

Luciana Gabriel Nogueira Barbosa

**Expressão de citocinas inflamatórias e
quimiocinas no tecido cardíaco de pacientes
com Cardiomiopatia Chagásica Crônica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha Neto

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Barbosa, Luciana Gabriel Nogueira

Expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas no tecido cardíaco de
pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica / Luciana Gabriel Nogueira
Barbosa. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Edecio Cunha Neto.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.Cardiomiopatias 3.Quimiocinas 4.Citocinas
5.Miocárdio 6.Expressão gênica 7.Inflamação

USP/FM/SBD-378/08

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 14.09.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **739/05**, intitulado: "Expressão de Citocinas Inflamatórias e Quimiocinas no Tecido Cardíaco de Pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica: Indução de Fenótipo Hipertrófico e de Depleção de ATP em Cardiomiócitos em Cultura" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO**, 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: **Prof. Dr. Edecio Cunha Neto**

Pesquisador (a) Executante: **Sra. Luciana Gabriel Nogueira Barbosa**

CAPPesq, 14 de Setembro de 2005.



PROF. DR. CLAUDIO LEONE

**Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa**

***“É justamente a possibilidade de
realizar um sonho que torna a
vida interessante”.***

(autor desconhecido)

“Tudo posso naquele que me fortalece...”

Dedico este trabalho...

A **Deus** que guiou minha vinda para esta Faculdade e mostrou-me o caminho para a realização desta tese, pelo dom da vida, pela saúde, perseverança, alegrias, família, amigos...

A minha amada família:

Ao meu amado **Thiago** pelo amor, paciência, por toda doação durante esses anos e por todos os momentos da realização desta tese. Pelo companheirismo e todo o carinho nos momentos alegres e nos momentos difíceis. Pelo constante incentivo e por compreender minhas ausências. Pela alegria e riqueza de dividir a vida com você, por todo o aprendizado da nossa caminhada, por todos os sonhos já vividos e por todos aqueles que ainda lutamos por alcançar. Muito, muito obrigada. Sempre Juntos!!!

Meus pais **Orécio** e **Lúcia** pelo amor, carinho, compreensão, incentivo, por me ensinarem a viver com humildade e por abdicarem de sonhos próprios para que os meus fossem realizados. Por todas as orações e pela família linda que temos.

Aos meus irmãos **Orécio (Gu)** e Luana pelo amor, carinho e por compartilharmos sonhos, alegrias e realizações.

A minha sobrinha/afilhada **Thaís** que é a alegria de nossas vidas.

Aos meus padrinhos **Antônio** e **Olímpia**, por todo o carinho e pelas orações.

“Devo confessar que os “agradecimentos” são de alguma forma sempre cruéis, ou porque faltam palavras para expressar a gratidão que sentimos, ou faltam alguns nomes, que talvez pelo cansaço, deixamo-nos de recordar. Enfim, o espaço parece pequeno, o tempo escasso e o desejo do término da redação inevitável. Espero que em meus agradecimentos consiga representar com carinho e amizade a honra em finalizar essa etapa de longo trabalho que se segue. Peço aos meus amigos não estranharem a redação de forma sucinta, mas prefiro agradecer-lhes em gestos mais que em palavras...”

Ao meu orientador **Prof. Dr. Edecio Cunha Neto**, pela orientação sempre inteligente, por me receber em seu grupo e pela oportunidade de desenvolver este trabalho: muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Jorge Kalil**, por me receber em seu laboratório, pelas discussões nas reuniões de grupo, críticas e sugestões.

A Dra. Verônica Coelho e Dra. Luiza Guilherme, pelas discussões nas reuniões de grupo, críticas e sugestões.

A equipe médica da unidade de transplante cardíaco do Instituto do Coração, **Dr. Noedir Stolf, Dr. Ronaldo Honorato e Dr. Alfredo Fiorelli**, pelo indispensável auxílio na obtenção das amostras que muito contribuíram para a realização deste estudo.

Aos professores Dr. José Maria Mosig, Dr. Pedro Bianchi e Dra. Cristina Kokron, pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora na qualificação engrandecendo as discussões deste trabalho.

As queridas amigas **Beatriz Stolf, Daniela Santoro, Simone Fonseca e Sandra Drigo**, pela amizade e ajuda imprescindível para o término da qualificação e desta tese e pela disponibilidade de discutir com entusiasmo e grande sabedoria todos os resultados.

As queridas amigas **Adriana Coutinho e Eliane Mairena**, pela amizade, dedicação, companheirismo e pela indispensável ajuda no decorrer e término desta tese.

A amiga **Ana Lucia Garippo**, pela indispensável ajuda nas imagens obtidas no confocal, pela nossa próspera amizade e mútuo companheirismo.

Aos ternos amigos do laboratório, **Ruth, Malú, Fábio, Sandra Emiko, Adalberto, Beatriz Fortunato, Cláudio, Washington, Sandra Maria, Carlos, Santa, Marcelo, Sandra, Samar, Raquel, Natália, Sandra Moraes, Patrícia, Vitor, Suzane, Fabiana, Amanda, Elza, Pedro, Hernandez, Selma, Karla, Geórgia, Carol Luque...** por todo o respeito, carinho, atenção, disponibilidade e mútuo companheirismo.

A amiga e secretária **Tânia** pela paciência, atenção, dedicação e infindáveis resoluções burocráticas.

Aos prestativos amigos, **Jair Martins, Sônia, Gisele, Silvano, Andréia e Fernanda** pela paciência, atenção e competência nas resoluções burocráticas. Agradeço a amizade e convívio.

As ternas amigas **Raimunda e Elaine**, por manterem o laboratório e o material pronto para uso, pela disponibilidade, atenção e carinho.

Ao **Dr. Luiz Benvenutti** (Serviço de Anatomia e Patologia do InCor), pela ajuda nas análises histopatológicas e pela disponibilidade em conversar sobre o trabalho.

Aos amigos **Antônio e Nádia** (Serviço de Anatomia e Patologia do InCor), pela ajuda na obtenção dos cortes/lâminas e nas resoluções burocráticas.

A **Prof. Dra. Walderez Dutra**, por me receber em seu laboratório para os experimentes iniciais de imunofluorescência, pela disponibilidade e atenção, e a todo o pessoal do seu laboratório, **Fernanda, Micena, Janete, Tatiana, Germano e Lis**, pela disposição em ajudar e agradável convívio. Em especial a amiga **Daniela**, que me acompanhou nos ensaios, pelas boas conversas, companheira das noites no laboratório, pelo carinho e pela nossa próspera amizade.

Ao **Prof. Wanderley Antônio Calório**, pela amizade e por ter “dado o empurrão” inicial, o que foi fundamental para que eu ingressasse na vida científica. Muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha**, pela oportunidade de iniciar minha carreira científica em seu laboratório, pelos ensinamentos ainda tão presentes e pelo incentivo.

Aos queridos **amigos do Laboratório de Inflamação e Dor** (FMUSP – Ribeirão Preto)... não vou me arriscar a listar um a um, mas agradeço a todos pela amizade ainda tão presente, por todo respeito, carinho, atenção, pelos trabalhos em colaboração e mútuo companheirismo.

