18	48	F	< 10 anos	Hipotireoidismo, tromboembolismo e nefropatia	So/P
EMF 19	...	F	<4 anos	...	So/P
EMF 20	66	F	...	Diabetes e HAS	So/P
EMF 21	36	F	<4 anos	Alergias e HAS	So/P

Conclusão da Tabela 2 - Dados demográficos de pacientes com endomiocardiofibrose

Pacientes	Idade (anos)	Gênero	Escolaridade	Comorbidades associadas	Amostra
EMF 22	67	F	<4 anos	Nefropatias	So/P
EMF 23	31	F	...	HAS	So/P
EMF 24	66	F	...	Diabetes	So/P
EMF 25	63	F	11 anos	Alergias, colagenose, plaquetopenia e dermatite	So/P
EMF 26	35	F	...	Asma, alergias, tuberculose pulmonar e HAS	So/P
EMF 27	62	F	<4 anos	Hipotireoidismo, asma, diabetes e HAS	So/P
EMF 28	48	F	<4 anos	Fibrose pulmonar (efeito adverso à droga) e dispilipemias	So/P
EMF 29	30	M	<4 anos	Plaquetopenia crônica e hiperuricemia	So/P
EMF 30	56	F	<4 anos	...	So/P
EMF 31	54	F	<4 anos	Hipotireoidismo, asma e HAS	So/P
EMF 32	45	F	<4 anos	HAS	So/P
EMF 33	...	F	<4 anos	...	So/P

FONTE: Prontuário eletrônico Si3 – InCor. **Legendas:** F (feminino), M (masculino), So (soro), P (plasma), TC (tecido cardíaco), três pontos (...) dado desconhecido, HAS (hipertensão arterial sistêmica).

Escolaridade: 1º grau incompleto ≤4 anos, 2º grau incompleto ≤10 anos, 2º grau completo = 11 anos

4.1.2 Dados sobre capacidade e comprometimento cardíaco nos pacientes com endomiocardiofibrose

Como parâmetros indicativos da função miocárdica pelo ECO, foram avaliados os valores da FE, a função diastólica, a presença de regurgitação valvar, assim como qual(is) o(s) ventrículo(s) afetado(s); o ritmo foi avaliado pelo ECG, o tempo decorrido entre o diagnóstico da EMF e a cirurgia para ressecção da fibrose ou até o óbito do paciente foi estabelecido com base nos dados de prontuário médico. Para essa análise, foi utilizado o ECO mais próximo à data de coleta da amostra de sangue de cada paciente.

Conforme apresentado na Tabela 3, observou-se que o comprometimento dos ventrículos pela EMF ocorreu em 44% dos pacientes no VE, para 26% dos pacientes no ventrículo direito (VD) e 30% apresentaram fibrose em ambos os ventrículos (biventricular). Quanto aos indicadores de função cardíaca, 6/27 dos pacientes (22,2%) apresentaram valores de FE comprometidos - inferiores à faixa de normalidade ($FE \leq 55\%$). A presença de insuficiência valvar (mitral “-IM” ou tricúspide “-IT”) ocorreu em 25/27 (92,6%) dos pacientes com EMF, sendo que 16/27 (59,2%) apresentavam alteração na função de ambas as valvas. A maior parte dos pacientes apresentava IM de grau discreto: 15/27 (55,5%), e 10/27 apresentavam IT discreta (37%). Quanto à análise da função diastólica, não foi possível avaliá-la em 4/27 pacientes, devido à presença de marcapasso ou bioprótese valvar. Dentre os pacientes que foram submetidos a esta avaliação, 6/23 (26%) apresentavam função diastólica preservada enquanto que 14/23 (60,9%) apresentaram disfunção diastólica, com comprometimento de 3/23 pacientes em grau 1 (alteração do relaxamento), 4/23 em grau 2 (pseudonormal) e 7/23 em grau 3 de disfunção diastólica (padrão restritivo). Por fim, 6/27 pacientes (22,2%) apresentaram fibrilação atrial (FA). O tempo decorrente entre o diagnóstico e cirurgia/óbito do paciente variou de 1 - 20 anos, com uma média de 10,9 anos e desvio padrão de $\pm 5,6$ anos.

Tabela 3. Dados clínicos de pacientes com endomiocardiopatia

Paciente	Lesão	FE (%)	Ritmo	Função diastólica	NYHA	Anos entre diagnóstico e desfecho	Valva mitral	Valva tricúspide	Desfecho
EMF 05	VD/VE	67	sinusal	Disfunção grau 3	3	1	discreto	discreto	óbito
EMF 08	VD	74	sinusal	normal	2	1	discreto	discreto	cirurgia
EMF 09	VD/VE	62	sinusal	Disfunção grau 3	1	3	moderada	discreto	cirurgia
EMF 10	VE	68	FA	ND**	3	12	importante	normal	cirurgia
EMF 11	VD	66	sinusal	normal	2	ND	discreto	discreto	óbito
EMF 12	VD	65	marcapasso	ND*	2	1	discreto	moderado	cirurgia
EMF 13	VD	77	sinusal	normal	1	4	discreto	ND	NA
EMF 14	VD	67	FA	Disfunção grau 1	2	20	discreto	normal	NA
EMF 15	VE	69	sinusal	Disfunção grau 2	2	7	normal	normal	NA
EMF 16	VD	80	FA	normal	1	ND	discreto	normal	NA
EMF 17	VD/VE	50	sinusal	Disfunção grau 3	2	5	moderado	importante	NA
EMF 18	VD/VE	60	FA	Disfunção grau 3	4	3	importante	moderado	cirurgia
EMF 19	VD/VE	57	marcapasso	ND*	2	6	discreto	normal	cirurgia
EMF 20	VE	ND	sinusal	Disfunção grau 3	3	3	ND	ND	NA
EMF 21	VD/VE	61	sinusal	ND**	2	2	normal	importante	cirurgia
EMF 22	VE	61	sinusal	Disfunção grau 1	2	ND	discreto	discreto	óbito
EMF 23	VD/VE	65	sinusal	Disfunção grau 2	1	ND	moderado	discreto	cirurgia

Conclusão da Tabela 3 - Dados clínicos de pacientes com endomiocardiofibrose

Paciente	Lesão	FE (%)	Ritmo	Função diastólica	NYHA	Anos entre diagnóstico e desfecho	Valva mitral	Valva tricúspide	Desfecho
EMF 24	VE	74	sinusal	Disfunção grau 3	2	14	discreto	normal	NA
EMF 25	VD/VE	73	sinusal	normal	2	ND	discreto	moderado	óbito
EMF 26	VE	64	sinusal	Disfunção grau 2	2	1	moderado	discreto	cirurgia
EMF 27	VE	45	sinusal	Disfunção grau 1	2	4	discreto	discreto	cirurgia
EMF 28	VD	80	sinusal	ND	1	16	normal	normal	NA
EMF 29	VE	54	FA	ND	2	ND	moderado	moderado	cirurgia
EMF 30	VE	34	FA	ND		11	moderado	moderado	cirurgia
EMF 31	VE	50	Flutter atrial	normal	2	2	discreto	normal	cirurgia
EMF 32	VE	67	sinusal	Disfunção grau 3	2	1	moderado	discreto	cirurgia
EMF 33	VE	40	sinusal	Disfunção grau 2	1	5	discreto	normal	NA
EMF 34	VD/VE	50	sinusal	ND	3	1	discreto	discreto	óbito

FONTE: Prontuário eletrônico do Instituto do Coração - Si3.

Legenda: FE (Fração de Ejeção – valor de referência $\geq 55\%$); Destacados em negrito: índices fora dos valores de referência Desfecho (casos de óbito ou cirurgia de ressecção da fibrose); VD (ventrículo direito); VE (ventrículo esquerdo); FA (fibrilação atrial); ND (Informação não disponível no Si3/exames); ND* (Informação não disponível pela presença de marcapasso); ND** (Informação não disponível pela presença de plastia de valva). NA (Não se aplica – Paciente não foi submetida à cirurgia e segue em acompanhamento no ambulatório da Instituição). Obs.: EMF 23 e 29 foram encaminhados à cirurgia, mas não há registro da data do diagnóstico.

4.1.3 Eosinofilia em sangue periférico em pacientes com endomiocardiofibrose

A presença de EP foi avaliada através do número de eosinófilos presentes na contagem diferencial de leucócitos em hemogramas disponíveis no Si3, durante um período de 10 anos em acompanhamento ambulatorial. Para esta análise, considerou-se EP as contagens a partir de 500 eosinófilos/mm³ de sangue (limiar utilizado pelo HC – FMUSP). Conforme apresentado na Figura 5, durante todo o acompanhamento ambulatorial o número de pacientes EMF que apresentaram picos superiores ao limiar de EP é de 9/27, correspondente a 33,3% dos indivíduos estudados.

Figura 5 – Menor e maior contagem de eosinófilos no sangue periféricos em pacientes com endomiocardiofibrose. Com base nos resultados de hemogramas disponíveis no Si3 e utilizando como valor de referência de 500 eosinófilos/mm³, observou-se que 9 pacientes apresentaram EP ao longo do acompanhamento ambulatorial.

Ainda com base nos números de eosinófilos no sangue periférico, 3/27 (11,1%) pacientes apresentaram mais de 500 eosinófilos/mm³ no mesmo ano do diagnóstico (Anexo B). A média de eosinófilos no diagnóstico foi de 297,3 eosinófilos/mm³ com desvio padrão de ± 386 .

4.1.4 Determinação de citocinas plasmáticas predominantes na endomiocardiofibrose

As citocinas circulantes no plasma de pacientes com EMF foram mensuradas com a finalidade de avaliar o perfil de citocinas predominantes na EMF. Para isso, foram quantificadas as citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10 por citometria de fluxo.

Todos os pacientes analisados apresentaram níveis detectáveis de pelo menos uma citocina no plasma sanguíneo, sendo que 25/27 pacientes (92,6%) apresentaram níveis detectáveis de TNF- α , 24/27 pacientes (88,8%) apresentaram níveis de IL-4, seguidos de 21/27 pacientes (77,7%) com níveis de IL-10 e IL-6, conforme Tabela 4. IFN- γ (33,3%) e IL-2 (25,9%) foram as citocinas menos presentes nas amostras, respectivamente.

Analisando o conjunto de citocinas simultaneamente expressas por cada paciente, foram observadas diferenças nos padrões de expressão de citocinas entre o grupo, que se deve especialmente pela presença de níveis de IL-2 e IFN- γ em parte das amostras. É importante ressaltar que 5/27 (18,5%) pacientes (EMF 11, 14, 29, 32 e 33) apresentaram níveis detectáveis de todas as citocinas analisadas.

Tabela 4 – Perfil de citocinas plasmáticas de pacientes com endomiocardiofibrose

Pacientes	IL-10	IL-4	IL-6	TNF-α	IFN-γ	IL-2
EMF 11	4,71	15,81	6,52	5,69	10,08	5,44
EMF 29	20,41	23	14,95	16,79	30,9	10,27
EMF 32	3,97	13,73	9,6	4,02	18,62	4,36
EMF 33	18,84	32,75	22,49	11,65	15,2	15,22
EMF 13	8,97	3,8	21,25	0,9	0	0
EMF 15	4,05	3,96	3,97	2,61	0	1,71
EMF 17	3,64	2,84	3,81	0,93	0	0
EMF 16	5,79	1,52	3,06	0,66	0	0
EMF 21	3,17	2,54	3,5	1,05	0	0
EMF 28	3,23	0,32	26,05	0,44	0	0
EMF 18	4	1,84	0	1,09	0	0
EMF 24	3,02	1,68	1,06	0,59	0	0
EMF 25	11,85	0,9	1,5	0,6	0	0
EMF 19	1,43	1,1	3,28	1,29	1,54	0
EMF 08	0	3,87	1,58	1,86	0	0,6
EMF 20	0	2,62	2,32	2,2	2,5	0
EMF 14	4,33	1,22	1,19	16,53	148,36	13,74
EMF 09	2,21	1,58	0	0,49	0	0
EMF 12	0	1,95	1,19	0,83	3,08	0
EMF 36	1,28	0,8	1,17	1,44	0	0
EMF 23	0	1,13	0	1,18	0	0
EMF 27	0	0	0	1,05	0	0
EMF 30	1,05	0,53	0	0,51	0	0
EMF 31	0	0	0	0,32	0	0
EMF 26	0,59	1,95	0	0	1,7	0
EMF 10	2,88	1,17	0,58	0	0	0
EMF 22	1,61	0	3,07	0,03	0	0
% de plasmas positivos	77,7	88,8	74	92,6	33,3	25,9
Média (pg/mL)	4,11	4,54	4,89	2,77	8,59	1,90
Desvio Padrão	5,27	7,78	7,43	4,64	28,87	4,30
Mediana	3,02	1,68	1,58	1,05	0	0

Legenda: EMF (endomiocardiofibrose). Valores em pg/mL. Quantificação de citocinas por citometria de fluxo.

Os níveis de citocinas no plasma dos pacientes com EMF (Tabela 4) foram comparados aos níveis presentes em um grupo de indivíduos saudáveis (Tabela 5). Enquanto os indivíduos saudáveis apresentaram baixos níveis de citocinas, com exceção de um indivíduo que apresentou IL-6, os pacientes com EMF apresentaram uma distribuição dos níveis de citocinas que indicam uma tendência pró-inflamatória (Figura 6), com diferença significativa dos níveis das citocinas IL-6 ($P=0,03$), TNF- α ($P=0,002$) e IL-10 ($P=0,009$) entre os grupos (Teste de Mann Whitney).

Tabela 5 – Perfil de citocinas plasmáticas nos controles saudáveis

Controles	IL-10	IL-4	IL-6	TNF α	IFN γ	IL-2
CS 1	1,94	1,77	6,17	0	0	0
CS 2	0	0,35	0	0,61	0	0
CS 3	2,09	1,52	0	1	0	0
CS 4	0	0	1,95	0,08	0	0
CS 5	0	0,715	0	0	0	0
CS 6	0	0,67	0	0,07	0	0
CS 7	0	1,19	0	0	0	0
CS 8	0,64	1,71	0	0,32	0	0
Média	0,58	0,99	1,02	0,26	0	0
Desvio					0	0
Padrão	0,91	0,66	2,19	0,37		
Mediana	0,00	0,95	0,00	0,08	0	0

Legenda: CS (controles saudáveis). Valores em pg/mL. Quantificação de citocinas por citometria de fluxo.

Figura 6 - Níveis plasmáticos de citocinas Th1/Th2 de pacientes com endomiocardiofibrose. Os níveis de citocinas plasmáticas foram mensurados por citometria de fluxo, comparando grupo de pacientes EMF e controles saudáveis. Os resultados estão apresentados em pg/mL e as barras apresentam a média de cada grupo com o respectivo desvio padrão. O teste Mann Whitney foi usado para a análise estatística e valores $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4.1.4.1 Correlação de citocinas

Foram observadas correlações positivas e moderadas entre os níveis de todas as citocinas avaliadas no presente trabalho, com exceção de TNF- α e IFN- γ ($P=0,8$), inclusive entre os níveis de IL-10 com o das outras citocinas nos pacientes com EMF (Figuras 7, 8 e 9). A citocina mais fortemente correlacionada com os níveis de IL-10 foi IL-6 ($R=0,66$ e $P<0,0001$ – Teste de Spearman).

Figura 7 – Correlação dos níveis de IL-6 plasmáticos com os níveis de citocinas pró-inflamatórias na endomiocardiofibrose. As citocinas foram quantificadas por citometria de fluxo. Foram correlacionados os níveis (pg/mL) de IL-6 com as citocinas TNF- α , IL-4, IL-2 e IFN- γ em pacientes com EMF (N=27). Foram observadas correlações significativas e positivas em todas as análises ($P<0,5$) - teste não paramétrico de Spearman.