A **FAPESP** pelo indispensável auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado. **Muito obrigada de coração!**

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1 Doença de Chagas..... | 2 |
| 1.2 Citocinas Inflamatórias na Infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> | 10 |
| 1.3 Quimiocinas e seus Receptores na Infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> | 16 |
| 1.4 Papel dos Mediadores inflamatórios sobre os Cardiomiócitos – hipertrofia | 25 |
| 1.5 Cardiomiopatias de etiologia não inflamatória..... | 28 |
| 2. Objetivos..... | 33 |
| 2.1 Justificativa e Objetivo Geral | 34 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 35 |
| 3. Métodos..... | 37 |
| 3.1 Estratégia e Desenho Experimental | 38 |
| 3.2 Amostras de miocárdio humano..... | 39 |
| 3.3 Obtenção de cDNA | 42 |
| 3.3.1 Extração de RNA | 42 |
| 3.3.2 Quantificação de RNA e tratamento com DNase..... | 43 |
| 3.3.3 Transcrição reversa | 45 |
| 3.4 Expressão Gênica - PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) ... | 46 |
| 3.4.1 Sequências de Primers..... | 46 |
| 3.4.2 Desenho e padronização dos primers | 47 |
| 3.4.3 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)..... | 49 |
| 3.4.4 Concentração de uso dos primers | 50 |
| 3.4.5 Especificidade e adequação dos primers | 51 |
| 3.4.6 Cálculo da Eficiência | 51 |
| 3.5 Imunofluorescência com Microscopia Confocal | 55 |
| 3.5.1 Preparação do material e obtenção dos cortes | 55 |
| 3.5.2 Coloração Histológica | 55 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.5.3 | Reações de Imunofluorescência..... | 56 |
| 3.5.4 | Microscopia Confocal..... | 59 |
| 3.5.5 | Análise das Imagens | 62 |
| 3.6 | Análise Estatística | 62 |
| 4. | Resultados | 64 |
| 4.1 | Expressão Gênica das citocinas pró-inflamatórias <i>IL-1β</i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-12</i> , <i>IL-18</i> e <i>IL-23</i> , das citocinas antiinflamatórias <i>IL-4</i> e <i>IL-13</i> , da citocina regulatória <i>TGF-β</i> , da Quimiocina <i>CXCL8/IL-8</i> e do fator de transcrição <i>Foxp3</i> no tecido cardíaco de pacientes com CCC e de pacientes com CNI | 65 |
| 4.2 | Expressão Gênica de quimiocinas e seus receptores associados com a migração diferencial de linfócitos Th1 e Th2 no tecido cardíaco de pacientes com CCC e pacientes com CNI..... | 70 |
| 4.3 | Expressão Gênica de <i>CCL19/ELC</i> e <i>CCL21/SLC</i> , ligantes do receptor <i>CCR7</i> no tecido cardíaco de pacientes com CCC e no tecido cardíaco de pacientes com CNI..... | 79 |
| 4.4 | Expressão dos Genes que codificam os Peptídeos Natriuréticos: fator natriurético atrial (ANF) e peptídeo natriurético cerebral (BNP) no tecido cardíaco de pacientes com CCC e de pacientes com CNI | 83 |
| 4.5 | Correlações entre a expressão de genes que codificam proteínas associadas ao perfil Th1 e Th2 no tecido cardíaco de pacientes com CCC | 86 |
| 4.6 | Avaliação da variação de expressão gênica individual em amostras de miocárdio de diversos locais..... | 91 |
| 4.7 | Análise Histopatológica do Tecido Cardíaco de Pacientes com CCC e de Pacientes com CNI..... | 93 |
| 4.8 | Análise da presença de células CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CCR5 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CCR4 ⁺ , CCL5/RANTES ⁺ e CXCL9/Mig ⁺ no tecido cardíaco de pacientes com CCC e no tecido cardíaco de pacientes com CNI com Imunofluorescência por Microscopia Confocal | 96 |
| 5. | Discussão | 115 |
| 6. | Conclusões | 141 |
| 7. | Anexos | 144 |
| 8. | Referências..... | 206 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ANF: *Atrial natriuretic factor* (fator natriurético atrial)

ANOVA: Análise de variância

APC: *Antigen-presenting cells* (Células apresentadoras de antígeno)

BNP: *Brain natriuretic peptide* (peptídeo natriurético cerebral)

BSA: Soro albumina bovina

Ca²⁺: Cálcio

CCC: Cardiomiopatia Chagásica Crônica

CD: *Cluster of differentiation* (designação de grupos)

CDI: Cardiomiopatia dilatada idiopática

C.Isq.: Cardiomiopatia Isquêmica

CNI: Cardiomiopatias de etiologia não inflamatória

Ct: *cycle threshold*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DP: Desvio padrão

DTH: Hipersensibilidade do tipo tardia

ECG: Eletrocardiograma

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

ELR: Glutamato-leucina-arginina

et al. : e outros

FE: Fração de ejeção

FITC: *Fluorescein IsoThioCyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)

GAPDH: D-gliceraldeído 3-fostato desidrogenase

GM-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócito e monócito

GRO: Gene relacionado a oncogene

h: horas

H&E: hematoxilina e eosina

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HLA: Antígeno leucocitário humano

ICAM-1: Molécula de adesão intracelular 1

IFN- γ : Interferon- γ

IL: Interleucina

iNOS: síntase do óxido nítrico indutível

kg: kilograma (s)

L: litro (s)

LPS: Lipopolissacarídeo

L-selectina: Selectina leucocitária

MCP: Proteína quimiotática para monócitos

MIP: Proteína inflamatória de macrófagos

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

mg: miligrama (s)

mL: mililitro (s)

N: grupo controle ou doadores saudáveis

ND: não determinada

ng: nanograma

nM: nanomolar

NO: Óxido nítrico

PBS: Tampão salina fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PE: *PhycoErythrin* (ficoeritrina)

PECAM: Molécula de adesão celular endotelial e plaquetária

PHA: fito-hemaglutinina

PMNs: Polimorfonucleares

P-selectina: Selectina plaquetária

pg: picograma (s)

QR: quantificação relativa

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RANTES: Citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células

T normais

RNA: Ácido ribonucleico

Tcm: células T de memória central

Tem: células T de memória efetora

Th: Linfócito T helper

TGF- β : Fator de crescimento e transformação beta

TNF- α : Fator alpha de necrose tumoral

TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral

VCAM-1: Molécula de adesão vascular 1

VE: ventrículo esquerdo

μ L: microlitro

μ g: micrograma

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo de vida do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> | 4 |
| Figura 2. Expressão dos receptores de quimiocinas nos diferentes tipos celulares e seus ligantes. | 18 |
| Figura 3. Avaliação da integridade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose. | 44 |
| Figura 4. Cálculo da eficiência para o gene endógeno GAPDH. | 54 |
| Figura 5. Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CCR5 ⁺ ou CXCR3 ⁺ em tecido linfóide. | 60 |
| Figura 6. Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CCL5/RANTES ⁺ , CCR4 ⁺ e CXCL9/Mig ⁺ em tecido linfóide. | 61 |
| Figura 7. Expressão relativa de <i>IL-18</i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-12p35</i> , <i>CXCL8/IL-8</i> , <i>IL-13</i> e <i>TGF-β</i> em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e pacientes com CNI. | 67 |
| Figura 8. Comparação da expressão relativa dos <i>mediadores IL-18</i> , <i>IL-13</i> e <i>TGF-β</i> em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. Valores de ΔC_t de <i>Foxp3</i> | 68 |
| Figura 9. Expressão relativa do receptor <i>CCR5</i> e seus ligantes <i>CCL3/MIP-1α</i> , <i>CCL4/MIP-1β</i> e <i>CCL5/RANTES</i> em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e pacientes com CNI. | 72 |
| Figura 10. Expressão relativa do receptor <i>CXCR3</i> e seus ligantes <i>CXCL9/Mig</i> e <i>CXCL10/IP-10</i> em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e pacientes com CNI. | 74 |
| Figura 11. Correlação entre os níveis de expressão gênica de receptores e ligantes associados ao perfil Th1 em amostras de pacientes CCC. | 76 |
| Figura 12. Expressão relativa dos receptores <i>CCR4</i> e <i>CCR8</i> e do ligante <i>CCL17/TARC</i> . Valores de ΔC_t de <i>CCL22/MDC</i> | 77 |

| | |
|--|-----|
| Figura 13. Expressão relativa de <i>CCL19/ELC</i> e <i>CCL21/SLC</i> . Valores de ΔCt de <i>CCR7</i> | 81 |
| Figura 14. Expressão relativa de <i>ANF</i> e <i>BNP</i> em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e pacientes com CNI. Correlação positiva entre os níveis de expressão gênica de <i>ANF</i> e <i>BNP</i> em amostras de pacientes CCC. | 84 |
| Figura 15. Correlação entre os níveis de expressão gênica em amostras de pacientes..... | 90 |
| Figura 16. Análise histopatológica do tecido cardíaco de CCC, CNI e doadores saudáveis e correlações positivas entre a presença de miocardite e a expressão de genes associados ao processo inflamatório em amostras de miocárdio de pacientes com CCC..... | 95 |
| Figura 17. Identificação de células $CD3^+$ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. | 100 |
| Figura 18. Identificação de células $CD4^+$ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. | 102 |
| Figura 19. Identificação de células $CD8^+$ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis..... | 104 |
| Figura 20. Identificação de células $CCR5^+$ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. | 106 |
| Figura 21. Identificação de células $CXCR3^+$ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. | 108 |
| Figura 22. Identificação de células $CCL5/RANTES^+$ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. | 110 |
| Figura 23. Identificação de células $CXCL9/Mig^+$ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. | 112 |

Figura 24. Identificação de células CCR4⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. 114

Figura 25. Processo inflamatório no tecido cardíaco de pacientes com CCC. 139

Figura 26. Processos envolvidos na migração células e manutenção do processo inflamatório no tecido cardíaco de pacientes com CCC, que ocorrem na ausência de regulação e os mediadores expressos in situ poderiam estar envolvidos no desenvolvimento de fibrose e hipertrofia..... 140

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Descrição dos pacientes com CCC, CNI e doadores saudáveis (N), dos quais foram obtidas as amostras de miocárdio..... | 41 |
| Tabela 2. Descrição e identificação dos genes estudados, seqüência dos primers utilizados e características do produto de amplificação..... | 48 |
| Tabela 3. Especificações dos anticorpos utilizados no ensaio de imunofluorescência com microscopia confocal. | 57 |
| Tabela 4. Valores individuais de QR para os genes de <i>IL-1β</i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-12p35</i> , <i>IL-12p40</i> , <i>IL-18</i> , <i>IL-23</i> , <i>CXCL8/IL-8</i> , <i>IL-4</i> , <i>IL-13</i> , <i>TGF-β</i> e <i>Foxp3</i> ... | 69 |
| Tabela 5. Valores individuais de QR para os genes de <i>CCR5</i> , <i>CCL3/MIP-1α</i> , <i>CCL4/MIP-1β</i> e <i>CCL5/RANTES</i> | 73 |
| Tabela 6. Valores de QR individuais para os genes de <i>CXCR3</i> , <i>CXCL9/Mig</i> e <i>CXCL10/IP-10</i> | 75 |
| Tabela 7. Valores de QR individuais para os genes de <i>CCR4</i> , <i>CCL17/TARC</i> , <i>CCL22/MDC</i> , <i>CCR8</i> e <i>CCL1/I-309</i> | 78 |
| Tabela 8. Valores individuais de QR para os genes <i>CCL19/ELC</i> e <i>CCL21/SLC</i> , ligantes do receptor <i>CCR7</i> | 82 |
| Tabela 9. Valores individuais de QR para os genes de <i>ANF</i> e <i>BNP</i> . .. | 85 |
| Tabela 10. Valores individuais de QR de citocinas, quimiocinas, receptores e peptídeos natriuréticos em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. | 88 |
| Tabela 11. Valores individuais de QR de citocinas, quimiocinas, receptores e peptídeos natriuréticos em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. | 89 |
| Tabela 12. Valores de expressão gênica de diferentes fragmentos de três amostras de pacientes com CCC. | 92 |
| Tabela 13. Correlação entre a expressão gênica de diferentes fragmentos de três amostras de pacientes com CCC. | 92 |
| Tabela 14. Análise histopatológica de amostras de miocárdio de pacientes com CCC, pacientes com CNI e amostras de doadores saudáveis (N). | 94 |

RESUMO

Nogueira LG. *Expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas no tecido cardíaco de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 230p

A Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) é uma cardiomiopatia de natureza inflamatória, que ocorre em cerca de 30% dos indivíduos infectados pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* 5-30 anos após infecção. Na doença de Chagas crônica e na CCC, há importante produção de citocinas pró-inflamatórias do padrão Th1 e quimiocinas, mesmo na ausência de disfunção ventricular. Foi demonstrado que células mononucleares que infiltram o tecido cardíaco de pacientes CCC produzem algumas dessas citocinas inflamatórias. Entretanto, os fatores que determinam a composição do infiltrado inflamatório e contribuem para a migração e acúmulo das células inflamatórias dentro do tecido cardíaco na CCC são ainda desconhecidos. Sabendo-se que a CCC apresenta pior prognóstico que as cardiomiopatias dilatadas de natureza não inflamatória, é possível hipotetizar que diversos mediadores inflamatórios produzidos localmente estejam envolvidos no pior prognóstico. Dentro deste contexto, nosso objetivo no presente trabalho foi avaliar a expressão gênica de citocinas do padrão pró-inflamatório/Th1, quimiocinas envolvidas na migração de células T de memória e seus receptores e quimiocinas envolvidas na migração diferencial de linfócitos Th1/Th2 e seus receptores em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e outras cardiomiopatias. Para isso, utilizamos a técnica de qRT-PCR e imunofluorescência com microscopia confocal para esses mediadores/receptores em amostras de miocárdio (ventrículo esquerdo) de pacientes CCC, portadores de cardiomiopatia não inflamatória (CNI) e doadores saudáveis, obtidos durante o procedimento de transplante. Observamos a expressão gênica aumentada da citocina pró-inflamatória *IL-18*, das quimiocinas *CCL3/MIP-1 α* , *CCL4/MIP-1 β* , *CCL5/RANTES*, *CXCL9/Mig*, *CXCL10/IP-10*, *CCL17/TARC* e *CCL19/ELC* e dos receptores *CXCR3*, *CCR5* e *CCR4* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparadas com amostras de miocárdio de pacientes com CNI ou tecido cardíaco controle. Entretanto, observamos a expressão diminuída ou ausente de genes como *TGF- β* , *Foxp3*, *IL-4* e *IL-13*, sugerindo a ausência de células T regulatórias ou células Th2 funcionais. Adicionalmente, a presença de células mononucleares *CXCR3*⁺, *CCR5*⁺ e *CCR4*⁺ foi observada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC utilizando imunofluorescência confocal. As quimiocinas *CCL5/RANTES* e *CXCL9/Mig* foram detectadas em células mononucleares do infiltrado inflamatório de tecido cardíaco de pacientes com CCC. A expressão diferencial dos genes aqui estudados permitiu obter um quadro panorâmico dos mediadores inflamatórios produzidos no miocárdio de pacientes com CCC. A expressão gênica aumentada de *IL-18* e de quimiocinas e seus receptores no miocárdio de pacientes com CCC contribuem para a migração e acúmulo de células de

CCR5+, CXCR3+ de perfil Th1 e as correlações observadas entre esses mediadores e receptores sugerem um *feedback* positivo atuando na manutenção e amplificação do processo inflamatório, possivelmente em associação com outros mediadores expressos no miocárdio. A resposta inflamatória intensa e predominantemente Th1 com a expressão aumentada de diversos mediadores inflamatórios no miocárdio de pacientes com CCC pode ocorrer pela ausência de células T regulatórias Foxp3⁺ ou TGF-β⁺, e a expressão de alguns mediadores como IL-18 e CCL21/SLC pode estar associada ao desenvolvimento de hipertrofia e fibrose, sugerindo um papel fisiopatológico adicional para a expressão desses mediadores no grupo de pacientes com CCC.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.Cardiomiopatia 3.Quimiocinas
4.Citocinas 5.Miocárdio 6.Expressão gênica 7.Inflamação

SUMMARY

Nogueira LG. *Expression of inflammatory cytokines and chemokines in the heart tissue of Chronic Chagas' disease Cardiomyopathy patients* [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 230p