Figura 8 – Correlação dos níveis de TNF- α , IL-4 e IL-2 plasmáticos com os níveis de citocinas pró-inflamatórias na endomiocardiofibrose. As citocinas foram quantificadas por citometria de fluxo. Foram correlacionados os níveis (pg/mL) de TNF- α com as citocinas IL-4, IL-2 e IFN- γ , os níveis (pg/mL) de IL-4 com IL-2 e IFN- γ e os níveis (pg/mL) de IL-2 com IFN- γ em pacientes com EMF (N=27). Foram observadas correlações significativas e positivas em todas as análises, com exceção de TNF- α e IFN- γ ($P=0,8$) - teste não paramétrico de Spearman

Figura 9 – Correlação dos níveis de IL-10 plasmáticos com os níveis de citocinas pró-inflamatórias na endomiocardiofibrose. As citocinas foram quantificadas por citometria de fluxo. Foram correlacionados os níveis (pg/mL) de IL-10 com as demais citocinas em pacientes com EMF (N=27). Foram observadas correlações significativas e positivas em todas as análises ($P<0,5$) - teste não paramétrico de Spearman.

4.1.5 Dosagem de proteína C reativa ultrasensível

Sabendo-se que a expressão de proteínas de fase aguda é induzida por citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , e que estas estão presentes em processos inflamatórios, foi realizada quantificação dos níveis de PCRus plasmática de pacientes com EMF e de indivíduos saudáveis, uma vez que esta proteína é um dos principais biomarcadores para atividade inflamatória utilizados na prática clínica.

Os níveis de PCRus no grupo de pacientes com EMF analisados foi de $6,30 \pm 9,79$ mg/L, enquanto que no grupo de indivíduos saudáveis foi de $0,64 \pm 0,49$ mg/L. De acordo com a Figura 10, observou-se uma diferença significativa ($P=0,0006$) entre os níveis de PCRus entre os dois grupos comparados.

Figura 10- Níveis de proteína C reativa em pacientes com endomiocardiofibrose e indivíduos saudáveis. A dosagem de PCRus foi realizada no plasma de pacientes com EMF (N=24) e indivíduos saudáveis (N=8) através do método de imunonefelometria. Os resultados são apresentados em mg/L e as barras apresentam a média de cada grupo com seu respectivo desvio padrão. O teste Mann Whitney foi usado para a análise estatística. O $P=0,0006$ foi considerado significativo.

4.1.6 Quantificação de imunoglobulina E total sérica

Níveis circulantes de IgE total em pacientes com EMF (N=27) foram quantificados em comparação aos de indivíduos saudáveis (N=8). Conforme apresentado na Figura 11, a distribuição dos níveis de IgE total em pacientes com EMF é semelhante aos níveis de IgE total no grupo controle, sem diferença estatística entre as duas populações, com um $P=0,83$ (teste de Mann-Whitney).

Figura 11 - Níveis de IgE total em soro de pacientes com endomiocardiofibrose e grupo controle. Comparação da distribuição dos níveis de IgE total com grupo controle. Níveis de IgE total foram mensuradas *in vitro* – ImmunoCAP 100. Os resultados estão apresentados em kU/l e as barras apresentam a média de cada grupo com o respectivo desvio padrão. A diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,83$). O limiar considerado foi de 200 kU/l.

4.1.7 Quantificação de imunoglobulina E alérgeno-específico

A sensibilização mediada por IgE contra alérgenos específicos nos pacientes com EMF analisados foi analisada através dos níveis de IgE específica contra alérgenos ambientais prevalentes. Conforme disposto na Tabela 6, houve reconhecimento *Blomia tropicalis* (Blotr) e *D. pteronyssinus* (Derpt) pelo soro de 5 e

7 pacientes, respectivamente, totalizando 7/27 (25%) pacientes EMF sensibilizados para aero-alérgenos da poeira doméstica. Também foram avaliados a presença de IgE específico contra alérgenos presentes em helmintos presentes em nosso ambiente. Três pacientes com EMF (3/27 – 11,1%) apresentaram níveis de IgE específico contra alérgenos de *Ascaris lumbricoides* e *Echinococcus* sp.

Em complemento, não foi observado reconhecimento para tropomiosina, um alérgeno conservado no processo evolutivo, alvo de reações cruzadas entre ácaros e helmintos, por nenhum paciente do grupo avaliado. Ao todo, 8/27 (29%) dos pacientes EMF apresentam níveis detectáveis de IgE alérgeno-específico. Quanto à intensidade de respostas, 2/27 (7,4%) pacientes (EMF 09 e EMF 10) apresentaram níveis de IgE específica mais pronunciadas (*Score* > 3) (Tabela 6).

Tabela 6 – Níveis de IgE específico aos alérgenos testados em pacientes com endomiocardiofibrose

Paciente	Blotr	Derpt	Ascaris	Echinococcus	Trop
EMF 08	0	1	0	0	0
EMF 09	3	5	0	0	0
EMF 10	3	3	3	2	0
EMF 13	2	2	0	0	0
EMF 18	0	2	0	0	0
EMF 20	0	0	1	0	0
EMF 31	2	2	0	0	0
EMF 34	1	1	0	2	0

FONTE: Kit diagnóstico de IgE específica – ImmunoCAP® (Phadia). **Legenda:** Derpt (*Dermatophagoides pteronyssinus*); Blotr (*Blomia tropicalis*). **Níveis de IgE específico:** 0 – ausente/indetectável (0-0,35kUA/l); 1 – baixa (0,35-0,70 kUA/l); 2 – moderada (0,70-3,50 kUA/l); 3 – elevado (3,50-17,50 kUA/l); 4 – muito elevado (17,50-50 kUA/l); 5 – muito elevado (50-100 kUA/l). Valores $\geq 0,35$ kU/l são considerados positivos.

4.2 Análise proteômica

4.2.1 Perfil de expressão proteica no tecido acometido pela fibrose em pacientes com endomiocardiofibrose

Para a análise do perfil de proteínas presentes na EMF, foram utilizadas amostras de biópsias de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica da fibrose (N=4). Após a separação das proteínas por meio de gel 1D e 2D e digestão das bandas e *spots* escolhidos, os peptídeos gerados foram identificados por espectrômetros de massa. As amostras resultantes da separação por gel 1D foram submetidas em espectrômetros do tipo Orbitrap e LTQ Velos acoplados a uma cromatografia líquida (LC-MS/MS), enquanto que os *spots* (N= 44) presentes no gel 2D foram submetidos a espectrômetro do tipo *Eletrospray Ion Trap* acoplado a uma cromatografia líquida. Os resultados adquiridos foram submetidos ao banco de dados de proteína (NCBI - *Homo sapiens*) utilizando o programa “Mascot” (<http://www.matrixscience.com>) para a identificação das proteínas. Dos 44 *spots* selecionados foram identificadas 93 proteínas distintas (Anexo W), enquanto que a partir do gel 1D foram identificadas 96 (Anexo V), totalizando 140 proteínas identificadas por ambas a técnicas.

Os dados gerados pelas ferramentas Mascot e ExPASy (identificação da proteína com código de acesso, PM, pI teórico) estão resumidos na Tabela 7. As proteínas identificadas foram divididas de acordo com o principal processo biológico envolvido.

Tabela 7- Proteínas identificadas no tecido fibroso do endomiocárdio de pacientes com endomiocardiofibrose

Gene	Proteína	Massa/pI	Código acesso UniProtKB/Swiss- Prot	Método separação (gel)
1. Proteínas estruturais e contráteis (endomiocárdio)				
MYL3	Myosin light chain 3	22089/5,03	(P08590)	1D e 2D
MYH7	Myosin 7	22300/5,8	(P12883)	1D
MYL6	Myosin light polypeptide 6	17090/4,56	(P60660)	2D
MYL10	Myosin regulatory light chain 10	17090/4,56	(Q9BUA6)	2D
ACTS	Actin, alpha skeletal muscle	42372/5,23	(P68133)	2D
ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1	42334/5,23	(P68032)	2D
ACTH	Actin, gamma-enteric smooth muscle	41800/5,48	(P63267)	1D
ACTA	Actin, aortic smooth muscle	42000/5,39	(P62736)	1D
ACTB	Actin, cytoplasmatic 1	42058/5,29	(P60709)	1D/2D
ACTBL	Beta-actin-like protein 2	42324/5,39	(Q562R1)	2D
TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	32746/4,69	(P09493)	2D
TPM2	Tropomyosin beta chain	32945/4,66	(P07951)	2D
TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain	32856/4,68	(P06753)	2D
TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	28619/4,67	(P67936)	2D
AINX	Alpha-internexin	55528/5,34	(Q16352)	2D
DESM	Desmin	53560/5,21	(P17661)	2D
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	49907/5,42	(P14136)	2D
TITIN	Titin	3812700/6,35	(Q8WZ42)	1D
FLNA	Filamin-A	280600/6,06	(P21333)	1D
DIAP1	Protein diaphanous homolog 1	141942/5,31	(O60610)	2D
TBB4A	Tubulin beta-4A chain	49600/4,88	(P04350)	1D
VIME	Vimentin	53676/5,05	(P08670)	1D/2D

Gene	Proteína	Massa/pI	Código acesso UniProtKB/Swiss- Prot	Método separação (gel)
2. Metabolismo geral				
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36201/8,58	(P04406)	1D/2D
ENOA	Alpha-enolase	47481/6,99	(P06733)	1D/2D
ENOB	Beta-enolase	47244/7,73	(P13929)	2D
APOA1	Apolipoprotein A-I	30759/5,56	(P02647)	1D/2D
APOA4	Apolipoprotein A-IV	45400/5,38	(P06727)	1D
APOE	Apolipoprotein E	36246/5,52	(P02649)	1D/2D
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	39400/8,09	(P04075)	1D
HPT	Haptoglobin	45200/6,58	(P00738)	1D
TXTP	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	34333/9,91	(P53007)	2D
IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	40022/5,71	(P50213)	2D
PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	39700/5,22	(P27169)	1D
AAKG1	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma 1	37727/6,42	(P54619)	2D
PLIN2	Perilipin-2	48274/6,34	(Q99541)	2D
LIPH	Lipase member H	51568/6,94	(Q8WWY8)	2D
GLGB	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	80807/5,87	(Q04446)	2D
3. Fosforilação oxidativa e transporte de elétrons				
ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56525/5,26	(P06576)	1D/2D
ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59828/8,28	(P25705)	1D/2D
EFTU	Elongation factor Tu, mitochondrial	49500/7,61	(P49411)	1D
KCRM	Creatine kinase M-type	43302/6,77	(P06732)	2D

Gene	Proteína	Massa/pI	Código acesso UniProtKB/Swiss- Prot	Método separação (gel)
4. Resposta ao estresse e apoptose				
CRYAB	Alpha Crystallin B chain	20146/6,76	(P02511)	1D/2D
A1AT	Alpha-1-antitrypsin	46878/5,37	(P01009)	1D/2D
HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	85006/4,94	(P07900)	1D/2D
HSPB1	Heat shock protein beta-1	22826/5,98	(P04792)	2D
FNIP2	Folliculin-interacting protein 2	123634/6,2	(Q9P278)	2D
1433Z	14-3-3 protein zeta/delta	27889/4,73	(P63104)	2D
OBSCN	Obscurin	879630/5,69	(Q5VST9)	2D
PTEN	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase PTEN	47706/5,94	(P60484)	2D
SAMP	Serum amyloid P-component	25485/6,12	(P02743)	1D/2D
5. Resposta imune				
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098/4,53	(P02765)	1D/2D
IGHA1	Ig alpha-1 chain C region	37600/6,51	(P01876)	1D
IGHA2	Ig alpha-2 chain C region	36500/6,10	(P01877)	1D
IGKC	Ig kappa chain C region	11773/5,58	(P01834)	1D
LAC1	Ig lambda-1 chain C regions	11512/7,89	(P0CG04)	2D
LAC2	Ig lambda-2 chain C regions	11458/6,91	(P0CG05)	1D/2D
LAC7	Ig lambda-7 chain C region	11300/8,28	(A0M8Q6)	1D
LV302	Ig lambda chain V-III region LOI	12042/4,94	(P80748)	1D/2D
KV113	Ig kappa chain V-I region Lay	11800/7,96	(P01605)	1D
KV114	Ig kappa chain V-I region OU	11884/9,94	(P01606)	2D
KV116	Ig kappa chain V-I region Roy	11889/5,12	(P01608)	2D

Gene	Proteína	Massa/pI	Código acesso UniProtKB/Swiss- Prot	Método separação (gel)
5. Continuação de resposta imune				
IGKC	Ig kappa chain C region	11600/5,87	(P01834)	1D/2D
KV105	Ig kappa chain V-I region DEE	11768/9,43	(P01597)	2D
KV401	Ig kappa chain V-IV region (fragment)	13486/5,09	(P06312)	2D
KV302	Ig kappa chain V-III region SIE	11882/8,7	(P01620)	1D/2D
KV309	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	12600/4,96	(P04433)	1D
KV203	Ig kappa chain V-II region MIL	12000/9,29	(P01616)	1D
HV316	Ig heavy chain V-III region TEI	12800/8,50	(P01777)	1D
HV303	Ig heavy chain V-III region VH26	12600/8,28	(P01764)	1D
IGHG1	Ig gamma-1 chain C region	36100/8,19	(P01857)	1D
IGHG2	Ig gamma-2 chain C region	35900/7,59	(P01859)	1D
IGHG3	Ig gamma-3 chain C region	41300/7,90	(P01860)	1D
IGHG4	Ig gamma-4 chain C region	35900/7,36	(P01861)	1D
A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23725/5	(P02763)	1D/2D
A1AG2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	23873/5,12	(P19652)	2D
CO3	Complement 3	188569/6,0	(P01024)	1D/2D
C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C	25800/8,41	(P02747)	1D
CO9	Complement component C9	64615/5,42	(P02748)	2D
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	103521/6,51	(Q14624)	2D
AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	47600/5,52	(P01011)	1D
6. matriz extracelular (estrutura e organização) e reparação tecidual				
CO6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	109709/5,85	(P12110)	1D/2D
CO6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	345167/6,15	(P12111)	1D/2D

Gene	Proteína	Massa/pI	Código acesso UniProtKB/Swiss- Prot	Método separação (gel)
6. Continuação de matriz extracelular (estrutura e organização) e reparação tecidual				
CO1A1	Collagen alpha-1(I) chain	138900/5,8	(P02452)	1D
CO6A1	Collagen alpha-1(VI)	108500/5,43	(P12109)	1D
CO1A2	Collagen alpha-2(I) chain	129200/8,95	(P08123)	1D
PGS2	Decorin	39700/8,54	(P07585)	1D
DERM	Dermatopontin	24559/4,7	(Q07507)	1D/2D
PGS1	Biglycan	41600/7,52	(P21810)	1D
ANXA2	Annexin A2	38600/7,75	(P07355)	1D
PRELP	Prolargin	44181/9,45	(P51888)	1D/2D
LUM	Lumican	38747/6,17	(P51884)	1D/2D
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	82800/4,60	(P49747)	1D
TARSH	Target of Nesh-SH3	118600/9,44	(Q7Z7G0)	1D
FINC	Fibronectin	262500/5,71	(P02751)	1D
TAGL	Transgelin	22600/8,84	(Q01995)	1D
PERI	Peripherin	53732/5,37	(P41219)	2D
TENX	Tenascin-X	471047/5,19	(P22105)	2D
VTNC	Vitronectin	54300/5,80	(P04004)	1D
7. Ciclo celular e proliferação				
UBP16	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16	94936/6,5	(Q9Y5T5)	2D
1433G	14-3-3 protein gamma	28456/4,8	(P61981)	2D
1433E	14-3-3 protein epsilon	29326/4,63	(P62258)	2D
MIME	Mimecan	34243/5,22	(P20774)	1D/2D