Chronic Chagas' disease Cardiomyopathy (CCC) is an inflammatory cardiomyopathy that affects around 30% of individuals infected by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and happens 5-30 years after the infection. In Chronic Chagas' disease and CCC, there is a significant production of pro-inflammatory Th1 cytokines and chemokines even in the absence of ventricular dysfunction. Mononuclear cells infiltrating the heart tissue of CCC patients produce some of these inflammatory cytokines. However, the factors that determine the composition of the inflammatory infiltrate and contribute to the migration, accumulation and distribution of inflammatory cells inside heart tissue in the CCC are still unknown. Considering that CCC has worse prognosis than dilated cardiomyopathy of non-inflammatory etiology, we hypothesized that the production of several inflammatory mediators *in situ* could be involved in the worse prognosis of CCC. Taking this into consideration, our aim in the present study was to analyze the gene expression of pro-inflammatory/Th1 cytokines, chemokines involved in cell T memory migration and its receptors and chemokines involved in Th1/Th2 lymphocyte migration and its receptors. qRT-PCR and immunofluorescence with confocal microscopy were employed to detect the expression these mediators/receptors in left ventricular free wall samples from end-stage CCC patients, patients with non-inflammatory cardiomyopathy (NIC) and healthy donors, obtained upon transplantation. We observed a significant increase in the expression of pro-inflammatory cytokine *IL-18*, chemokines *CCL3/MIP-1 α* , *CCL4/MIP-1 β* , *CCL5/RANTES*, *CXCL9/Mig*, *CXCL10/IP-10*, *CCL17/TARC* and *CCL19/ELC* and its receptors *CXCR3*, *CCR5* and *CCR4* in the samples of CCC patients compared to NIC patients and control heart samples. On the other hand, we observed absence of expression or down-regulation of *TGF- β* , *Foxp3*, *IL-4* and *IL-13*, suggesting the absence of regulatory T cells and functional Th2 cells. In addition, the presence of mononuclear *CXCR3*⁺, *CCR5*⁺ and *CCR4*⁺ cells was observed in myocardium of CCC patients using immunofluorescence with confocal microscopy. The chemokines *CCL5/RANTES* and *CXCL9/Mig* were detected in mononuclear cells of inflammatory infiltrates of heart tissue CCC patients. The differential gene expression observed in this study allowed us to elaborate a global profile of inflammatory mediator production in the myocardium CCC patients. The up-regulated gene expression of *IL-18* and chemokines and its receptors in the myocardium CCC patients contribute to the migration and accumulation of *CCR5*⁺, *CXCR3*⁺ Th1 cells and the correlation observed between these mediators and their receptors suggest a positive feedback contributing to the maintenance and amplification of inflammatory process, possibly in association with another mediators

expressed in the myocardium. The intense Th1 inflammatory response with the up-regulated expression of various inflammatory mediators in the myocardium of CCC patients could be enhanced by the absence of Foxp3⁺ or TGF-β⁺, regulatory T cells and the expression of mediators as IL-18 and CCL21/SLC could play a role in the development of hypertrophy and fibrosis suggesting an additional pathophysiologic role of expression of these mediators in CCC patients.

Descriptors: 1.Chagas' disease 2.Cardiomyopathies 3.Chemokines
4.Cytokines 5.Myocardium 6.Gene expression 7.Inflammation

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (Tripanosomíase Americana) é causa significativa de morbidade e mortalidade em muitos países da América do Sul e Central, onde estima-se que 18 milhões de pessoas estejam infectadas (Disease Watch, 2003). Somente no Brasil, 17.000 mortes foram atribuídas à doença de Chagas em 1995 (Akhavan, 1997), e dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002) mostraram a incidência de aproximadamente 300.000 novos casos por ano. Apesar da implantação de programas de controle da transmissão vetorial e em bancos de sangue (Moncayo, 2003), responsável pela redução da morbidade e mortalidade decorrente da forma crônica, ainda existem milhões de pacientes portadores da doença de Chagas que continuam sob o risco de vida na América Latina e no Brasil, necessitando de tratamento adequado. Além disso, mesmo que se bloqueie completamente a transmissão vetorial, indivíduos já infectados continuarão sob potencial risco de desenvolver a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), a principal causa de morbidade e mortalidade.

A doença de Chagas, descrita por Carlos Chagas (1909), é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida ao homem pelo inseto triatomíneo (*Triatoma infestans*).

O agente etiológico da doença de Chagas, o protozoário *Trypanosoma cruzi* (ordem *Kinetoplastidea*), pertence à família *Trypanosomatidae*, cuja principal característica é a presença de flagelo e de uma mitocôndria modificada denominada cinetoplasto. O ciclo de vida deste parasita é caracterizado pela presença de diferentes formas encontradas em dois hospedeiros, um invertebrado (insetos triatomíneos) e outro vertebrado (mamíferos). A forma epimastigota é encontrada no tubo digestivo do vetor triatomíneo, também conhecido por barbeiro (insetos da família *Reduviidae*, das espécies *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*; WHO, 2002). Ela multiplica-se por divisão binária e diferencia-se na forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectante do hospedeiro vertebrado. Esta é eliminada junto com as fezes e urina sobre a pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, podendo penetrar através do local da picada ou mucosas e invadir células nucleadas. No interior das células, os parasitas da forma tripomastigota metacíclica diferenciam-se na forma amastigota, a qual se replica por fissão binária. Após alguns ciclos de multiplicação, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneas, as células são rompidas e os parasitas são liberados para o meio extracelular ou na corrente sanguínea, podendo assim migrar e invadir novas células do hospedeiro ou serem sugados pelo inseto vetor, reiniciando o ciclo do parasita (Figura 1) (Brener, 1973).

Além do vetor, a transfusão de sangue e a transmissão congênita são outras formas de transmissão da doença (Wendel, 1998).

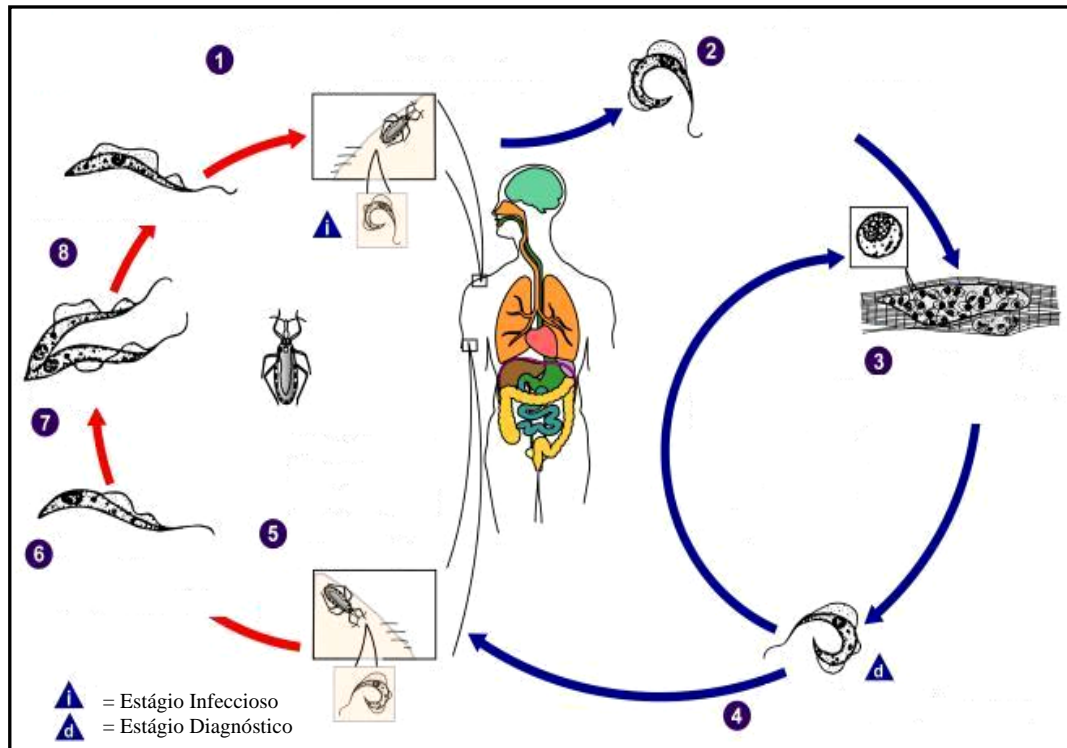


Figura 1: Ciclo de vida do protozoário *Trypanosoma cruzi*. (1) O inseto pica e defeca ao mesmo tempo. O tripomastigota metacíclico passa à ferida nas fezes. (2) Os tripomastigotas invadem células onde se transformam em amastigotas. (3) Os amastigotas multiplicam-se dentro das células. (4) Os amastigotas transformam-se em tripomastigotas sanguíneos, as células são rompidas e os parasitas são liberados na corrente sanguínea podendo invadir novas células onde se multiplicam em amastigotas. (5) Os tripomastigotas sanguíneos podem ser sugados por um novo inseto, reiniciando o ciclo do parasita. (6) No tubo digestivo do inseto os tripomastigotas sanguíneos transformam-se em epimastigotas, que se multiplicam (7) e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (8). Figura retirada do site [http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma cruzi](http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_cruzi)

A história natural da doença é constituída por uma fase aguda e uma fase crônica. Na fase aguda, que muitas vezes é subclínica, os parasitas presentes na corrente sanguínea se espalham amplamente pelo organismo do hospedeiro através da replicação dentro de uma variedade de células nucleadas. O parasitismo intenso, característico da fase aguda, é controlado pela resposta imune contra o *T. cruzi* estabelecendo uma infecção crônica com baixa parasitemia. Essa resposta não atinge, porém, eliminação definitiva do parasita, o que é conhecido como “imunidade não estéril” (Martin *et al.*, 1987). Dos indivíduos infectados cronicamente pelo *T. cruzi*, 70% são assintomáticos e não apresentam alteração cardíaca ou digestiva. Estes pacientes apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas significantes. Por estes pacientes não exibirem significativas alterações eletrocardiográficas ou dilatação do coração, esôfago ou cólon observados por exame de raios-X (Primeira Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas, 1985), em geral, são diagnosticados em banco de sangue por apresentarem testes sorológicos positivos para o *T. cruzi*. Estes indivíduos infectados permanecem nessa fase indefinidamente, entretanto, cerca de 30% dos indivíduos restantes apresentam alguma das formas crônicas da doença após o intervalo de 10 a 20 anos (Ribeiro e Rocha, 1998).