Gene	Proteína	Massa/pI	Código acesso UniProtKB/Swiss- Prot	Método separação (gel)
8. Sinalização celular e controle de transcrição e tradução				
DSRAD	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	136000/8,65	(P55265)	1D
H13	Histone H1.3	22300/11,02	(P16402)	1D
H2B1K	Histone H2B type 1-K	13900/10,32	(O60814)	1D
SETX	Probable helicase senataxin	302700/7,17	(Q7Z333)	1D
1433T	14-3-3 protein theta	28032/4,68	(P27348)	1D/2D
ROA2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	37400/8,95	(P22626)	1D
TF2H4	General transcription factor IIH subunit 4	52324/9,12	(Q92759)	2D
NF2L1	Nuclear factor erythroid 2-related factor 1	84994/4,52	(Q14494)	2D
FLI1	Friend leukemia integration 1 transcription f...	51178/6,57	(Q01543)	2D
ERG	Transcriptional regulator ERG	54859/7,01	(P11308)	2D
MTER3	mTERF domain-containing protein 3, mitochondrial	44956/8,54	(Q49AM1)	2D
RS8	40S ribosomal protein S8	24200/10,32	(P62241)	1D
9. Outras funções (adesão, transporte, coagulação)				
PEDF	Pigment epithelium-derived factor	46300/6,38	(P36955)	
TRFE	Serotransferrin	79294/6,81	(P02787)	1D/2D
ANXA5	Annexin A5	35971/4,93	(P08758)	1D/2D
ALBU	Serum albumin	71352/5,92	(P02768)	1D/2D
CAH1	Carbonic anhydrase 1	28909/6,63	(P00915)	1D/2D
HBB	Hemoglobin subunit beta	16102/6,81	(P68871)	2D
HBG1	Hemoglobin subunit gamma-1	16187/6,71	(P69891)	2D
PYR1	CAD protein	245167/6,02	(P27708)	2D
AXA2L	Putative annexin A2-like protein	38806/6,48	(A6NMY6)	2D

Gene	Proteína	Massa/pI	Código acesso UniProtKB/Swiss- Prot	Método separação (gel)
9. Continuação de outras funções (adesão, transporte, coagulação)				
S6A15	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT2	82695/5,06	(Q9H2J7)	2D
SEC63	Translocation protein SEC63 homolog	88341/5,2	(Q9UGP8)	2D
CERU	Ceruloplasmin	122983/5,41	(P00450)	2D
TTHY	Transthyretin	15991/5,31	(P02766)	2D
CAC1H	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H	262191/7,13	(O95180)	2D
RN149	E3 ubiquitin-protein ligase RNF149	43707/5,61	(Q8NC42)	2D
DCAF8	DDB1- and CUL4-associated factor 8	67495/5,21	(Q5TAQ9)	2D
POTEI	POTE ankyrin domain family member I	122858/5,83	(P0CG38)	2D
POTEJ	POTE ankyrin domain family member J	118740/5,66	(P0CG39)	2D
MAST4	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4	286426/8,85	(O15021)	2D
CP062	UPF0505 protein C16orf62	110860/6,82	(Q7Z3J2)	2D
SRPX	Sushi repeat-containing protein SRPX	52793/8,84	(P78539)	2D
CRML	Protein cramped-like	135833/8,08	(Q96RY5)	2D
FIBB	Fibrinogen beta chain	55900/8,27	(P02675)	1D
FIBG	Fibrinogen gamma chain	51500/5,62	(P02679)	1D
10. Função não descrita				
IQCE	IQ domain-containing protein E	77300/9,07	(Q6IPM2)	1D

Legenda: pI (ponto isoelétrico) - massa (em kDa) e pI teórico. Identificações dos *spots* (gel 2D) foram feitos em Espectrômetro de massas *Electrospray* (Thermo Scientific) e as identificações do gel 1D foram feitas em Orbitrap e LTQ Velos (Thermo Scientific).

Conforme esquematizado na Figura 12, dentre as proteínas identificadas em nossa análise proteômica, obtivemos: 16% de proteínas estruturais e contráteis do miocárdio, 13% estruturais e contráteis de MEC, 11% a proteínas do metabolismo geral, 21,4% correspondem a proteínas do sistema imune (sendo os anticorpos os principais componentes deste grupo) e 6% proteínas envolvidas com morte celular, principalmente proteínas indutoras e inibidoras de apoptose.

Figura 12 – Porcentagem da classificação funcional das proteínas identificadas no tecido cardíaco de pacientes com endomiocardiofibrose. A classificação dos processos biológicos foi feita com base na classificação “Gene Ontology”.

4.2.2 Rede das vias de sinalização relacionadas à endomiocardiofibrose a partir dos dados proteômicos

As bases moleculares e os processos envolvidos na patogênese a partir da lista de proteínas identificadas foram avaliados através do uso do *software* IPA (Ingenuity Systems), que reúne vários bancos de dados de proteínas, dentre eles o Uniprot, e utilizada algoritmos para identificar conexões entre os produtos gênicos estudados.

Além disso, o IPA usa o teste de Fischer que indica quais vias canônicas e funções biológicas possuem significância estatística com os dados computados, de acordo com o número de proteínas identificadas dentro das principais vias. (item 3.4.13)

De acordo com a análise dos achados proteômicos pelo IPA, as principais redes (*networks*) envolvidas com as proteínas identificadas, compatíveis com os filtros utilizados e as características da patologia e do tecido analisado foram: “função e desenvolvimento de tecidos conjuntivos” e “desordens de tecidos conjuntivos e doenças inflamatórias” (Tabela 8).

Tabela 8 – Moléculas na rede das principais funções sugeridas pelo Ingenuity

Função e desenvolvimento de tecidos conjuntivos	Score	Moléculas em foco
ACTA2, APOA1, APOE, ATP5B, β-estradiol, CAD, CD28, COMP, COX6C, CP, DPT, EGF, ENO1, ENO3, FN1, GNL2, HBG1, HDAC2, HNRNPA2B1, IFRD2, IL5, IL15, KRT72, LPXN, MSLN, MYC, NR4A1, OAZ1, OGN, PRDX4, PSG1, PSMA5, TUFM, VBP1, VCAN	21	17
Desordens de tecidos conjuntivos e doenças inflamatórias	Score	Moléculas em foco
ALDOA, ANG, ARG1, ATF2, C3, CA1, CD163, CD163L1, CLEC4E, EPO, FGB, FGG, GAB1, GAPDH, GATA1, HBB, HCK, HK1, HP, IGHE, IL6, IL13, IL20, IL1R2, IRS2, MAF, MAPK9, MYH7, ORM1, PDCD1, PTEN, RETN, SERPINF1, SLC4A1, TLR1	13	12

Legenda: O *Score* de 10^{-21} e 10^{-13} corresponde às chances das moléculas em foco estarem presentes na rede ao acaso. As siglas em negrito correspondem às proteínas da rede identificadas nas amostras de tecido cardíaco da EMF pela análise proteômica.

O *software* também forneceu a lista com os principais indutores da expressão dos genes codificadores das proteínas identificadas, sendo estes respectivamente: TGF- β 1, FGF2, IL-6, TGF- β 3, EP300 e TNF. A Figura 13 representa a associação entre os indutores e as proteínas expressas.

Figura 13 – Representação esquemática da rede de relação dos genes codificadores das proteínas identificadas com os principais indutores de expressão. Análise realizada no IPA. O esquema evidencia os principais indutores e seus respectivos produtos: TGF-β1 (linhas azul clara), FGF2 (linhas azul-escura), IL-6 (linhas vermelhas), TGF-β3 (linhas roxa), EP300 (linhas laranja) e TNF (linhas cinza).

De acordo com a análise, a “resposta inflamatória” foi o item mais importante na classificação de funções biológicas em desordens e doenças (com 16 moléculas incluídas), seguida de “doenças cardiovasculares” (com 5 moléculas), conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Principais funções relacionadas com as proteínas identificadas no tecido cardíaco de pacientes com endomiocardiofibrose. Desordens inflamatórias e doenças cardiovasculares apresentaram a maior associação estatística com as proteínas descritas. Os valores estão denotados em $-\log(P \text{ value})$. Análise realizada no IPA.

A principal via canônica sugerida pelo IPA corresponde à via de “resposta de fase aguda”, com a presença de 15 das proteínas identificadas, sendo estas: albumina (ALB), $\alpha 1$ microglobulina (AMBP), apoliproteína (APOA 1 e 2), $\alpha 2$ HS glicoproteína (AHSG), complemento 3 (C3), fibrinogênio cadeia β (FGB) e cadeia γ (FGG), fibronectina (FN1), $\alpha 1$ ácido glicoproteína (ORM), $\alpha 1$ antichimotripsina (SERPINA3), proteína amilóide do soro (APCS), ceruloplasmina (CP), haptoglobina (HP), hemopexina (HPX), $\alpha 1$ antitripsina (SERPINA1). Além das proteínas produzidas por essa via, outras 3 proteínas identificadas pela análise proteômica apresentam relação e são influenciadas na fase aguda, sendo estas: inter α tripsina (ITHI4), complemento 9 (C9) e porção C1q (C1q). O esquema da via canônica de “resposta de fase aguda” está apresentado na Figura 15, mostrando as interações diretas entre as moléculas com destaque (em laranja) para as proteínas identificadas na via.

Figura 15 – Via canônica de resposta de fase aguda. Rede gênica sugerida pela análise *in silico*, com as proteínas identificadas no tecido cardíaco da EMF. A rede contém 15 das proteínas identificadas (em laranja) no *software* IPA.

Com o propósito de avaliar o grau de expressão das proteínas de fase aguda identificadas nas análises proteômicas do tecido cardíaco e no tecido fibroso depositado no endomiocárdio na EMF, foram avaliados a expressão/regulação dos respectivos genes codificadores destas proteínas, com o auxílio do banco de dados TIGER.⁽⁷¹⁾ Neste banco de dados, o Enriquecimento de Expressão (EEx), ou seja, a expressão de um gene em um determinado tecido, está representada pela razão da expressão observada em relação ao esperado neste tecido (considerando que o EEx seja a média da expressão total dos genes e a fração de EEx totais no tecido entre todos os 30 tecidos da biblioteca TIGER). Ao todo, 12/15 (80%) proteínas têm seus genes codificadores expressos por cardiomiócitos, de acordo com a Figura 16, e 7/15 (46,6%) proteínas têm seus genes codificadores expressos em tecido conjuntivo (Figura 17). Segundo os dados do TIGER, dentre as proteínas analisadas apenas a proteína amilóide do soro (APCS) não é expressa por cardiomiócitos e nem no tecido conjuntivo. No entanto, trata-se de uma proteína secretada no plasma.

Figura 16 – Escala de expressão de genes codificadores de proteínas de fase aguda identificados pela análise proteômica em tecido cardíaco de pacientes com endomiocardiofibrose. Dados representados em escala de “Enriquecimento de Expressão”, obtidos do Banco de dados TIGER (<http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/>).

Figura 17 – Escala de expressão de genes codificadores de proteínas de fase aguda identificados pela análise proteômica em tecido conjuntivo de pacientes com endomiocardiofibrose. Dados representados em escala de “Enriquecimento de Expressão”, obtidos do Banco de dados TIGER (<http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/>).

DISCUSSÃO

5. Discussão

Os resultados gerados no presente estudo mostram que os pacientes com EMF apresentaram frequências baixas de episódios de EP ao longo do tempo de seguimento, assim como apresentaram níveis de IgE total sérica indistinguíveis da população controle. Entretanto, a grande maioria dos pacientes com EMF analisada apresentou níveis plasmáticos das citocinas IL-6, TNF- α e IL-10 significativamente elevados em relação aos indivíduos saudáveis. Observamos importante correlação positiva entre os níveis de praticamente todas as citocinas analisadas, evidenciando a co-produção de mediadores pró e anti-inflamatórias e a presença de resposta inflamatória ativa, mesmo nas fases mais avançadas da doença, caracterizada por um perfil de resposta imune misto, composto por Th1/Th2. As análises *in silico*, realizadas com base na análise proteômica das proteínas identificadas no tecido cardíaco de pacientes com EMF sugerem a participação da via canônica “resposta de fase aguda” na patogênese, além de indicar as citocinas IL-6 e TNF- α como alguns dos principais indutores de expressão das proteínas identificadas. A elevação dos níveis plasmáticos de PCR, um biomarcador utilizado na prática clínica para avaliar atividade inflamatória dá suporte à presença de resposta inflamatória ativa na patogênese da EMF, mesmo nas fases avançadas, e corrobora os achados das análises *in silico* do perfil proteômico do tecido endomiocárdico analisado.

Em nossos resultados, observamos uma incidência relativamente baixa (<40%) de pacientes com histórico de EP (>500 eosinófilos/mm³), em pelo menos uma ocasião durante todo o acompanhamento ambulatorial. Este resultado corrobora os dados de um estudo anterior, em que foi observado que os valores de eosinófilos em um grupo de pacientes africanos com EMF não eram significativos em relação aos controles saudáveis da mesma região.⁽⁷²⁾ No entanto, o resultado obtido contrasta com outro estudo realizado na Nigéria, no qual foi descrito a presença de EP (>1.000/mm³) em 80% dos casos de EMF. Nestes casos, os níveis mais elevados (>1.500/mm³) foram observados principalmente em pacientes com até 06 meses de diagnóstico de EMF, sugerindo uma relação proporcionalmente inversa e

significativa entre os níveis de eosinófilos e o tempo entre diagnóstico, ou seja, quanto maior o tempo de doença, menores os níveis de EP. ⁽¹³⁾ É importante considerar que a EP associada às infestações helmínticas apresenta picos transitórios durante a migração larval, sendo que os níveis de eosinófilos tendem a voltar às faixas de normalidade após esse período. Logo, de acordo com a hipótese da participação de eosinófilos nesta etiopatogenia, a EMF apresentaria EP nas fases iniciais da doença, relacionada ao dano cardíaco inicial, e não nas fases avançadas da doença. ⁽¹³⁾ Esses dados corroboram que a infiltração eosinofílica no tecido cardíaco em biópsias de EMF ocorra em apenas 20% dos casos, uma vez que o diagnóstico da EMF ocorre nas fases avançadas da doença e, portanto, esta seria a fase sem participação de eosinófilos. ⁽⁹⁾

A participação de eosinófilos na patogênese da EMF ainda é discutida e não está totalmente esclarecida. A associação entre eosinofilia e EMF surgiu após a observação da presença de ambos os fatores em pacientes na Uganda. ⁽⁷³⁾ No Brasil, Iglesias em 2009 tentou associar a patogênese a esse tipo celular, sem sucesso. ⁽¹²⁾ Em nosso estudo, é provável que o fato de não encontrarmos indícios da participação dessa célula se deva ao estágio avançado da EMF em nosso grupo de pacientes. Entretanto, não se pode comprovar se de fato ocorre a participação de eosinófilos nas fases iniciais. Ainda devemos considerar a possibilidade de que o desfecho clínico de fibrose endomiocárdica seja resultado de diversos insultos, provenientes de causas multifatoriais, com a participação de eosinófilos apenas em determinados casos.