Os pacientes chagásicos podem desenvolver a forma cardíaca e/ou digestiva. Cerca de 8-10% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma digestiva da doença de Chagas. A forma digestiva consiste de dilatação do esôfago e cólon e é, supostamente, o resultado da destruição neuronal do

trato gastrointestinal (Koberle *et al.*, 1983) e, na sua forma mais grave, causa desnutrição e constipação intratável (Moncayo, 1999). Os 20-30% restantes evoluem para um acometimento cardíaco de maior ou menor gravidade desenvolvendo, em graus clínicos variados, a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) que é a principal causa de morte em indivíduos chagásicos. Os graus clínicos de CCC variam desde discretas alterações de eletrocardiograma (ECG), mas não de exames mais sensíveis como o ecocardiograma caracterizando a CCC leve. A CCC moderada é caracterizada por significativas alterações de ECG, como distúrbios de condução e arritmia ventricular, e a CCC grave é caracterizada por alterações de ECG, raio-X e/ou de ecocardiograma, com ou sem sinais de dilatação das câmaras cardíacas (WHO, 2002; Rocha *et al.*, 2003).

A cardiomiopatia chagásica crônica é uma cardiomiopatia de natureza inflamatória caracterizada por anormalidades da condução cardíaca, arritmias e insuficiência cardíaca congestiva, que freqüentemente tem curso fatal (Macedo *et al.*, 1982; Prata, 2001), ocorrendo décadas após a infecção inicial. Um terço dos pacientes com CCC (equivalente a 1 milhão dos pacientes) freqüentemente desenvolve disfunção significativa do ventrículo esquerdo (VE), que pode ser global ou difusa, e/ou dilatação das câmaras cardíacas e insuficiência cardíaca congestiva refratária cuja a única alternativa terapêutica é o transplante cardíaco (Dias *et al.*, 1956; Macedo *et al.*, 1982; Rossi, 1991; Cunha-Neto *et al.*, 1996; Dias *et al.*, 2002).

A principal característica do tecido cardíaco na CCC é a presença de uma miocardite difusa, incluindo a destruição de fibras cardíacas e substituição

por fibrose cicatricial, com danos a cardiomiócitos (Higuchi *et al.*, 1987), associada a um considerável infiltrado inflamatório difuso, em um processo que lembra a reação de hipersensibilidade tardia. O infiltrado inflamatório na CCC é tido como o possível efector dos danos ao tecido, sendo composto por macrófagos (50%), células B (10%), células T (40%) (Milei *et al.*, 1992), com uma predominância de 2:1 de células T CD8⁺ sobre células T CD4⁺ (Higuchi *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1993^a). Histiócitos e células endoteliais do tecido cardíaco de pacientes com CCC apresentam expressão aumentada de moléculas HLA de classe I e de classe II, ICAM-1 e selectina-E, enquanto os cardiomiócitos expressam níveis elevados de moléculas HLA de classe I, provavelmente em resposta à produção local de citocinas inflamatórias (Reis *et al.*, 1993^b). Além disso, é importante ressaltar a aparente ausência de parasitas nas lesões.

A escassez de parasitas nas lesões cardíacas originou a hipótese auto-imune que é postulada na patogênese da CCC como um efeito secundário à infecção pelo parasita. A existência de epítomos antigênicos que são compartilhados entre o *T. cruzi* e células mamíferas foi relatada pela primeira vez em 1970, e os dados demonstravam que a infecção crônica com *T. cruzi* induz perda da tolerância a antígenos próprios ou a formação de anticorpos anti-parasitas com reação cruzada a componentes do hospedeiro, como células endoteliais, endotélio vascular e interstício cardíaco (Cossio *et al.*, 1974; Kierszenbaum, 2003). Dados que apóiam essa hipótese mostraram que em modelos experimentais murinos, células T CD4⁺ de camundongos infectados cronicamente com *T. cruzi* transferem

miocardite a camundongos saudáveis (dos Santos *et al.*, 1992). Além disso, células T CD4⁺ de camundongos infectados reconhecem a miosina cardíaca (Rizzo *et al.*, 1989). Cunha-Neto *et al.* (1995) mostraram que no soro de pacientes com doença de Chagas há auto-anticorpos contra a miosina cardíaca de reação cruzada contra a proteína B13 do *T. cruzi*. Os mesmos autores também demonstraram que clones de linfócitos T CD4⁺ intralesionais de pacientes chagásicos também são capazes de reconhecer cruzadamente a miosina cardíaca e a proteína B13 do *T. cruzi* (Cunha-Neto *et al.*, 1996).

Embora as explicações para as alterações miocárdicas que ocorrem durante a fase crônica da infecção chagásica partam do pressuposto da ausência de parasitas nas lesões, técnicas mais avançadas podem detectar a persistência do *T. cruzi*, o que pode ser um fator importante para o desenvolvimento da CCC. Em humanos, Higuchi *et al.* (1993^b) observaram uma escassez de formas amastigostas do *T. cruzi* em biópsias de coração de pacientes com CCC. Contudo, técnicas de biologia molecular (PCR) são capazes de detectar DNA de *T. cruzi* no coração de pacientes com CCC (Olivares-Villagomez *et al.*, 1998; Machado *et al.*, 2005), e também no coração de portadores da forma indeterminada. Modelos murinos demonstraram que inóculos maiores de *T. cruzi* causam miocardite (Marinho *et al.*, 1999) ou miocardiopatia (Bilate *et al.*, 2003) mais graves com altos índices de mortalidade (Tarleton *et al.*, 1996; Tarleton *et al.*, 2000). Nosso grupo demonstrou a presença de linfócitos T CD8⁺ específicos contra epitopos de cruzipaina de *T. cruzi* em linhagens obtidas de biópsias

endomiocárdicas de pacientes com CCC (Fonseca *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que antígenos do parasita no miocárdio de pacientes chagásicos também são alvos da resposta imune celular, podendo ser co-responsáveis pelo desencadeamento do infiltrado celular no tecido.

Apesar da implantação de programas de controle da transmissão vetorial, persistirá o problema dos 2-3 milhões de pacientes acometidos de CCC em nosso País, além das centenas de milhares de pessoas atualmente na forma indeterminada que podem desenvolver sintomas cardíacos. Aproximadamente 30% dos indivíduos com alterações cardíacas acabam por desenvolver cardiomiopatia dilatada grave (Macedo *et al.*, 1982), podendo manifestar insuficiência cardíaca congestiva, responsável pelo elevado número de internações e alta mortalidade (52 % em cinco anos) (Mady *et al.*, 1994). Alguns trabalhos sugerem que a insuficiência cardíaca de etiologia chagásica possa ter pior prognóstico com sobrevida após o estabelecimento dos sintomas de 2-4 vezes menor do que a de outras etiologias, como a doença isquêmica e a cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) (Mady *et al.*, 1994; Bestetti e Muccillo, 1997; Freitas *et al.*, 2005).