Adicionalmente, é descrito na literatura que o estágio de ativação dos eosinófilos, avaliável através de sua morfologia, é importante para desgranulação e os efeitos tóxicos no endomiocárdio, assim como a quantidade de eosinófilos circulantes. ⁽⁷⁴⁾ Em estudo conduzido em área endêmica para EMF em Uganda, observou-se que os eosinófilos dos pacientes com EMF se apresentaram multilobulados (diferente da morfologia normal da célula – bi-lobulado) e mais de 40% dos pacientes apresentavam eosinófilos com evidências de desgranulação. ⁽⁷³⁾ É importante enfatizar que este é o único estudo até o momento que descreve alterações morfológicas em eosinófilos nessa patologia. Embora Rutakingirwa e cols, 1999 tenham observado altos níveis de eosinófilos circulantes nos pacientes com EMF, não foram observados indícios da associação deste fenômeno com a presença de

doenças parasitárias.⁽⁷³⁾ Em complemento, deve-se enfatizar sobre a falta de estudos a respeito da incidência de parasitoses na população brasileira com EMF, que poderia esclarecer sobre a existência dessa associação em nosso meio.

Já foi descrito na literatura que em pacientes com SHE, cuja lesão cardíaca final é idêntica à EMF, os produtos de desgranulação de eosinófilos podem permanecer no tecido, mesmo após a queda no número dessas células no sangue periférico.⁽³⁰⁾ Considerando a possibilidade de que a EMF e a SHE compartilhem a mesma patogenia - desgranulação de eosinófilos, é possível especular que os valores dentro da normalidade desse tipo celular no sangue periférico e a não identificação de infiltrado eosinofílico no tecido cardíaco, não excluem a contribuição de eosinófilos do processo patogênico na EMF.^(15, 75)

Em complemento, 25,9% dos pacientes com EMF avaliados no trabalho realizado apresentaram níveis de IgE total superiores ao limiar de referência, porém não houve diferença significativa em comparação aos níveis presentes nos indivíduos saudáveis. Quanto aos níveis de IgE alérgeno-específico, 29,6% apresentaram algum reconhecimento, inclusive para alérgenos de helmintos comuns em nosso ambiente, *Ascaris lumbricoides* e *Echinococcus* sp. No entanto, os níveis de IgE alérgeno-específico observados sugere que a maioria destes reconhecimentos específicos seja de baixa sensibilização, sem correlação com sintomas ou histórico clínico de infestação e/ou alergia descrito em prontuário médico. Ademais, 4 dos 5 pacientes que apresentaram altos níveis de IgE total não são sensibilizados por nenhum dos alérgenos testados e não possuem histórico clínico de alergias ou asma, que pudessem justificar os altos níveis dessa imunoglobulina. Embora de modo geral a literatura descreva que indivíduos com alergias/infestações helmínticas apresentam altos níveis de IgE total, assim como EP pronunciada,⁽⁷⁶⁾ há estudos que já descreveram que os níveis de IgE total e alérgeno-específico são marcadores eficientes em indivíduos com diagnóstico clínico de alergia, entretanto, não sendo eficiente em pacientes não alérgicos.⁽⁷⁷⁾ Uma vez que a maioria de nossos pacientes com EMF não apresentou indícios de alergias, de acordo com o prontuário médico, a não observação de IgE anti-helmintos circulantes não pode ser usada como critério definitivo para a ausência de contato com helmintos.

Quanto à análise do perfil de citocinas circulantes na EMF, os resultados obtidos no presente trabalho apontam para a presença de níveis significativamente elevados de IL-10 em nossos pacientes em comparação à população controle ($4,1 \pm 5,27$ pg/mL x $0,58 \pm 0,91$ pg/mL, respectivamente; $P=0,09$). Embora IL-4 tenha apresentado níveis ligeiramente superiores nos pacientes com EMF, não foram observadas diferenças estatísticas em relação aos saudáveis ($4,54 \pm 7,78$ pg/mL x $0,66 \pm 0,95$ pg/mL, respectivamente; $P=0,09$). Foi observada correlação positiva entre os níveis de todas as citocinas analisadas com IL-10, inclusive com IL-4, e a produção concomitante de IL-4 e IL-10 em 20/21 amostras de plasma positivas para IL-10, enfatizando o envolvimento de IL-4 na cascata de respostas imunológicas envolvidas na EMF.

IL-4 é uma citocina fundamental para respostas imunes Th2, ⁽⁷⁸⁾ cujos níveis circulantes encontram-se elevados durante estas respostas. ⁽⁷⁹⁾ Em conjunto com IL-4, IL-10 participa da imunopatologia das infestações parasitárias e promovem a redução na severidade das respostas imunes nas fases agudas da infestação. ⁽⁸⁰⁾ Sabe-se que a citocina IL-10 exerce um papel regulador, suprimindo a resposta inflamatória através da redução de produção de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas. ⁽⁸¹⁻⁸³⁾ Logo, é possível especular que a presença de IL-10 na EMF pode estar correlacionada à hiporresponsividade induzida por helmintos, como já descrito em infestações por *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *S. mansoni*, uma vez que a regulação da intensidade de respostas inflamatórias, tanto Th1 quanto Th2, por IL-10 corresponde a um dos principais mecanismos relacionados à sobrevivência de parasitos no hospedeiro, bem evidente nas fases crônicas em comparação à infestação aguda. ⁽⁸⁴⁾

A presença de IL-10 no plasma de pacientes com EMF também poderia indicar a relação dessa doença com a falta de sanitização que expôs estes indivíduos ao contato de vários organismos patogênicos, dentre eles helmintos, uma vez que indivíduos expostos a pouca higiene (geralmente provenientes de classe econômica desfavorecida) apresentam elevados níveis circulantes de IL-10. ⁽⁸⁵⁾ Considerando ainda a associação entre EMF e condições precárias de vida (por exemplo: andar descalço, baixa escolaridade e deficiências nutricionais), ⁽⁷³⁾ avaliamos a qualidade de vida dos pacientes com EMF do nosso grupo através do

nível de escolaridade. Em nossos resultados, observamos que pelo menos 60% destes indivíduos apresentam baixa escolaridade, com menos de 4 anos de estudo, corroborando com os dados da literatura. É provável que a pobreza assim como a má-nutrição estejam relacionadas à patogênese da EMF, por serem as responsáveis por defeitos nos mecanismos de reparos de danos causados por eosinófilos, e também como fator de suscetibilidade de contaminação por helmintos.

Sucintamente, os dados apresentados no presente trabalho sugerem um baixo número de casos de EP, e de modo geral, em picos transitórios quando presentes, baixo número de reconhecimentos de alérgenos de helmintos comuns à nossa população e níveis de IgE total semelhantes aos da população geral. Além disso, a ausência de correlações entre o número de eosinófilos, níveis de IgE total e alérgeno-específico com o perfil de citocinas plasmáticas, sugerem que o grupo de pacientes com EMF analisados não apresentam um fenótipo atópico que pudesse estar envolvido com a patogênese e não apontam indícios conclusivos da participação de eosinófilos e infestações helmínticas na EMF, em um período anterior ao diagnóstico, embora com base em observações de pacientes com comprometimento cardíaco avançado, não seja possível excluir suas participações nas fases iniciais dessa doença. No entanto, a detecção concomitante de IL-4 com IL-10 nas amostras de pacientes EMF pode sugerir a contribuição do perfil Th2 na patogênese, sendo que a presença do mediador anti-inflamatório IL-10, poderia ainda estar relacionado à presença e à sobrevivência de parasitos no hospedeiro em infestações crônicas e às condições precárias de vida e higiene.

Embora tenham sido detectados mediadores correlacionados ao perfil Th2, as citocinas predominantes nas amostras de plasma dos pacientes com EMF analisados foram IL-6, TNF- α e IL-10, que se mostraram significativamente elevados em relação aos níveis de controles saudáveis. As citocinas IL-2 e IFN- γ foram observadas em 25,9% e 33,3%, respectivamente, sem diferenças significativas em relação aos controles saudáveis, demonstrando um papel secundário na patogênese da EMF. Com exceção de IFN- γ e TNF- α , todas as seis citocinas analisadas apresentaram correlação positiva e significativa, sugerindo que estas são estimuladas por um indutor comum ou que uma interaja (induza/iniba) à produção da outra. Além disso, de acordo com os ECOs analisados, o grupo de pacientes com EMF

analisado apresentava múltiplas alterações com diferentes níveis na função cardíaca: 61% apresentavam a função diastólica comprometida (grau I – III), 92,6% apresentavam regurgitação das valvas mitral e/ou tricúspide (grau discreto-intenso), sendo que mais da metade destes (59,2%) apresentou regurgitação em ambas às valvas. Além disso, de modo geral o grupo analisado apresentava a função sistólica preservada (apenas 22,2% tiveram FE < 55%) assim como alterações de ritmo cardíaco, como FA (22,2%).

Vários trabalhos na literatura associam a presença de alterações nas funções cardíacas com a produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas IL-6 e TNF- α , e de anti-inflamatórias, como IL-10. Ali e cols, em 2012 ⁽⁸⁶⁾ observaram elevados níveis de TNF- α em pacientes com doença cardíaca reumática e disfunção valvar grave, provavelmente relacionada à presença de regurgitação mitral, no entanto, não observaram correlação entre a gravidade da regurgitação e o nível circulante dessa citocina. Em outro estudo, Amosova e cols, em 2004 ⁽⁸⁷⁾ mostraram a associação entre níveis de IL-6 e TNF- α e a classe funcional (NYHA) em pacientes com IC diastólica. Quanto à disfunção sistólica, Aukrust e cols, em 2005 ⁽⁴⁹⁾ demonstraram correlação entre o aumento nos níveis de IL-10 e a melhora da condição disfunção sistólica, representada pelo aumento dos valores de FE em pacientes com IC. Já a condição de FA, comum nos pacientes com EMF, também foi associada à presença de citocinas pró-inflamatórias circulantes e redução da função ventricular, o que sugere que os elevados níveis de IL-6 e TNF- α nos pacientes com essa arritmia possa ser consequência dessa condição. ⁽⁸⁸⁾

Conquanto não tenha sido observada correlação entre os níveis das citocinas circulantes e os índices de disfunção diastólica, sistólica e valvar, é importante considerar que o perfil de citocinas pró- e anti-inflamatórias observadas nas amostras de plasma do nosso grupo de pacientes com EMF possa ainda ser decorrente de uma série de disfunções cardíacas geradas pela patogênese, uma vez que pacientes acometidos por esta doença apresentam múltiplas alterações na função cardíaca. Logo, a não correlação entre o nível das citocinas e os parâmetros dos ECOs pode sugerir que o perfil inflamatório observado na EMF não seja atribuível a alguma disfunção cardíaca específica, mas sim ao conjunto de disfunções presente nos pacientes.

Outra importante questão levantada sobre o perfil de citocinas plasmáticas identificadas nas amostras de pacientes com EMF analisadas são as comorbidades concomitantes assim como as medicações de uso contínuo, que podem influenciar o perfil e os níveis de citocinas circulantes. Neste estudo, foi possível observar que parte dos pacientes analisados apresenta DAIs (3), asma (4), HAS, entre outras. Seis dos pacientes analisados neste estudo fazem uso regular de imunossupressores (corticóides), que têm grandes efeitos no sistema imunológico, inibindo diversos mecanismos das respostas.⁽⁸⁹⁾ Além das medicações que interferem diretamente nas respostas imunes, drogas com outras indicações terapêuticas também podem interferir nas respostas imunes através da modulação da produção de citocinas e causar implicações no tratamento de IC, como já descrito para o uso de beta-bloqueadores e terapia com inibidores de enzima conversora de angiotensina.^(90, 91)

Embora não tenha sido possível estabelecer uma relação entre a produção de citocinas, especialmente entre as de caráter pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , e a IC presente nos pacientes com EMF, o perfil de citocinas identificado nas amostras é coerente ao perfil observado em pacientes com IC de diferentes etiologias.⁽⁹²⁻⁹⁴⁾ A origem da produção dessas citocinas deve ser profundamente investigada, para que seus papéis na EMF sejam devidamente esclarecidos, e assim, possam contribuir para a elucidação da patogênese e para novas propostas de tratamento desses pacientes.

A partir da identificação de proteínas do endomiocárdio de EMF, gerou-se um mapa proteômico com aproximadamente 245 *spots*, sendo que destes selecionamos os 44 mais intensos, dos quais foram identificadas 92 proteínas distintas. Também selecionamos 21 bandas a partir do gel 1D realizado com o mesmo extrato proteico do gel 2D, dos quais foram identificadas 96 proteínas. Somando ambas as identificações, 140 proteínas distintas estão descritas em nossa análise proteômica. Em nossos achados, obtivemos grupos funcionais distintos, como por exemplo, proteínas contráteis e estruturais de endomiocárdio (15,7%), estruturais de MEC e reparação tecidual (12,8%), metabolismo (10,7%), resposta ao estresse e apoptose (6,4%), resposta imune (21,4%), sinalização celular (8,6%), entre outras.

Analisando os dados, observa-se que proteínas com funções contráteis e estruturais de miocárdio (que estão entre os *spots* mais intensos do mapa proteômico) representam, em geral, componentes do sarcômero.⁽⁹⁵⁾ Como exemplos, podemos

citar dentre as proteínas estruturais isoformas da tropomiosina, miosina e actina, que tem função de contração muscular. Este resultado era esperado visto que o tecido de ressecção cirúrgica da EMF é composto por tecido endomiocárdico comprometido pela fibrose. Também foram identificadas proteínas envolvidas com o metabolismo energético celular e fosforilação oxidativa, tais como a ATP Sintase α e β mitocondrial e a Creatina quinase do tipo M. Estas proteínas também são expressas constitutivamente no tecido cardíaco em decorrência da alta demanda energética para função cardíaca normal. ⁽⁹⁶⁾ Logo, a identificação de proteínas com funções estruturais e contráteis se refere a presença de microfragmentos de miocárdio comprometidos pela fibrose presentes no tecido de ressecção cirúrgica analisado.

Dezoito proteínas identificadas (12,8% do total) na análise proteômica do tecido cardíaco representam componentes estruturais da MEC e proteínas relacionadas à reparação tecidual. Dentre estas, identificamos a presença de fibronectina, lumican, dermatopontina, decorina, tenascin-X, entre outras, assim como de algumas cadeias de colágenos do tipo I e VI no endomiocárdio de pacientes com EMF. A MEC cardíaca é composta constitutivamente por fibras colágenas fibrilares (tipo I, III e V) e não fibrilares (IV e VI) e uma variedade de outras proteínas especializadas, tais como: fibronectina, laminina, tenascin-C. ⁽¹¹²⁾ Estas correspondem a proteínas presentes na MEC, tanto no tecido normal quanto no alterado. Por outro lado, determinadas proteínas da MEC têm sido associadas a processos fibróticos, uma vez que já foram demonstradas sua influência no estado de ativação dos miofibroblastos, as principais células envolvidas na fibrose e presentes na fibrose da EMF, ativando-os. Naugle e cols, 2006 ⁽⁹⁷⁾ demonstraram que a presença de colágeno tipo VI em cultura celular de fibroblastos induz sua diferenciação em miofibroblastos. Ademais, já foi descrita a presença de colágeno VI na MEC nas fases tardias do remodelamento, após injúrias cardíacas. ⁽⁹⁹⁾

Estudos anteriores através de técnicas de imunohistoquímica demonstraram a presença dos colágenos do tipo I e III na fibrose da EMF - com predomínio de deposição das fibras colágenas do tipo I sobre o tipo III. ⁽⁹⁾ O colágeno tipo I é o principal componente da MEC, além de ser a principal proteína envolvida na fibrose cardíaca, ⁽¹⁰⁰⁾ sendo que seu acúmulo tecidual é responsável pela diminuição da complacência, levando à disfunção diastólica cardíaca. ⁽¹⁰¹⁾

A identificação de poucos tipos de colágenos em nosso trabalho, possivelmente, se deve às limitações da técnica de análise proteômica. Visto que a MEC é composta por redes de proteínas especializadas fortemente aniônicas,⁽¹⁰²⁾ é possível que pouco material tenha sido solubilizado em nossa extração proteica, ou ainda que este tenha sido removido do homogenato em etapa de centrifugação (vide item 3.4.2.2). Ainda se pode considerar a possibilidade de que o alto peso molecular das cadeias de colágeno, tenha dificultado a entrada da proteína na tira de pH imobilizado.