Devido à alta morbimortalidade da CCC, novas terapias se fazem necessárias, uma vez que os agentes quimioterápicos anti-*T. cruzi* disponíveis são pouco eficazes em evitar a progressão das lesões cardíacas em modelos experimentais (Teixeira *et al.*, 1990), e para pacientes com insuficiência cardíaca refratária, o único tratamento disponível é o transplante cardíaco.

O desenvolvimento de novas terapias que inibam o dano cardíaco em pacientes com CCC pode ser favorecido com a identificação de alvos específicos do dano tecidual inflamatório, sem interferir com o controle do parasitismo. Experimentos anteriores de nosso grupo indicaram que o bloqueio isolado de um mediador (TNF- α) na fase crônica de infecção em hamsters provocou aceleração da cardiomiopatia dilatada e óbito em um subgrupo de animais tratados (Bilate *et al.*, 2007). Entretanto, a intensidade da inflamação está correlacionada positivamente com a dilatação ventricular em hamsters cronicamente infectados (Bilate A., Tese de Doutorado 2006). Essas observações apontaram a necessidade de um maior conhecimento dos mediadores inflamatórios produzidos no miocárdio e seus efeitos biológicos.

1.2 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Citocinas e quimiocinas são importantes mediadores envolvidos na manutenção do processo inflamatório, podendo estimular ou inibir a resposta imune (Sher *et al.*, 1992). Além disso, esses mediadores estão envolvidos na indução das respostas Th1 e Th2, que envolve outros fatores como fatores genéticos, sinais co-estimulatórios e a natureza do estímulo antigênico. Entretanto, o fator que mais influencia a resposta inflamatória é o tipo de mediador inflamatório, como citocinas e quimiocinas, presente no micro-

ambiente de células T durante a apresentação do antígeno e início da resposta mediada por células (D'Ambrosio e Sinigaglia, 2000).

As citocinas apresentam um importante papel na polarização da resposta imune e na manutenção e diferenciação de células. Citocinas como IFN- γ , IL-12, IL-18, IL-23, IL-27 e linfotóxina estão envolvidas na polarização de resposta Th1, promovendo a imunidade mediada por células contra patógenos intracelulares. Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 estão envolvidas na polarização de respostas Th2, predominante em reações alérgicas e também em respostas humoral e celular contra helmintos, parasitas e patógenos extracelulares (Abbas *et al.*, 1996). Existem também citocinas que estão envolvidas na regulação da resposta imune, na qual células com perfil regulatório produzem citocinas como IL-10 e TGF- β (Roncarolo *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006) e citocinas como IL-2, IL-7 e IL-15, as quais são importantes no desenvolvimento e manutenção de células T de memória (Schluns e Lefrançois, 2003).

Devido ao papel das citocinas na polarização e manutenção de respostas imunes, elas estão diretamente associadas com as patologias resultantes de infecções. Na doença de Chagas, dados da literatura demonstram que citocinas inflamatórias são essenciais durante a fase aguda da infecção e são produzidas em níveis elevados na doença de Chagas crônica, possivelmente pela exposição crônica ao parasita (Ribeirão *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2003).

A fase aguda da infecção com *T. cruzi* apresenta uma forte atividade pró-inflamatória, com a produção abundante de citocinas pró-inflamatórias

do tipo Th1, as quais apresentam papel na eliminação do parasita e sobrevivência do hospedeiro. A resposta inata, disparada pelo patógeno, envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α) (revisado em Cunha-Neto *et al.*, 2006) e de quimiocinas (CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL2/MCP-1) (revisado em Teixeira *et al.*, 2002), e é essencial para o controle da infecção aguda.

A produção de IFN- γ tem sido associada à resistência do hospedeiro durante a fase aguda da infecção, inibindo a replicação do parasita *in vivo* e *in vitro*, através da indução da síntese de NO em macrófagos (Gazzinelli *et al.*, 1992). O TNF- α age sinergicamente com IFN- γ controlando o crescimento do parasita (Munoz-Fernandez *et al.*, 1992). Entretanto, citocinas supressoras, incluindo IL-10 e TGF- β , são associadas à suscetibilidade a infecção pelo *T. cruzi* (Silva *et al.*, 1991; dos Santos *et al.*, 1992; Holscher *et al.*, 2000) pela inibição da ativação de macrófagos mediada por IFN- γ (Tsunawaki *et al.*, 1998).

Durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, a produção de IFN- γ e TNF- α é induzida por IL-12, levando a uma resposta imune protetora mediada por células (Hunter *et al.*, 1996). Dados demonstraram a importância da IL-12 durante a infecção aguda experimental com *T. cruzi* (14 dias de infecção) relatando que a IL-12 é necessária na resposta imune efetiva através da produção de IFN- γ (Graefe *et al.*, 2003). Por outro lado, linfócitos T CD4⁺ específicos de animais infectados são capazes de produzir IFN- γ independentemente de IL-12 endógena, podendo ser essa produção mediada por IL-18 (Muller *et al.*, 2001). Há trabalhos relatando o sinergismo

entre IL-18 e IL-12 na produção de IFN- γ por linfócitos T (Chang *et al.*, 2000), bem como a indução da produção de IFN- γ por IL-18 independente de IL-12 (Okamura *et al.*, 1998).

O aumento da produção de TGF- β foi observado durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi* (Silva *et al.*, 1991). O *T. cruzi* usa os receptores I e II do TGF- β para entrar nas células, sendo que células que não possuem esses receptores são resistentes a infecção pelo *T. cruzi* (Ming *et al.*, 1995). Além disso, a infecção pelo *T. cruzi* induz a expressão do gene repórter responsivo a TGF- β , sugerindo que o parasita pode diretamente ativar a via de sinalização de TGF- β facilitando sua entrada nas células (Ming *et al.*, 1995). Dados da literatura demonstram que pacientes com CCC apresentam altos níveis circulantes de TGF- β . Análises de imunohistoquímica em biópsias cardíacas desses pacientes mostraram marcação para Smad2 fosforilada, um marcador de ativação da via de sinalização de TGF- β , bem como para fibronectina, um marcador de fibrose (Araújo-Jorge *et al.*, 2002), sugerindo que TGF- β poderia ter um papel na indução de fibrose no tecido cardíaco de pacientes com CCC.

Especificamente na CCC foi observado que as células mononucleares do infiltrado inflamatório cardíaco produzem IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-15; no entanto, há pouca ou nenhuma produção de IL-4 e IL-10 (Reis *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1997; Abel *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2007).

Resultados anteriores de nosso grupo demonstraram que a produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico, após estímulo com fito-hemaglutinina, foi significativamente maior em

pacientes com CCC que entre pacientes com a forma indeterminada (Abel *et al.*, 2001). Também foi observada uma maior frequência de células T CD4⁺ *T. cruzi* específicas produtoras de IFN- γ em pacientes com CCC e os autores sugeriram que tais pacientes teriam uma deficiência na regulação da produção de IFN- γ por IL-10 (Gomes *et al.*, 2003). Os autores sugeriram que IL-10 apresenta um importante papel na infecção e no controle da replicação do parasita no tecido cardíaco e em outros tecidos durante a fase crônica da doença regulando a resposta inflamatória tipo Th1 (Gomes *et al.*, 2003).

A IL-10 é uma importante citocina envolvida na função supressora de células T regulatórias (Treg) (Hara *et al.*, 2001). A população de células Treg foi avaliada em pacientes com a forma cardíaca e indeterminada da doença de Chagas. Os autores observaram que pacientes com a forma indeterminada da doença apresentam frequência aumentada de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺ e pacientes com a forma cardíaca apresentam aumento da porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ que expressam CTLA-4. Esses dados sugerem que células Treg apresentam um importante papel na resposta imune contra a infecção com *T. cruzi*, e que a produção de IL-10 é importante no controle do desenvolvimento da doença em pacientes com a forma indeterminada (Araújo *et al.*, 2007). Na infecção experimental pelo *T. cruzi*, dados sugerem que células Treg não regulam a resposta efetora de células T CD8⁺ durante a fase aguda ou crônica da infecção (Kotner e Tarleton, 2007).

Dados da literatura demonstram que pacientes com CCC apresentam quantidades aumentadas no sangue periférico de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ co-expressando CCR5 e IFN- γ , CXCR3 e IFN- γ e CXCR3 e TNF- α em comparação com pacientes com a forma indeterminada (Gomes *et al.*, 2005). Resultados recentes de nosso grupo, utilizando *microarrays* de cDNA, indicaram que diversos genes induzíveis por IFN- γ encontravam-se com expressão aumentada no miocárdio de pacientes com CCC, mas não em pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI), ambos em estágio terminal, em comparação a miocárdio normal (Cunha-Neto *et al.*, 2005). No mesmo trabalho, análises utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) mostraram que quimiocinas induzidas por IFN- γ , como CCL2/MCP-1, CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10, estão seletivamente expressas em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, bem como o receptor CXCR3.

Ainda há divergências quanto aos mecanismos pelos quais as citocinas controlam a replicação do parasita e o desenvolvimento da miocardite em camundongos infectados por *T. cruzi*. Sabe-se que algumas citocinas modulam a expressão de quimiocinas que, por sua vez, direcionam o infiltrado inflamatório observado durante a fase aguda e crônica da infecção (Aliberti *et al.*, 2001).

1.3 QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES NA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*

As quimiocinas ou citocinas quimiotáticas podem ser consideradas os principais fatores envolvidos na migração de leucócitos. As quimiocinas fazem parte de uma superfamília de pequenas moléculas de peso molecular de 8-12 kDa, com similaridades estruturais. A ação das quimiocinas sobre os mais diferentes tipos celulares se dá através dos receptores de quimiocinas, que pertencem à família de receptores com sete domínios transmembrana acoplados a proteína G, e são ligados a proteína na sua porção carboxi-terminal (Rollings, 1997).

No início, as quimiocinas foram descobertas por causa de sua associação com respostas inflamatórias, entretanto, o sequenciamento genômico tem adicionado vários novos membros com funções adicionais. Existem mais de 40 quimiocinas e aproximadamente 20 receptores de quimiocinas descritos em humanos (Mackay, 2001).

A maioria das quimiocinas tem quatro cisteínas características em posições altamente conservadas e, dependendo da posição das duas primeiras cisteínas próximas ao domínio amino-terminal, elas são classificadas nas subfamílias CXC, CC, C e CX₃C quimiocina (Rossi e Zlotnik, 2000). Na Figura 2, mostramos algumas quimiocinas, seus receptores, e os tipos celulares que expressam esses receptores.

Como muitas quimiocinas se ligam a mais de um receptor e muitos receptores se ligam a mais de uma quimiocina, é difícil saber o papel

individual de cada quimiocina. Entretanto, análises mais profundas das interações das quimiocinas e seus receptores mostraram que as quimiocinas podem ser classificadas em duas classes dependendo de como elas são produzidas, constitutivamente ou induzidas.

As quimiocinas constitutivas ou “homeostáticas” estão envolvidas primariamente na organização do tecido linfóide e no tráfego basal de leucócitos. Exemplos desse grupo incluem CXCL13/BCA-1, CCL21/SLC e CCL19/ELC (Sallusto *et al.*, 2000). Em contrapartida, as quimiocinas induzidas ou “inflamatórias” são tipicamente induzidas *de novo* em resposta à infecção e recrutam células efectoras, incluindo monócitos, granulócitos e células T efectoras para o local da entrada do patógeno (Moser e Loetscher, 2001). Exemplos clássicos incluem CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CCL11/eotaxina, CCL4/MIP-1 β , CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10.

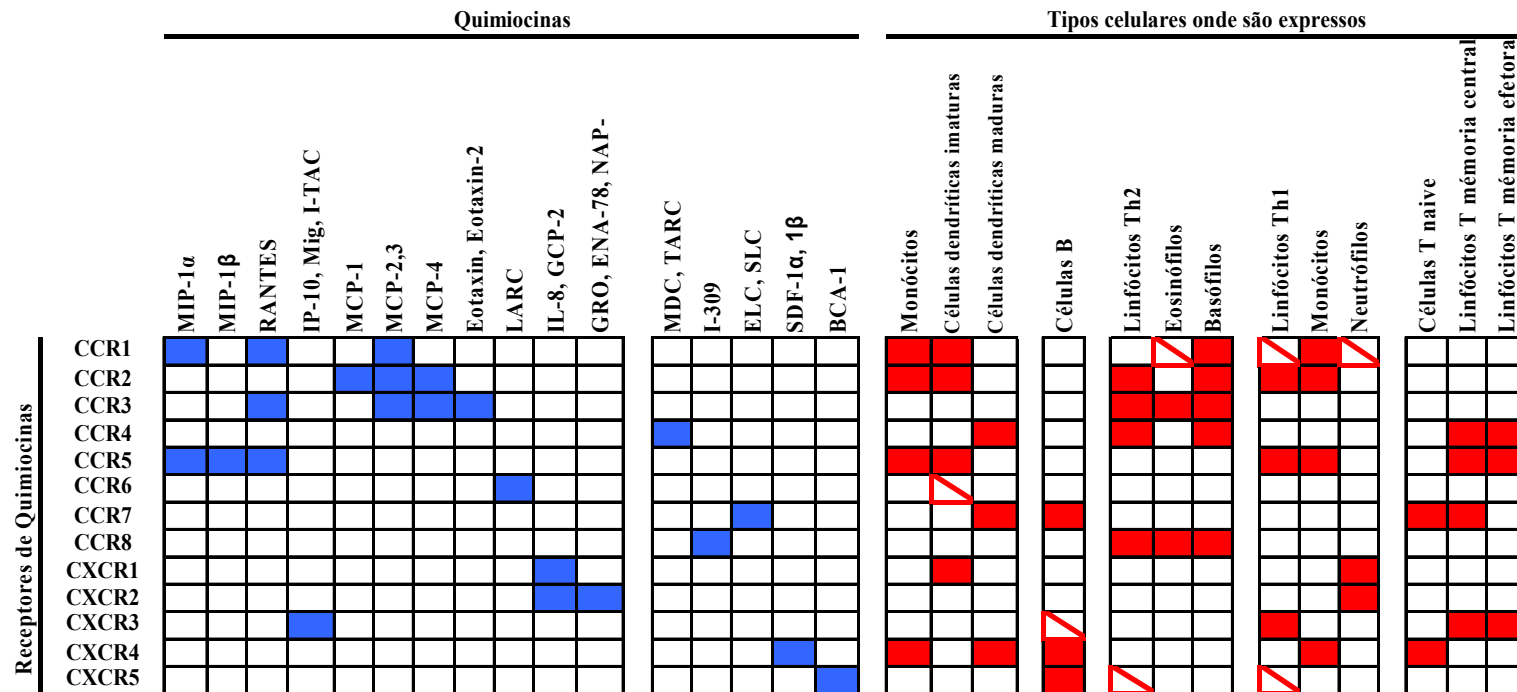


Figura 2: Expressão dos receptores de quimiocinas nos diferentes tipos celulares e seus ligantes. A figura foi modificada de Sallusto *et al.* (1998) e representa algumas quimiocinas e receptores descritos em humanos. Os quadrados em azul representam a associação entre a quimiocina e seu respectivo receptor; os quadrados em vermelho representam a expressão do receptor em determinados tipos celulares; os quadrados vermelhos parcialmente preenchidos indicam a expressão do receptor em um determinado subtipo celular. Os nomes das quimiocinas são muitas vezes baseados no modo pelo qual elas foram descobertas; MIP, proteína inflamatória de macrófagos; RANTES, regulada pela ativação de célula T normal expressa e secretada; IP-10, proteína 10 indutível pelo IFN- γ ; Mig, monocina indutível por IFN- γ ; I-TAC, quimioatraente de célula T α indutível por IFN; MCP, proteína quimioatraente de monócitos; LARC, quimiocina do fígado e regulada; GCP-2, proteína quimiotática de granulócitos; GRO, oncogene relacionado ao crescimento; ENA-78, atraente 78 de neutrófilo derivado de célula epitelial; NAP-2, peptídeo 2 que ativa neutrófilo; MDC, quimiocina derivada de macrófago; TARC, quimiocina regulada pelo timo e ativação; ELC, quimiocina ligadora do vírus Epstein-Barr; SLC, quimiocina linfóide secundária; SDF, fator derivado de células estromais; BCA, quimiocina atraente de célula B.