A maioria das proteínas com função envolvida na resposta imune identificada em nossa análise foram fragmentos de imunoglobulinas, tanto cadeia pesada quanto cadeia leve, proteínas do sistema complemento, tais como complemento 3 (C3), componente do complemento 9 (C9) e C1q e proteínas sensíveis à inflamação. Muitas das cadeias de anticorpos foram identificadas em mais de um *spot*, o que pode sugerir modificações pós traducionais que interferem no pI dessa proteína, tais como glicosilação, oxidações, ou ainda artefatos da própria técnica de separação proteica. Dentre as proteínas sensíveis à inflamação identificadas nas amostras, pertencentes ao grupo de resposta imune, é possível citar as proteínas α 1-ácido glicoproteína, α 1-ácido glicoproteína 2 e α 2-HS-glicoproteína. De acordo com os dados do banco de bioinformática TIGER, que indica escala de expressão gênica em diversos tecidos, os genes codificadores destas proteínas de fase aguda, ORM e AHSG, respectivamente, são expressos por tecido cardíaco. Com exceção do gene APCS, que codifica a proteína amilóide do soro, todas as outras proteínas de fase aguda identificadas pela análise proteômica podem ser expressas em tecido cardíaco e/ou tecido conjuntivo. Entretanto, não podemos descartar que a identificação das proteínas plasmáticas de fase aguda em nossa análise proteômica pode ser oriunda do extravasamento do conteúdo dos pequenos vasos, mesmo sem edema aparente, decorrente da inflamação presente no subendocárdio dos pacientes.⁽¹⁰³⁾ Assim, não é possível determinar se essas proteínas são provenientes de plasma ou se estão sendo expressas no tecido cardíaco comprometido pela fibrose.

Complementando a análise proteômica, realizamos análises *in silico* utilizando o *software* IPA que sugeriu, com base nas proteínas identificadas nas análises, à via canônica de “resposta de fase aguda” como a principal via relacionada

à patogênese da EMF. Sabendo que esta via possui como principais indutores as citocinas IL-6, TNF- α e IL-1, ⁽¹⁰⁴⁾ a observação de elevados níveis de IL-6 e TNF- α no plasma de pacientes com EMF fortalecem esses achados.

Além da via canônica, o IPA indicou que as proteínas identificadas em nossa análise proteômica se relacionavam às redes de funções biológicas de “resposta e doença inflamatória” e de “distúrbios de tecido conjuntivos e doenças inflamatórias”. Em complemento, a dosagem de PCRus plasmática sustenta essa predição, uma vez que seus níveis se apresentaram elevadas no grupo com EMF em relação aos controles saudáveis ($6,30 \pm 9,79$ mg/L x $0,64 \pm 0,49$ mg/L, respectivamente; $P=0,0006$). Portanto, o quadro inflamatório sistêmico na EMF, predito pelas análises *in silico* tanto na identificação da via canônica quanto nas funções que envolvem o conjunto de proteínas identificadas, foi confirmado pelos altos níveis circulantes de PCRus, observados em nossos pacientes.

Como a elevação dos níveis plasmáticos de proteínas de fase aguda corresponde a uma resposta inespecífica, é importante considerar que níveis muito elevados possam ser secundários a outras causas, que não relacionadas à patogênese da EMF e/ou o quadro de IC do paciente, como por exemplo, infecções bacterianas, virais ou ainda refletir a atividade de outras doenças crônicas. ⁽⁵³⁾ Contudo, é relevante enfatizar que os resultados laboratoriais gerados neste trabalho a respeito dos elevados níveis de citocinas, especialmente de IL-6 e TNF- α , e de PCRus, corroboram os dados sugeridos na análise *in silico* sobre a participação de mediadores inflamatórios e da via de “resposta de fase aguda” que, por conseguinte, induz a expressão de parte das proteínas identificadas na análise proteômica do tecido cardíaco comprometido pela fibrose, corroborando por fim, a presença do quadro inflamatório sistêmico na patogênese da EMF, mesmo em pacientes em fase avançada.

Não foram observadas correlações entre os níveis de PCR com a classe funcional (NYHA), valores de FE e grau de disfunção diastólica (Anexo D), assim como não foi possível observar diferenças nos níveis de citocinas dentro de cada classe funcional, apesar de alguns trabalhos da literatura descreverem essa associação em pacientes com IC. ^(55, 105) É importante considerar que embora o grupo de pacientes analisado apresentasse múltiplas disfunções cardíacas, 90% das amostras

foram provenientes de indivíduos em classe funcional da I e II (NYHA). Devido a esta limitação, também não foi possível avaliar o papel de IL-10 nos diferentes graus de IC, embora a correlação de IL-10 com as outras citocinas pró-inflamatórias possam sugerir que este mediador anti-inflamatório exerça um papel regulador na resposta inflamatória. Ainda com relação ao papel das citocinas circulantes na IC, é importante destacar que os dados sobre níveis de IL-10 em pacientes com IC são contraditórios, com estudos que relatam a observação de altos níveis enquanto que outros descrevem baixos níveis circulantes dessa citocina em pacientes com essa condição clínica. ⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁹⁾

Embora poucos trabalhos descrevam a detecção de IL-4 plasmática em pacientes com IC, o significado biológico de sua participação na IC ainda não está totalmente definido. Sato e cols, 1999 ⁽¹¹⁰⁾ descreveram níveis elevados de IL-4 no soro de pacientes com IC aguda, cujos níveis diminuíram após compensação do quadro clínico. Sabe-se que IL-4 possui capacidade de inibir produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α por monócitos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), o que confere a esta citocina uma atividade anti-inflamatória para respostas dirigidas por citocinas pró-inflamatórias, que tende a estimular respostas celulares na inflamação. ⁽⁷⁸⁾ Com base nesses dados e sabendo que a IC está relacionada a uma ativação inflamatória persistente com participação de IL-6 e TNF- α , é possível especular que IL-4 também exerça um efeito anti-inflamatório através da inibição dessas citocinas, na cascata imunológica na EMF. No entanto, apenas com esses resultados não é possível avaliar se IL-4 e o conjunto de citocinas Th1 presentes na EMF apresentam um efeito de interação cooperativa em prol de uma resposta inflamatória conjunta ou se competem entre si, equilibrando respostas Th1 x Th2.

Em consideração ao papel das citocinas circulantes na fibrogênese, IL-4 possui ação pró-fibrótica descrita em diversas doenças. Elevados níveis dessa citocina na urina de pacientes com IC crônica de diferentes etiologias (doença cardíaca isquêmica e cardiomiopatias dilatada e hipertensiva) já foram correlacionados aos indicadores de síntese e degradação de colágeno, sugerindo que IL-4 induz o metabolismo de colágeno cardíaco. ⁽¹¹¹⁾ Considerando o papel pró-fibrótico de IL-4, é possível sugerir que a presença de IL-4 participe do processo

fibroso na patogênese, e que este permanece ativo nos pacientes com EMF nas fases avançadas da IC, mesmo que de forma lenta.

Quanto ao papel de IL-10 na fibrose, já foi descrito que esta citocina não altera a deposição de tecido fibroso em modelo experimental de infarto do miocárdio. ⁽¹¹²⁾ Em contrapartida, Sun e cols, 2010 ⁽¹¹³⁾ descreveram a participação de IL-10 na indução de processos fibróticos, através do recrutamento de fibrócitos para o local de inflamação e da indução de ativação alternativa de fenótipo dos macrófagos para M₂, envolvidos com fibrose, sugerindo que a exposição prolongada a níveis elevados de IL-10 induz fibrose. Trata-se de um resultado contraditório, visto que até então a literatura descrevia IL-10 como uma citocina protetora em processos fibróticos, como descrito anteriormente em estudos de modelos de bleomicina e fibrose induzida por helmintíase, ⁽¹¹⁴⁾ e até mesmo sua participação nos mecanismos protetores de drogas anti-fibróticas. ⁽¹¹⁵⁾

Por fim, de acordo com as predições do IPA, os principais reguladores positivos da expressão das proteínas identificadas em nosso trabalho foram citocinas e fatores de crescimento envolvidos com resposta de fase aguda e ativação de fibroblastos e fibrose. O fator TGF- β 1 foi o principal regulador sugerido pelo programa, induzindo a expressão de 19 das 33 proteínas listadas na rede, identificadas em nossa análise proteômica. Um dos possíveis mecanismos envolvidos com a ação de TGF- β na patogênese da EMF seria através da via de sinalização intracelular direcionada pelo fator de transcrição Smad3, ⁽¹¹⁶⁾ com a co-participação do cofator de transcrição EP300, também presente nas predições do IPA, induzindo 3 genes listados na rede. ⁽¹¹⁷⁾

Outros reguladores positivos de expressão sugeridos pela análise *in silico* foram TGF- β 3, FGF-2, IL-6 e TNF. As 8/33 das proteínas induzidas por IL-6 são envolvidas com resposta inflamatória e de fase aguda, além desta citocina também estimular a expressão de TNF- α , que induz a expressão de outras 8 proteínas identificadas na análise proteômica, dentre as quais o colágeno (COL1A1 e COL1A2). Estudos sugerem que a alta expressão de TNF- α promove alteração no equilíbrio de síntese e degradação de colágeno no tecido cardíaco, através da regulação das atividades de metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs), contribuindo para a síntese de proteínas da MEC e do remodelamento tecidual. ⁽¹¹⁸⁾

Dentre os indutores descritos, é relevante enfatizar que a participação de IL-6 e TNF- α na indução da expressão das proteínas identificadas e na patogênese da EMF, preditas pela análise *in silico*, foram confirmadas pelos altos níveis circulantes dessas citocinas nas amostras de plasma da grande maioria dos pacientes analisados, por meio de citometria de fluxo. Logo, nossos dados laboratoriais corroboram parcialmente as previsões das análises de bioinformática, e permitem hipotetizar que estes mediadores inflamatórios circulantes influenciem a expressão de proteínas – incluindo as de fase aguda e MEC - no tecido endomiocárdico de pacientes portadores de EMF.

5.1 Considerações finais

Os resultados obtidos do presente estudo mostram pela primeira vez a presença de uma resposta inflamatória ativa e subclínica na EMF, mesmo em casos avançados da doença, corroborando a participação de mecanismos imunológicos na patogênese. No entanto, não houve indícios da participação de eosinófilos nessa resposta inflamatória, uma vez que em nossas análises, estes se apresentaram dentro da faixa de normalidade no sangue periférico e tampouco houve indícios da participação de mecanismos alérgicos relacionados à IgE. Em conjunto, esses dados podem sugerir que a infestação helmíntica, caso presente, ocorra apenas nas fases iniciais da patogênese (antes da formação da fibrose). Nossos resultados nos permitem levantar as hipóteses que o perfil inflamatório plasmático poderia ser decorrente de uma infestação helmíntica antiga ou ainda secundário à alterações cardiovasculares secundárias à evolução da própria EMF. A análise proteômica do tecido endomiocárdico permitiu identificar a composição das proteínas de MEC e de miocárdio, e revelar uma inesperada riqueza de proteínas da via canônica da resposta de fase aguda. Nossos dados permitem levantar a hipótese que os níveis elevados de citocinas inflamatórias modulem a expressão de proteínas – incluindo as de fase aguda - no tecido endomiocárdico de pacientes portadores de EMF.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- A maioria das amostras de plasma de pacientes com EMF apresentaram níveis detectáveis de cada uma das citocinas analisadas, sem a polarização para um tipo específico de resposta inflamatória.
- A correlação entre os níveis de todas as citocinas sugere que a resposta inflamatória é decorrente de um mesmo estímulo inflamatório ou inibição cruzada.
- O levantamento do número de casos de pacientes com EMF que apresentam histórico de eosinofilia em sangue periférico não sustentam a participação desse tipo celular na patogênese da EMF. No entanto, não é possível excluir a hipótese do envolvimento de eosinófilos nas fases iniciais da patogênese (antes da formação da fibrose e insuficiência cardíaca).
- Os níveis de IgE total foram semelhantes aos observados na população controle e não houve reconhecimento de IgE específico contra os alérgenos testados. Ademais, não foram observadas correlações entre os níveis de IgE total com os níveis de citocinas desses pacientes, indicando que as citocinas Th2 circulantes não estão associadas a uma resposta de IgE.
- Os níveis de citocinas não se associaram a parâmetros de função cardíaca, tais como: fração de ejeção, grau de função diastólica e classe funcional (NYHA).
- A análise proteômica do endomiocárdio de pacientes com EMF permitiu a identificação de 140 proteínas presentes no tecido cardíaco comprometido pela fibrose. Dentre os principais grupos identificados, estão proteínas estruturais, contráteis e de metabolismo geral, proteínas estruturais de matriz extracelular, assim como proteínas de resposta imune e sensíveis a inflamação.

- A identificação da via canônica de “resposta de fase aguda” como a principal via relacionada ao perfil de proteínas identificadas pela análise proteômica corroboram os resultados da dosagem de citocinas e sustentam a presença de um processo inflamatório subclínico, confirmado pelos elevados níveis de proteína C reativa presente no plasma de pacientes com EMF.
 - De acordo com os dados de bioinformática, as citocinas IL-6 e TNF- α estão entre os principais indutores positivos da expressão das proteínas identificadas na EMF, e suas dosagens plasmáticas descritas neste trabalho confirmam esse achado.
-

7. Anexos

Anexo A

Aprovações da CAPPEsq

SIC 3516/30/105

APROVAÇÃO

A 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, em sessão de 08/12/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0569/10**, intitulado: "**ANÁLISE PROTEÔMICA DE TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM ENDOMIOCARDIOFIBROSE**" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPEsq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Edecio Cunha Neto**

Pesquisador (a) Executante: **Aline Siqueira Bossa**

CAPPEsq, 09 de Dezembro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
 RECEBIDO
 14/12/10

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

3516/10/105

Nº Protocolo: 0569/10

Título: ANÁLISE PROTEÔMICA DE TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM
ENDOMIOCARDIOFIBROSE

Pesquisador Responsável: Dr. Edécio Cunha Neto

Pesquisador Executante: Aline Siqueira Bossa

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas
da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU /**
TOMOU CIÊNCIA ad-referendum em 21/02/2013, do(s) documento(s)
abaixo mencionado(s):

- Carta datada de 30/10/2012 - Relatório Parcial do Estudo
- Carta datada de 18/02/2013 - Solicitação de mudança de título para -
Patogênese da Endomiocardiofibrose: perfil imunológico e análise
proteômica do tecido cardíaco

CAPPesq, 21 de Fevereiro de 2013

RECEBIDO
22/02/13
Jainá

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo B

Tabela I – Número de eosinófilos no sangue periférico de pacientes com endomiocardiofibrose durante acompanhamento ambulatorial

Paciente	Hemogramas (ano de referência)										
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
EMF 05	...	...	1148	...	...	...	...	...	...	...	...
EMF 08	...	...	...	...	...	...	...	694	416	...	...
EMF 09	...	...	...	...	...	...	-	72	122	...	...
EMF 10	-	0	0	0	0	0	290	...	...	63	...
EMF 11	...	...	81	...	...	...	72	...	96	...	117
EMF 12	...	...	1168	...	...	59	0	...	...	0	...
EMF 13	...	...	...	...	...	...	...	432	1232	...	502
EMF 14	...	...	...	...	...	301	245	294	164	135	...
EMF 15	...	...	...	...	...	715	1916	208	0	0	...
EMF 16	0	...	...	...	...	...	...	0	...	0	...
EMF 17	...	...	...	140	...	...	53	53	75	144	...
EMF 18	...	...	...	0	...	0	0	55	0	0	...
EMF 19	102	46	...	...	84	134	...	...	228	...	...
EMF 20	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1680	...
EMF 21	...	...	...	0	0	0	0	...	...	0	...
EMF 22	...	117	59	0	54	73	...	...	130	...	...
EMF 23	594	110	...	...	...	174	...	...	...	228	...
EMF 24	448	345	390	330	484	0	124	140	148	176	...
EMF 25	...	...	...	...	...	...	...	0	...	0	1874
EMF 26	...	...	93	...	...	...	272	...	...	112	...
EMF 27	0	0	0	0	0	...	...	...	0	...	0
EMF 28	...	140	...	0	0	0	0	0	0	0	...
EMF 29	520	...	576	...	...	...	...	...	...	...	350
EMF 30	...	...	201	-	350	...	...	...	...	...	...
EMF 31	228	248	265	96	290	183	306	65	0	42	...
EMF 32	...	...	...	...	470	129	...	114	0	...	...
EMF 33	...	...	...	...	...	...	0	0	0	...	...
EMF 34	...	...	...	...	...	...	...	...	...	0	0

FONTE: Prontuário eletrônico do Instituto do Coração - Si3.

Legenda: “Três pontos (...)” Dado desconhecido - sem documentação referente ao ano. Valores >500 eosinófilos/mm³ estão marcados em negrito, e indicam eosinofilia em sangue periférico. Marcações em cinza correspondem ao número de eosinófilos no ano do diagnóstico de EMF.

Anexo C

Tabela II – Ano da coleta das amostras de soro/plasma e da realização das ecocardiografias nos pacientes com endomiocardiofibrose

Pacientes	Ano da coleta	Ano da Ecocardiografia
EMF 08	2008	2010*
EMF 09	2008	2009*
EMF 10	2011	2011
EMF 11	2008	2007
EMF 12	2008	2007
EMF 13	2009	2008
EMF 14	2008	2005
EMF 15	2010	2005
EMF 16	2008	2003
EMF 17	2010	2007
EMF 18	2008	2007
EMF 19	2009	2005
EMF 20	2009	ND
EMF 21	2010	2007
EMF 22	2008	2009
EMF 23	2008	2010
EMF 24	2008	1998
EMF 25	2010	2010
EMF 26	2009	2008
EMF 27	2008	2009
EMF 28	2008	1996
EMF 29	2009	2011*
EMF 30	2008	2003
EMF 31	2009	2007
EMF 32	2009	2008
EMF 33	2010	2007
EMF 34	2011	2011

Legenda: ND – Ecocardiografia não disponível; * Ecocardiografia pós cirurgia de ressecção do endomiocárdio.

Anexo D

Figura I - Correlação entre os níveis de proteína C reativa (PCRus) e o número de eosinófilos no sangue periférico, valor de fração de ejeção (FE), grau de função diastólica e classe funcional (NYHA) de pacientes com endomiocardiofibrose (N=24). Teste não paramétrico de Spearman.

Anexo E

Figura II - Níveis de proteína C reativa (PCR) nos pacientes com endomiocardiofibrose que apresentaram níveis elevados (superiores ao limiar do kit) de cada citocina analisada em comparação aos que não apresentaram. Os resultados estão apresentados em mg/L e as barras apresentam a média de cada grupo com o respectivo desvio padrão.

Anexo F

Figura III - Correlação entre os níveis de citocinas e classe funcional (NYHA) de pacientes com endomiocardiofibrose (N=24). Teste não paramétrico de Spearman.

Anexo G

Figura IV - Correlação entre os níveis de citocinas e grau de função diastólica de pacientes com endomiocardiofibrose (N=24). Teste não paramétrico de Spearman.

Anexo H

Figura V - Níveis de citocinas em diferentes graus de disfunção diastólica de pacientes com endomiocardiofibrose (N=24). Teste não paramétrico de Spearman.

Anexo I

Figura VI - Níveis de citocinas em diferentes graus de classe funcional (NYHA) em pacientes com endomiocardiofibrose (N=24). Teste não paramétrico de Spearman.

Anexo J

Figura VII - Correlação entre os níveis de proteína C reativa (PCRus) e das citocinas circulantes (N=24). Teste não paramétrico de Spearman.

Anexo K

Figura VIII- Níveis de citocinas plasmáticas em pacientes EMF com elevados níveis de proteína C reativa (PCR) (>3mg/L) em comparação a pacientes com níveis baixos (<3mg/L). Os resultados estão apresentados em pg/mL e as barras apresentam a média de cada grupo com seu respectivo desvio padrão. O teste Mann Whitney foi usado para a análise estatística. Os níveis de citocinas foram dosados por citometria de fluxo.

Anexo L

Figura IX - Níveis plasmáticos de citocinas nos subgrupos de pacientes com endomiocardiofibrose com e sem histórico de eosinofilia em sangue periférico. Os resultados estão apresentados em pg/mL e as barras apresentam a média de cada grupo com o respectivo desvio padrão. O teste Mann Whitney foi usado para a análise estatística.

Anexo M

Figura X - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas e o número de eosinófilos em pacientes com endomiocardiofibrose. O teste de Spearman foi usado para a análise estatística.

Anexo N

Figura XI - Níveis plasmáticos das citocinas analisadas nos subgrupos de pacientes com endomiocardiofibrose com e sem IgE total acima do limiar (200kU/L). As citocinas foram dosadas por citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados em pg/mL. As barras apresentam a média de cada grupo com seu respectivo desvio padrão. O teste Mann Whitney foi usado para a análise estatística.

Anexo O

Figura XII - Correlação entre níveis de citocinas e os níveis de IgE total nos pacientes com endomiocardiofibrose. A análise estatística de correlação foi avaliada através do teste de Spearman.

Anexo P

Figura XIII - Níveis plasmáticos das citocinas analisadas nos subgrupos de pacientes com endomiocardiofibrose com e sem IgE alérgenos-específico acima do limiar (0,35 kU/L). As citocinas foram dosadas por citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados em pg/mL. As barras apresentam a média de cada grupo com seu respectivo desvio padrão. O teste Mann Whitney foi usado para a análise estatística.

Anexo Q

Associações estatísticas entre os parâmetros de alergias: eosinofilia, IgE total e IgE específico nos pacientes com endomiocardiofibrose.

Tabela III – Associação entre eosinofilia e níveis IgE total

	IgE total elevada	IgE total normal	Total
Eosinofilia	1	9	10
Sem eosinofilia	4	13	17
Total	5	22	27

($P=0,371$) - Teste estatístico exato de Fischer

Tabela IV – Associação entre eosinofilia e IgE específico

	IgE Esp elevada	Sem IgE Esp	Total
Eosinofilia	3	7	10
Sem eosinofilia	5	12	17
Total	8	19	27

($P=0,65$) - Teste estatístico exato de Fischer

Tabela V – Associação entre IgE total e IgE específica

	IgE Esp elevada	IgE Esp normal	Total
IgE total Elevada	1	4	5
IgE total não elevada	7	15	22
Total	8	19	27

($P=0,52$) - Teste estatístico exato de Fischer

Anexo R

Figura XIV – Correlação entre os níveis de citocinas e os níveis do reconhecimento de IgE específico para Blotr dos pacientes com endomiocardiofibrose. As citocinas foram dosadas por citometria de fluxo e os níveis de IgE alérgeno específico por ImmunoCAP 100. Os resultados estão apresentados em pg/mL e kUA/l, respectivamente.

Anexo S

Figura XV – Correlação entre os níveis de citocinas e os níveis do reconhecimento de IgE específico para Derpt dos pacientes com endomiocardiofibrose. As citocinas foram dosadas por citometria de fluxo e os níveis de IgE alérgeno específico por ImmunoCAP 100. Os resultados estão apresentados em pg/mL e kUA/l, respectivamente.

Anexo T

Figura XVI – Eletroforese de gel 1D (10% poliacrilamida) com extrato protéico do tecido endomiocárdico de pacientes com endomiocardiofibrose. Gel corado com Coomassie Blue Colloidal. Foram aplicados 50ug do extrato de proteínas por fileira e selecionadas 21 regiões de bandas, com cobertura de baixos (~10kDa) até altos pesos moleculares (~100kDa) para a digestão *in gel*.

Anexo U

Figura XVII – Eletroforese de gel 2D (10% poliacrilamida) com marcação dos *spots* selecionados do gel 2D para identificação das proteínas por LC-ESI-MS. Foi utilizado o mesmo extrato protéico do tecido endomiocárdico de pacientes com endomiocardiopatia fibrosa usado nas análises de gel 1D. Gel corado com Coomassie Blue Colloidal. Foram aplicados 200ug do extrato de proteínas. Os 44 *spots* selecionados correspondem aos mais intensos e melhor definidos no gel 2D e estão numerados para posterior correspondência dos *spots* às proteínas identificadas.

Anexo V – Tabela VI - Proteínas identificadas no tecido cardíaco comprometido pela fibrose na endomiocardiofibrose a partir da separação por gel 1D

Gene	Proteína	Score	Massa*/pI	Cobertura (%)	Cód acesso
1. Proteínas Estruturais e Contráteis (Endomiocárdio)					
MYL3	Myosin light chain 3	57	22089/5,03	7	(P08590)
MYH7	Myosin 7	65	22300/5,8	0,5	(P12883)
ACTH	Actin, gamma-enteric smooth muscle	2070	41800/5,48	38	(P63267)
ACTA	Actin, aortic smooth muscle	1183	42000/5,39	25	(P62736)
ACTB	Actin, cytoplasmatic 1	1108	42058/5,29	25	(P60709)
TITIN	Titin	41	3812700/6,35	0,5	(Q8WZ42)
FLNA	Filamin-A	43	280600/6,06	1	(P21333)
TBB4A	Tubulin beta-4A chain	79	49600/4,88	3	(P04350)
VIME	Vimentin	690	53676/5,05	19	(P08670)
2. Metabolismo Geral					
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	200	36201/8,58	12	(P04406)
ENOA	Alpha-enolase	59	47481/6,99	4	(P06733)
APOA1	Apolipoprotein A-I	553	30759/5,56	24	(P02647)
APOA4	Apolipoprotein A-IV	54	45400/5,38	3	(P06727)
APOE	Apolipoprotein E	36	36246/5,52	3	(P02649)
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	160	39400/8,09	6	(P04075)
HPT	Haptoglobin	53	45200/6,58	2	(P00738)
PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	58	39700/5,22	3	(P27169)
3. Fosforilação oxidativa e transporte de elétrons					
ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	108	56525/5,26	9	(P06576)

Continuação da Tabela VI – Anexo V

Gene	Proteína	Score	Massa*/pI	Cobertura (%)	Cód acesso
3. Continuação Fosforilação oxidativa e transporte de elétrons					
ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	48	59828/8,28	2	(P25705)
EFTU	Elongation factor Tu, mitochondrial	46	49500/7,61	3	(P49411)
4. Resposta ao estresse e Apoptose					
CRYAB	Alpha Crystallin B chain	42	20146/6,76	5	(P02511)
A1AT	Alpha-1-antitrypsin	607	46878/5,37	15	(P01009)
HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	45	85006/4,94	3	(P07900)
SAMP	Serum amyloid P-component	610	25485/6,12	22	(P02743)
5. Resposta Imune					
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	71	40098/4,53	5	(P02765)
IGHA1	Ig alpha-1 chain C region	74	37600/6,51	5	(P01876)
IGHA2	Ig alpha-2 chain C region	72	36500/6,10	3	(P01877)
IGKC	Ig kappa chain C region	2485	11773/5,58	17	(P01834)
LAC2	Ig lambda-2 chain C regions	43	11458/6,91	9	(P0CG05)
LAC7	Ig lambda-7 chain C region	533	11300/8,28	32	(A0M8Q6)
LV302	Ig lambda chain V-III region LOI	64	12042/4,94	7	(P80748)
KV113	Ig kappa chain V-I region Lay	84	11800/7,96	8	(P01605)
IGKC	Ig kappa chain C region	297	11600/5,87	35	(P01834)
KV302	Ig kappa chain V-III region SIE	187	11882/8,7	25	(P01620)
KV309	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	76	12600/4,96	8	(P04433)
KV203	Ig kappa chain V-II region MIL	134	12000/9,29	12	(P01616)
KV113	Ig kappa chain V-I region Lay	53	11800/7,96	9	(P01605)
KV309	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	38	12600/4,96	8	(P04433)
HV316	Ig heavy chain V-III region TEI	76	12800/8,50	16	(P01777)

Continuação da Tabela VI – Anexo V

Gene	Proteína	Score	Massa*/pI	Cobertura (%)	Cód acesso
5. Continuação Resposta Imune					
HV303	Ig heavy chain V-III region VH26	45	12600/8,28	9	(P01764)
IGHG1	Ig gamma-1 chain C region	1047	36100/8,19	26	(P01857)
IGHG2	Ig gamma-2 chain C region	516	35900/7,59	17	(P01859)
IGHG3	Ig gamma-3 chain C region	2192	41300/7,90	16	(P01860)
IGHG4	Ig gamma-4 chain C region	921	35900/7,36	18	(P01861)
A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	80	23725/5	4	(P02763)
CO3	Complement 3	56	188569/6,0	1	(P01024)
C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C	53	25800/8,41	5	(P02747)
AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	70	47600/5,52	5	(P01011)
6. Matriz Extracelular (Estrutura e Organização) e Reparação tecidual					
CO6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	323	109709/5,85	5	(P12110)
CO6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	2027	345167/6,15	9	(P12111)
CO1A1	Collagen alpha-1(I) chain	68	138900/5,8	1	(P02452)
CO6A1	Collagen alpha-1(VI)	360	108500/5,43	5	(P12109)
CO1A2	Collagen alpha-2(I) chain	74	129200/8,95	1	(P08123)
PGS2	Decorin	113	39700/8,54	6	(P07585)
DERM	Dermatopontin	537	24559/4,7	5	(Q07507)
PGS1	Biglycan	192	41600/7,52	6	(P21810)
ANXA2	Annexin A2	202	38600/7,75	15	(P07355)
PRELP	Prolargin	574	44181/9,45	18	(P51888)
LUM	Lumican	488	38747/6,17	12	(P51884)
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	24	82800/4,60	1	(P49747)
TARSH	Target of Nesh-SH3	50	118600/9,44	1	(Q7Z7G0)

Continuação da Tabela VI – Anexo V

Gene	Proteína	Score	Massa*/pI	Cobertura (%)	Cód acesso
6. Continuação Matriz Extracelular (Estrutura e Organização) e Reparação tecidual					
FINC	Fibronectin	303	262500/5,71	3	(P02751)
TAGL	Transgelin	44	22600/8,84	5	(Q01995)
VTNC	Vitronectin	68	54300/5,80	3	(P04004)
7. Ciclo celular e proliferação					
MIME	Mimecan	557	34243/5,22	11	(P20774)
8. Sinalização Celular e Controle de Transcrição e Tradução					
DSRAD	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	31	136000/8,65	1	(P55265)
H13	Histone H1.3	31	22300/11,02	4	(P16402)
H2B1K	Histone H2B type 1-K	86	13900/10,32	12	(O60814)
SETX	Probable helicase senataxin	843	302700/7,17	0,5	(Q7Z333)
1433T	14-3-3 protein theta	30	28032/4,68	3	(P27348)
ROA2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	75	37400/8,95	3	(P22626)
RS8	40S ribosomal protein S8	72	24200/10,32	7	(P62241)
9. Outras funções (adesão, transporte, coagulação)					
PEDF	Pigment epithelium-derived factor	77	46300/6,38	5	(P36955)
TRFE	Serotransferrin	164	79294/6,81	4	(P02787)
ANXA5	Annexin A5	140	35971/4,93	7	(P08758)
ALBU	Serum albumin	1651	71352/5,92	32	(P02768)
CAH1	Carbonic anhydrase 1	49	28909/6,63	3	(P00915)
FIBB	Fibrinogen beta chain	283	55900/8,27	12	(P02675)
FIBG	Fibrinogen gamma chain	43	51500/5,62	2	(P02679)

Conclusão da Tabela VI – Anexo V

Gene	Proteína	Score	Massa*/pI	Cobertura (%)	Cód acesso
9. Continuação outras funções (adesão, transporte, coagulação)					
HEMO	Hemopexin	44	51600/7,02	2	(P02790)
CERU	Ceruloplasmin	64	122983/5,41	1	(P00450)
POTEF	POTE ankyrin domain family member F	824	1214/6,2	5	(A5A3E0)
AMBP	Protein AMBP	52	39000/6,25	2	(P02760)
MFAP4	Microfibril-associated glycoprotein 4	41	28600/5,63	3	(P55083)
CSPG2	Versican core protein	49	372600/4,51	0,5	(P13611)
10. Função não descrita					
IQCE	IQ domain-containing protein E	28	77300/9,07	1	(Q6IPM2)

Anexo W – Tabela VII - Proteínas identificadas no tecido cardíaco comprometido pela fibrose na EMF a partir da separação por gel 2D

<i>Spot</i>	<i>Gene</i>	<i>Proteína</i>	<i>Score</i>	<i>Massa*/pI (T)</i>	<i>Massa*/ pI (E)</i>	<i>Cobertura (%)</i>	<i>Código acesso</i>
1. Proteínas Estruturais e Contráteis (Endomiocárdio)							
4	MYL3	Myosin light chain 3	80	22089/5,03	25/5,21	27	(P08590)
2	MYL10	Myosin regulatory light chain 10	68	17090/4,56	19/4,78	14	(Q9BUA6)
4	MYL6	Myosin light polypeptide 6	66	17090/4,56	25/5,21	16	(P60660)
14	ACTS	Actin, alpha skeletal muscle	391	42372/5,23	43/5,25	21	(P68133)
37	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1	295	42334/5,23	55/5,09	27	(P68032)
14	ACTB	Actin, cytoplasmatic 1	184	42058/5,29	43/5,25	10	(P60709)
14	ACTBL	Beta-actin-like protein 2	101	42324/5,39	43/5,25	10	(Q562R1)
19	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	651	32746/4,69	36/4,37	40	(P09493)
19	TPM2	Tropomyosin beta chain	248	32945/4,66	36/4,37	15	(P07951)
19	TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain	144	32856/4,68	36/4,37	19	(P06753)
23	TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	364	28619/4,67	32/4,33	30	(P67936)
26	AINX	Alpha-internexin	49	55528/5,34	52/4,13	2	(Q16352)
10	DESM	Desmin	101	53560/5,21	54/3,82	15	(P17661)
8	VIME	Vimentin	1101	53676/5,05	43/4,49	39	(P08670)
20	GFAP	Glial fibrillary acidic protein	103	49907/5,42	27/5,52	20	(P14136)
42	DIAP1	Protein diaphanous homolog 1	38	141942/5,31	79/6,97	1	(O60610)
2. Metabolismo de Carboidratos							
22	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	499	36201/8,58	36/9,65	30	(P04406)
28	ENOA	Alpha-enolase	243	47481/6,99	47/7,38	25	(P06733)
28	ENOB	Beta-enolase	168	47244/7,73	47/7,38	12	(P13929)
5	TXTP	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	35	34333/9,91	34/5,23	3	(P53007)
41	GLGB	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	36	80807/5,87	56/4,76	5	(Q04446)

Continuação da Tabela VII – Anexo W

<i>Spot</i>	<i>Gene</i>	<i>Proteína</i>	<i>Score</i>	<i>Massa*/pI (T)</i>	<i>Massa*/ pI (E)</i>	<i>Cobertura (%)</i>	<i>Código acesso</i>
2. Continuação de Metabolismo de Carboidratos							
41	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	104	40022/5,71	56/4,76	7	(P50213)
3. Transporte de Energia							
18	KCRM	Creatine kinase M-type	128	43302/6,77	42/7,36	15	(P06732)
4. Fosforilação oxidativa e transporte de elétrons							
9	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	690	56525/5,26	50/4,99	33	(P06576)
40	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	41	59828/8,28	52/7,58	1	(P25705)
5. Metabolismo lipídico							
4	APOA1	Apolipoprotein A-I	36	30759/5,56	25/5,21	8	(P02647)
31	AAKG1	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma 1	88	37727/6,42	26/9,61	9	(P54619)
31	PLIN2	Perilipin-2	39	48274/6,34	26/9,61	8	(Q99541)
32	LIPH	Lipase member H	36	51568/6,94	54/4,96	5	(Q8WWY8)
20	APOE	Apolipoprotein E	40	36246/5,52	27/5,52	3	(P02649)
6. Resposta ao estresse e Apoptose							
16	CRYAB	Alpha Crystallin B chain	319	20146/6,76	22/7,38	25	(P02511)
41	A1AT	Alpha-1-antitrypsin	1608	46878/5,37	56/4,76	50	(P01009)
20	HSPB1	Heat shock protein beta-1	340	22826/5,98	27/5,52	35	(P04792)
23	HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	44	85006/4,94	32/4,33	5	(P07900)
20	SAMP	Serum amyloid P-component	3042	25485/6,12	27/5,52	35	(P02743)
29	FNIP2	Folliculin-interacting protein 2	53	123634/6,2	27/6,68	8	(Q9P278)

Continuação da Tabela VII – Anexo W

<i>Spot</i>	<i>Gene</i>	<i>Proteína</i>	<i>Score</i>	<i>Massa*/pI (T)</i>	<i>Massa*/ pI (E)</i>	<i>Cobertura (%)</i>	<i>Código acesso</i>
6. Continuação de Resposta ao estresse e Apoptose							
39	1433Z	14-3-3 protein zeta/delta	330	27889/4,73	29/4,49	31	(P63104)
20	OBSCN	Obscurin	36	879630/5,69	27/5,52	4	(Q5VST9)
34	PTEN	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase PTEN	38	47706/5,94	37/5,58	4	(P60484)
7. Resposta Imune							
35	FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	130	40098/4,53	54/4,04	4	(P02765)
30	IGKC	Ig kappa chain C region	924	11773/5,58	26/8,94	80	(P01834)
20	LAC2	Ig lambda-2 chain C regions	457	11458/6,91	27/5,52	46	(P0CG05)
20	LAC1	Ig lambda-1 chain C regions	252	11512/7,89	27/5,52	44	(P0CG04)
20	LV302	Ig lambda chain V-III region LOI	36	12042/4,94	27/5,52	7	(P80748)
21	KV401	Ig kappa chain V-IV region (fragment)	61	13486/5,09	27/5,99	7	(P06312)
27	KV302	Ig kappa chain V-III region SIE	73	11882/8,7	27/7,63	14	(P01620)
30	KV114	Ig kappa chain V-I region OU	187	11884/9,94	26/8,94	22	(P01606)
30	KV105	Ig kappa chain V-I region DEE	187	11768/9,43	26/8,94	22	(P01597)
30	KV116	Ig kappa chain V-I region Roy	152	11889/5,12	26/8,94	24	(P01608)
25	A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	346	23725/5	45/3,23	24	(P02763)
25	A1AG2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	174	23873/5,12	45/3,23	8	(P19652)
11	CO3	Complement 3	39	188569/6,0	69/7,50	2	(P01024)
33	CO9	Complement component C9	41	64615/5,42	75/5,09	1	(P02748)
44	ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	35	103521/6,51	106/5,50	4	(Q14624)

Continuação da Tabela VII – Anexo W

<i>Spot</i>	<i>Gene</i>	<i>Proteína</i>	<i>Score</i>	<i>Massa*/pI (T)</i>	<i>Massa*/ pI (E)</i>	<i>Cobertura (%)</i>	<i>Código acesso</i>
8. Matriz Extracelular (Estrutura e Organização) e Reparação tecidual							
44	CO6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	42	109709/5,85	106/5,50	2	(P12110)
44	CO6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	186	345167/6,15	106/5,50	3	(P12111)
1	DERM	Dermatopontin	149	24559/4,7	21/3,59	5	(Q07507)
26	PERI	Peripherin	103	53732/5,37	52/4,13	11	(P41219)
33	PRELP	Prolargin	147	44181/9,45	75/5,09	11	(P51888)
33	LUM	Lumican	56	38747/6,17	75/5,09	20	(P51884)
44	TENX	Tenascin-X	52	471047/5,19	106/5,50	1	(P22105)
9. Ciclo celular e proliferação							
1	UBP16	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16	36	94936/6,5	21/3,59	1	(Q9Y5T5)
39	1433G	14-3-3 protein gamma	78	28456/4,8	29/4,49	9	(P61981)
39	1433E	14-3-3 protein epsilon	78	29326/4,63	29/4,49	27	(P62258)
6	MIME	Mimecan	70	34243/5,22	39/4,31	2	(P20774)
10. Sinalização Celular e Controle de Transcrição e Tradução							
7	TF2H4	General transcription factor IIH subunit 4	35	52324/9,12	40/4,51	1	(Q92759)
3	NF2L1	Nuclear factor erythroid 2-related factor 1	35	84994/4,52	24/4,99	1	(Q14494)
39	1433T	14-3-3 protein theta	124	28032/4,68	29/4,49	12	(P27348)
36	FLI1	Friend leukemia integration 1 transcription f...	36	51178/6,57	43/5,66	5	(Q01543)
36	ERG	Transcriptional regulator ERG	36	54859/7,01	43/5,66	2	(P11308)
9	MTER3	mTERF domain-containing protein 3, mitochondrial	35	44956/8,54	50/4,99	6	(Q49AM1)

Conclusão da Tabela VII – Anexo W

<i>Spot</i>	<i>Gene</i>	<i>Proteína</i>	<i>Score</i>	<i>Massa*/pI</i> <i>(T)</i>	<i>Massa*/</i> <i>pI (E)</i>	<i>Cobertura</i> <i>(%)</i>	<i>Código acesso</i>
11. Outras funções							
17	TRFE	Serotransferrin	3127	79294/6,81	79/6,97	70	(P02787)
24	ANXA5	Annexin A5	687	35971/4,93	32/4,82	26	(P08758)
27	HBB	Hemoglobin subunit beta	728	16102/6,81	27/7,63	93	(P68871)
27	HBG1	Hemoglobin subunit gamma-1	162	16187/6,71	27/7,63	15	(P69891)
15	ALBU	Serum albumin	251	71352/5,92	70/5,97	14	(P02768)
43	CAH1	Carbonic anhydrase 1	181	28909/6,63	29/7,22	13	(P00915)
13	PYR1	CAD protein	37	245167/6,02	52/7,05	1	(P27708)
4	CRML	Protein cramped-like	35	135833/8,08	25/5,21	2	(Q96RY5)
12	AXA2L	Putative annexin A2-like protein	36	38806/6,48	36/7,34	1	(A6NMY6)
44	S6A15	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT2	35	82695/5,06	106/5,50	1	(Q9H2J7)
39	SEC63	Translocation protein SEC63 homolog	42	88341/5,2	29/4,49	1	(Q9UGP8)
44	CERU	Ceruloplasmin	511	122983/5,41	106/5,50	15	(P00450)
34	TTHY	Transthyretin	309	15991/5,31	34/5,58	33	(P02766)
38	CAC1H	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H	42	262191/7,13	34/5,09	3	(O95180)
20	RN149	E3 ubiquitin-protein ligase RNF149	37	43707/5,61	27/5,52	16	(Q8NC42)
22	DCAF8	DDB1- and CUL4-associated factor 8	42	67495/5,21	36/9,65	5	(Q5TAQ9)
36	POTEI	POTE ankyrin domain family member I	55	122858/5,83	43/5,66	7	(P0CG38)
36	POTEJ	POTE ankyrin domain family member J	55	118740/5,66	43/5,66	8	(P0CG39)
42	MAST4	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4	37	286426/8,85	78/7,68	6	(O15021)
31	CP062	UPF0505 protein C16orf62	37	110860/6,82	26/9,61	7	(Q7Z3J2)
29	SRPX	Sushi repeat-containing protein SRPX	135	52793/8,84	27/6,68	4	(P78539)

Legenda: PM (peso molecular – em kDa); pI (ponto isoelétrico)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências bibliográficas

1. DAVIES JN, BALL JD. The pathology of endomyocardial fibrosis in Uganda. *Br Heart J*. 1955;17(3):337-59.
2. Sliwa K, Mocumbi AO. Forgotten cardiovascular diseases in Africa. *Clin Res Cardiol*. 2010;99(2):65-74.
3. Shaper AG. Cardiovascular disease in the tropics. II. Endomyocardial fibrosis. *Br Med J*. 1972;3(5829):743-6.
4. Mocumbi AO, Ferreira MB, Sidi D, Yacoub MH. A population study of endomyocardial fibrosis in a rural area of Mozambique. *N Engl J Med*. 2008;359(1):43-9.
5. Salemi VM, Leite JJ, Picard MH, Oliveira LM, Reis SF, Pena JL, et al. Echocardiographic predictors of functional capacity in endomyocardial fibrosis patients. *Eur J Echocardiogr*. 2009;10(3):400-5.
6. DAVIES JN. Pathology of Central African Natives; Mulago Hospital post mortem studies. *East Afr Med J*. 1948;25(12):454-67.
7. Lira VM. [Endomyocardial fibrosis. Pathology]. *Arq Bras Cardiol*. 1996;67(4):273-7.
8. Salemi VM, Rochitte CE, Shiozaki AA, Andrade JM, Parga JR, de Ávila LF, et al. Late gadolinium enhancement magnetic resonance imaging in the diagnosis and prognosis of endomyocardial fibrosis patients. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2011;4(3):304-11.
9. Iglezias SD, Benvenuti LA, Calabrese F, Salemi VM, Silva AM, Carturan E, et al. Endomyocardial fibrosis: pathological and molecular findings of surgically resected ventricular endomyocardium. *Virchows Arch*. 2008;453(3):233-41.
10. Bukhman G, Ziegler J, Parry E. Endomyocardial fibrosis: still a mystery after 60 years. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(2):e97.
11. Kushwaha SS, Fallon JT, Fuster V. Restrictive cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1997;336(4):267-76.
12. Iglezias. Endomiocardiofibrose: patologia e correlação clínica em material de ressecção cirúrgica. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
13. Andy JJ, Ogunowo PO, Akpan NA, Odigwe CO, Ekanem IA, Esin RA. Helminth associated hypereosinophilia and tropical endomyocardial fibrosis (EMF) in Nigeria. *Acta Trop*. 1998;69(2):127-40.
14. Brockington IF, Olsen EG. Eosinophilia and endomyocardial fibrosis. *Postgrad Med J*. 1972;48(566):740-1.
15. Kita H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev*. 2011;242(1):161-77.
16. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):57-83.
17. Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Weller PF. Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J Immunol*. 2001;166(8):4813-7.

18. Lacy P, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Hagen SC, Velazquez JR, Man SF, et al. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils. *Blood*. 1999;94(1):23-32.
19. Möller GM, de Jong TA, van der Kwast TH, Overbeek SE, Wierenga-Wolf AF, Thepen T, et al. Immunolocalization of interleukin-4 in eosinophils in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;14(5):439-43.
20. Levi-Schaffer F, Lacy P, Severs NJ, Newman TM, North J, Gomperts B, et al. Association of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood*. 1995;85(9):2579-86.
21. Levi-Schaffer F, Barkans J, Newman TM, Ying S, Wakelin M, Hohenstein R, et al. Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology*. 1996;87(1):155-61.
22. Woerly G, Loiseau S, Loyens M, Schoch C, Capron M. Inhibitory effects of ketotifen on eotaxin-dependent activation of eosinophils: consequences for allergic eye diseases. *Allergy*. 2003;58(5):397-406.
23. Lamkhieoued B, Aldebert D, Gounni AS, Delaporte E, Goldman M, Capron A, et al. Synthesis of cytokines by eosinophils and their regulation. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107(1-3):122-3.
24. Wong DT, Elovic A, Matossian K, Nagura N, McBride J, Chou MY, et al. Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor beta 1. *Blood*. 1991;78(10):2702-7.
25. Ive FA, Willis AJ, Ikeme AC, Brockington IF. Endomyocardial fibrosis and filariasis. *Q J Med*. 1967;36(144):495-516.
26. Rashwan MA, Ayman M, Ashour S, Hassanin MM, Zeina AA. Endomyocardial fibrosis in Egypt: an illustrated review. *Br Heart J*. 1995;73(3):284-9.
27. Carneiro ReC, Santos AL, Brant LC, Rabelo FT, Ligeiro CM, Barcelos IP, et al. Endomyocardial fibrosis associated with mansoni schistosomiasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(5):644-5.
28. Olsen EG, Spry CJ. Relation between eosinophilia and endomyocardial disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 1985;27(4):241-54.
29. Ogbogu PU, Rosing DR, Horne MK. Cardiovascular manifestations of hypereosinophilic syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27(3):457-75.
30. Spry CJ, Tai PC, Davies J. The cardiotoxicity of eosinophils. *Postgrad Med J*. 1983;59(689):147-53.
31. Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wassom DL, Steinmuller D. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol*. 1979;123(6):2925-7.
32. Priglinger U, Drach J, Ullrich R, Baumgartner H, Huber K, Maurer G. Idiopathic eosinophilic endomyocarditis in the absence of peripheral eosinophilia. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(1):215-8.
33. Fauci AS, Harley JB, Roberts WC, Ferrans VJ, Gralnick HR, Bjornson BH. NIH conference. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. Clinical, pathophysiologic, and therapeutic considerations. *Ann Intern Med*. 1982;97(1):78-92.
34. Kleinfeldt T, Nienaber CA, Kische S, Akin I, Turan RG, Körber T, et al. Cardiac manifestation of the hypereosinophilic syndrome: new insights. *Clin Res Cardiol*. 2010;99(7):419-27.

35. Weller PF, Bubley GJ. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Blood*. 1994;83(10):2759-79.
36. Yildiran A, Ikinciogullari A. Pediatric hypereosinophilic syndrome (HES) clinically differs from adult HES, but there is a lack of confirmatory laboratory data. *J Pediatr*. 2005;147(6):869; author reply -70.
37. Benezet-Mazuecos J, de la Fuente A, Marcos-Alberca P, Farre J. Loeffler endocarditis: what have we learned? *Am J Hematol*. 2007;82(10):861-2.
38. Falase AO, Ogah OS. Cardiomyopathies and myocardial disorders in Africa: present status and the way forward. *Cardiovasc J Afr*. 2012;23(10):552-62.
39. Finkelman FD, Urban JF. The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(5):772-80.
40. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA, Barrett MA, Davis SE, Gatewood SJ, et al. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *Am J Pathol*. 2004;165(6):1883-94.
41. Shinkai K, Mohrs M, Locksley RM. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature*. 2002;420(6917):825-9.
42. Sabin EA, Kopf MA, Pearce EJ. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J Exp Med*. 1996;184(5):1871-8.
43. Bennich HH, Ishizaka K, Johansson SG, Rowe DS, Stanworth DR, Terry WD. Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin. *Immunology*. 1968;15(3):323-4.
44. Radcliffe MJ, Lewith GT, Prescott P, Church MK, Holgate ST. Do skin prick and conjunctival provocation tests predict symptom severity in seasonal allergic rhinoconjunctivitis? *Clin Exp Allergy*. 2006;36(12):1488-93.
45. Koyasu S, Moro K. Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. *Immunology*. 2011;132(4):475-81.
46. Nicoletti A, Michel JB. Cardiac fibrosis and inflammation: interaction with hemodynamic and hormonal factors. *Cardiovasc Res*. 1999;41(3):532-43.
47. Westermann D, Lindner D, Kasner M, Zietsch C, Savvatis K, Escher F, et al. Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circ Heart Fail*. 2011;4(1):44-52.
48. Distefano G, Sciacca P. Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. *Ital J Pediatr*. 2012;38:41.
49. Aukrust P, Gullestad L, Ueland T, Damås JK, Yndestad A. Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: potential therapeutic implications. *Ann Med*. 2005;37(2):74-85.
50. Calabrese F, Thiene G. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects. *Cardiovasc Res*. 2003;60(1):11-25.
51. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:81-101.
52. Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*. 2004;90(4):464-70.
53. Bucova M, Bernadic M, Buckingham T. C-reactive protein, cytokines and inflammation in cardiovascular diseases. *Bratisl Lek Listy*. 2008;109(8):333-40.

54. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003;107(3):499-511.
55. Michowitz Y, Arbel Y, Wexler D, Sheps D, Rogowski O, Shapira I, et al. Predictive value of high sensitivity CRP in patients with diastolic heart failure. *Int J Cardiol*. 2008;125(3):347-51.
56. Ishikawa C, Tsutamoto T, Fujii M, Sakai H, Tanaka T, Horie M. Prediction of mortality by high-sensitivity C-reactive protein and brain natriuretic peptide in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J*. 2006;70(7):857-63.
57. Xue C, Feng Y, Wo J, Li Y. Prognostic value of high-sensitivity C-reactive protein in patients with chronic heart failure. *N Z Med J*. 2006;119(1245):U2314.
58. Vinay Kumar AKA, Nelson Fausto. *Patologia: Bases patológicas das doenças*. 8 ed2005. 1504 p.
59. Calabró P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*. 2003;108(16):1930-2.
60. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab*. 2000;71(1-2):418-35.
61. Hogaboam CM, Steinhauser ML, Chensue SW, Kunkel SL. Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int*. 1998;54(6):2152-9.
62. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest*. 1997;100(4):768-76.
63. D.L N, M C. Lehninger - *Princípios de Bioquímica*. 3ª edição ed: Savier; 2003.
64. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol*. 1993;3(6):327-32.
65. McGregor E, Dunn MJ. Proteomics of heart disease. *Hum Mol Genet*. 2003;12 Spec No 2:R135-44.
66. Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circ Res*. 2001;88(8):763-73.
67. Cubedo J, Padró T, García-Moll X, Pintó X, Cinca J, Badimon L. Proteomic signature of Apolipoprotein J in the early phase of new-onset myocardial infarction. *J Proteome Res*. 2011;10(1):211-20.
68. Hammer E, Goritzka M, Ameling S, Darm K, Steil L, Klingel K, et al. Characterization of the human myocardial proteome in inflammatory dilated cardiomyopathy by label-free quantitative shotgun proteomics of heart biopsies. *J Proteome Res*. 2011;10(5):2161-71.
69. Teixeira PC, Iwai LK, Kuramoto AC, Honorato R, Fiorelli A, Stolf N, et al. Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(12):1549-62.
70. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European

Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18(12):1440-63.

71. Liu X, Yu X, Zack DJ, Zhu H, Qian J. TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulation. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:271.

72. Patel AK, D'Arbela PG, Somers K. Endomyocardial fibrosis and eosinophilia. *Br Heart J*. 1977;39(3):238-41.

73. Rutakingirwa M, Ziegler JL, Newton R, Freers J. Poverty and eosinophilia are risk factors for endomyocardial fibrosis (EMF) in Uganda. *Trop Med Int Health*. 1999;4(3):229-35.

74. deMello DE, Liapis H, Jureidini S, Nouri S, Kephart GM, Gleich GJ. Cardiac localization of eosinophil-granule major basic protein in acute necrotizing myocarditis. *N Engl J Med*. 1990;323(22):1542-5.

75. Janin A. Eosinophilic myocarditis and fibrosis. *Hum Pathol*. 2005;36(5):592-3; 3.

76. Fallon PG, Mangan NE. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(3):220-30.

77. Lynch NR, Pérez M, López RI, Turner KJ. Measurement of anti-*Ascaris* IgE antibody levels in tropical allergic patients, using modified ELISA. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1987;15(1):19-24.

78. te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, de Vries JE, Figdor CG. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood*. 1990;76(7):1392-7.

79. Chen L, Grabowski KA, Xin JP, Coleman J, Huang Z, Espiritu B, et al. IL-4 induces differentiation and expansion of Th2 cytokine-producing eosinophils. *J Immunol*. 2004;172(4):2059-66.

80. MacDonald AS, Araujo MI, Pearce EJ. Immunology of parasitic helminth infections. *Infect Immun*. 2002;70(2):427-33.

81. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(1):69-75.

82. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):331-44.

83. Yamaoka M, Yamaguchi S, Okuyama M, Tomoike H. Anti-inflammatory cytokine profile in human heart failure: behavior of interleukin-10 in association with tumor necrosis factor-alpha. *Jpn Circ J*. 1999;63(12):951-6.

84. Schopf LR, Hoffmann KF, Cheever AW, Urban JF, Wynn TA. IL-10 is critical for host resistance and survival during gastrointestinal helminth infection. *J Immunol*. 2002;168(5):2383-92.

85. Figueiredo CA, Barreto ML, Rodrigues LC, Cooper PJ, Silva NB, Amorim LD, et al. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. *Infect Immun*. 2010;78(7):3160-7.

86. Ali SK, Eldaim IN, Osman SH, Bakhite SM. Clinical and echocardiographic features of children with rheumatic heart disease and their serum cytokine profile. *Pan Afr Med J*. 2012;13:36.

87. Amosova EN, Shpak YV, Nedoždij AV, Produsevich LV. Proinflammatory cytokine levels in patients with diastolic heart failure. *Kardiol Pol*. 2004;61(7):17-20.

88. De Gennaro L, Brunetti ND, Montrone D, De Rosa F, Cuculo A, Di Biase M. Subacute inflammatory activation in subjects with acute coronary syndrome and left ventricular dysfunction. *Inflammation*. 2012;35(1):363-70.
89. Cidlowski LMaJ. Physiologic and pharmacologic effects of corticosteroids. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th ed2003.
90. Matsumori A, Ono K, Sato Y, Shioi T, Nose Y, Sasayama S. Differential modulation of cytokine production by drugs: implications for therapy in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(12):2491-9.
91. Gage JR, Fonarow G, Hamilton M, Widawski M, Martínez-Maza O, Vredevoe DL. Beta blocker and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy is associated with decreased Th1/Th2 cytokine ratios and inflammatory cytokine production in patients with chronic heart failure. *Neuroimmunomodulation*. 2004;11(3):173-80.
92. Dinh W, Füh R, Nickl W, Krahn T, Ellinghaus P, Scheffold T, et al. Elevated plasma levels of TNF-alpha and interleukin-6 in patients with diastolic dysfunction and glucose metabolism disorders. *Cardiovasc Diabetol*. 2009;8:58.
93. Wisniacki N, Taylor W, Lye M, Wilding JP. Insulin resistance and inflammatory activation in older patients with systolic and diastolic heart failure. *Heart*. 2005;91(1):32-7.
94. Kosmala W, Derzhko R, Przewlocka-Kosmala M, Orda A, Mazurek W. Plasma levels of TNF-alpha, IL-6, and IL-10 and their relationship with left ventricular diastolic function in patients with stable angina pectoris and preserved left ventricular systolic performance. *Coron Artery Dis*. 2008;19(6):375-82.
95. Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev*. 2000;5(3):271-80.
96. Corbett JM, Why HJ, Wheeler CH, Richardson PJ, Archard LC, Yacoub MH, et al. Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998;19(11):2031-42.
97. Naugle JE, Olson ER, Zhang X, Mase SE, Pilati CF, Maron MB, et al. Type VI collagen induces cardiac myofibroblast differentiation: implications for postinfarction remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(1):H323-30.
99. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*. 2007;127(3):526-37.
100. Querejeta R, López B, González A, Sánchez E, Larman M, Martínez Ubago JL, et al. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation*. 2004;110(10):1263-8.
101. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*. 1989;13(7):1637-52.
102. Wilson R, Belluoccio D, Bateman JF. Proteomic analysis of cartilage proteins. *Methods*. 2008;45(1):22-31.
103. Scallan J HV, Korthuis RJ. Pathophysiology of Edema Formation. *Capillary Fluid Exchange: Regulation, Functions, and Pathology*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
104. Kehl DW, Iqbal N, Fard A, Kipper BA, De La Parra Landa A, Maisel AS. Biomarkers in acute myocardial injury. *Transl Res*. 2012;159(4):252-64.

105. Stumpf C, Lehner C, Yilmaz A, Daniel WG, Garlachs CD. Decrease of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in patients with advanced chronic heart failure. *Clin Sci (Lond)*. 2003;105(1):45-50.
106. Gullestad L, Kjekshus J, Damås JK, Ueland T, Yndestad A, Aukrust P. Agents targeting inflammation in heart failure. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005;14(5):557-66.
107. Kaur K, Sharma AK, Singal PK. Significance of changes in TNF-alpha and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(1):H106-13.
108. Myrianthefs PM, Lazaris N, Venetsanou K, Smigadis N, Karabatsos E, Anastasiou-Nana MI, et al. Immune status evaluation of patients with chronic heart failure. *Cytokine*. 2007;37(2):150-4.
109. Amir O, Rogowski O, David M, Lahat N, Wolff R, Lewis BS. Circulating interleukin-10: association with higher mortality in systolic heart failure patients with elevated tumor necrosis factor-alpha. *Isr Med Assoc J*. 2010;12(3):158-62.
110. Sato Y, Takatsu Y, Kataoka K, Yamada T, Taniguchi R, Sasayama S, et al. Serial circulating concentrations of C-reactive protein, interleukin (IL)-4, and IL-6 in patients with acute left heart decompensation. *Clin Cardiol*. 1999;22(12):811-3.
111. Roselló-Lletí E, Rivera M, Bertomeu V, Cortés R, Jordán A, González-Molina A. [Interleukin-4 and cardiac fibrosis in patients with heart failure]. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60(7):777-80.
112. Zymek P, Nah DY, Bujak M, Ren G, Koerting A, Leucker T, et al. Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007;74(2):313-22.
113. Sun L, Louie MC, Vannella KM, Wilke CA, LeVine AM, Moore BB, et al. New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(3):L341-53.
114. Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol*. 2003;171(7):3655-67.
115. Shi Q, Liu X, Bai Y, Cui C, Li J, Li Y, et al. In vitro effects of pirfenidone on cardiac fibroblasts: proliferation, myofibroblast differentiation, migration and cytokine secretion. *PLoS One*. 2011;6(11):e28134.
116. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors*. 2011;29(5):196-202.
117. Ghosh AK, Varga J. The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis. *J Cell Physiol*. 2007;213(3):663-71.
118. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012;110(1):159-73.