As quimiocinas têm papéis bem definidos em direcionar movimentos celulares necessários para o início das respostas imunes pelas células T. Elas são necessárias para atrair leucócitos para o local da inflamação, direcionar células apresentadoras de antígenos (APCs) maduras para vasos linfáticos, e aproximar células T e APCs dentro do órgão linfóide drenante (Cyster, 1999; Sallusto *et al.*, 2000). Além dos efeitos na locomoção dos leucócitos, as quimiocinas têm papéis na ativação de células NK, na proliferação de linfócitos T e na diferenciação dos padrões Th1 e Th2. Por exemplo, a quimiocina CCL3/MIP-1 α atua na diferenciação do padrão Th1, observação sugerida por um estudo que mostrou que a adição dessa quimiocina em células ativadas por TCR promoveu o desenvolvimento de células T produtoras de IFN- γ (Karpus *et al.*, 1997).

Durante a ativação de células T *naive*, diferenciação de células T efectoras e desenvolvimento de células T de memória ocorre a regulação da expressão de receptores de quimiocinas (Sallusto *et al.*, 2000). As células T *naive* expressam receptores como CXCR4 e CCR7, enquanto que subtipos de células T efectoras e células T memória expressam receptores que podem estar associados na diferenciação dos padrões Th1 e Th2 (Bleul *et al.*, 1997; Sallusto *et al.*, 1997; Bonecchi *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998; Siveke e Hamann, 1998; Campbell *et al.*, 1999; Zabel *et al.*, 1999; Iellem *et al.*, 2000).

A resposta de células Th2 envolve diferentes subtipos de células efectoras que produzem citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, os quais estão envolvidos com sua diferenciação (Coffman e von der Weid, 1997). As células Th2 expressam seletivamente os receptores CCR3 (Sallusto *et al.*, 1997),

CCR4 (Bonecchi *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998) e CCR8 (Zingoni *et al.*, 1998), e esses receptores e seus ligantes estão envolvidos em resposta alérgicas e contra parasitas extracelulares (Panina-Bordignon *et al.*, 2001).

O receptor CCR3 possui como ligantes as quimiocinas CCL11/eotaxina, eotaxina-2, MCP-2, MCP-3, MCP-4 e CCL5/RANTES (Heath *et al.*, 1997; Uguccioni *et al.*, 1997; Sallusto *et al.*, 1997) sendo expresso em basófilos, eosinófilos e linfócitos Th2 (Ponath *et al.*, 1996; Uguccioni *et al.*, 1997; Sallusto *et al.*, 1997) e sua expressão identifica linfócitos T que produzem IL-4 – uma característica de células de perfil Th2. As quimiocinas CCL17/TARC e CCL22/MDC são ligantes do receptor CCR4 e são produzidos principalmente por eosinófilos, basófilos e linfócitos Th2 em inflamações de origem alérgica (Galli *et al.*, 2000; Panina-Bordignon *et al.*, 2001). A presença de células CCR4⁺ é observada no sangue periférico de pacientes com dermatite atópica e lupus eritematoso sistêmico (Wakugawa *et al.*, 2001; Hase *et al.*, 2001) e seus ligantes CCL17/TARC e CCL22/MDC estão envolvidos na migração de células CCR4⁺ para o epitélio pulmonar em pacientes com asma (Panina-Bordignon *et al.*, 2001). O receptor CCR4 é expresso na maioria das células T CD4⁺ de memória circulantes, incluindo células T que migram para a pele e células T CCR7⁺ de memória central (Campbell *et al.*, 1999; Sallusto *et al.*, 1999; Iellem *et al.*, 2001; Andrew *et al.*, 2001). O receptor CCR8 apresenta como ligante a quimiocina CCL1/I-309 e esse receptor é expresso somente em células de perfil Th2 (Zingoni *et al.*, 1998). Na asma de origem alérgica e na dermatite atópica foram observadas células efectoras de perfil Th2 CCR8⁺ que migram para o local da inflamação em resposta a CCL1/I-309 (Panina-Bordignon *et al.*, 2001; Gombert *et al.*, 2005).

Os receptores CCR5 e CXCR3 são expressos principalmente em células Th1 (Bonecchi *et al.*, 1998; Loetscher *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998). A expressão das quimiocinas CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10 é regulada por IFN- γ e atraem seletivamente linfócitos T CXCR3⁺ (Loetscher *et al.*, 1996). Respostas associadas a reações de hipersensibilidade tardia (DTH, do inglês “delayed-type hypersensitivity”), tais como as respostas geradas por infecções virais, ou em doenças autoimunes como a esclerose múltipla (Balashov *et al.*, 1999; Sauty *et al.*, 1999), a expressão local de CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10 é regulada positivamente por IFN- γ e leva ao recrutamento de linfócitos efetores para os tecidos inflamados (revisado em Baggiolini, 1998). As células T em reações associadas à DTH também expressam grandes quantidades de CCR5 e CXCR3, como por exemplo, no tecido sinovial na artrite reumatóide (Mosmann e Sad, 1996; Qin *et al.*, 1998) e na esclerose múltipla (Balashov *et al.*, 1999). O receptor CCR5 apresenta como ligantes as quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES, que atraem células CCR5⁺ incluindo células T ativadas e de memória, monócitos e macrófagos (Baggiolini *et al.*, 1994; Sallusto *et al.*, 2000). A expressão de CCR5 e seus ligantes tem sido observada em doenças inflamatórias crônicas (Mosmann e Sad, 1996; Qin *et al.*, 1998; Balashov *et al.*, 1999), contudo a expressão de CCR5 em clones de células Th1 é perdida na ausência de IL-2, o que não é observado para o receptor CXCR3 (Sallusto *et al.*, 1998).

A expressão do receptor CCR7 também subdivide células T efectoras e células T de memória com distintas funções efectoras e propriedades migratórias, e também é um marcador de células T *naïve* (Sallusto *et al.*, 1999).

Estes autores observaram que a marcação de células T de sangue periférico com anticorpos para CD45RA e CCR7 revelou três subtipos de células T: células T *naïve* CD45RA⁺CCR7⁺, e dois subtipos de células T de memória CD45RA⁻CCR7⁺ (denominadas células T de memória central - Tcm) e CD45RA⁻CCR7⁻ (células T de memória efetora - Tem) (Sallusto *et al.*, 1999).

Rivino *et al.* (2004) demonstraram que células Tcm CXCR3⁺ e Tcm CCR4⁺ diferenciam-se em células efetoras Th1 ou Th2 CCR7⁺ de maneira independente do antígeno. CXCR3 e CCR4 são preferencialmente induzidas em condições Th1 e Th2, respectivamente (D'Ambrosio *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998), e células Tcm CXCR3⁺ e Tcm CCR4⁺ podem assim representar precursores comprometidos com as linhagens Th1 e Th2, com capacidade de gerar células efetoras por extensos períodos na ausência de antígenos. Os mesmos autores também demonstraram que estas células, Tcm CXCR3⁺ e Tcm CCR4⁺ apresentam baixa capacidade de produzir IFN- γ e IL-4 quando comparadas com células Tem CXCR3⁺ e Tem CCR4⁺. Entretanto estas células Tcm CXCR3⁺ e Tcm CCR4⁺ diferenciam-se em células efetoras Th1 e Th2 em resposta a citocinas como IL-7 e IL-15, independente do estímulo convencional indutor de células Th1 e Th2 (Rivino *et al.*, 2004). A expressão de CCR8 em células de memória também foi relatada. Soler *et al.* (2006) demonstraram que células efetoras de perfil Th2 e células T CD4⁺Foxp3⁺ de memória com perfil regulador expressam CCR8, e essas células podem migrar para os sítios de inflamação onde participam da indução e regulação da resposta alérgica.

As quimiocinas, em alguns casos, estão diretamente relacionadas com as patologias resultantes de infecções. Diferentes patógenos ou tipos de estímulos são capazes de induzir diferentes quimiocinas inflamatórias, que, por sua vez, recrutam diferentes padrões de células T para o local da infecção. O recrutamento excessivo de leucócitos, devido à expressão de quimiocinas, ocorre em doenças inflamatórias agudas e crônicas, como a asma, esclerose múltipla e artrite reumatóide (Proudfoot, 2002).

Embora ainda não esteja claro como ocorre a miocardite na infecção experimental pelo *T. cruzi*, muitos trabalhos começaram a estudar o potencial papel das quimiocinas nesse processo. Em modelos animais de infecção pelo *T. cruzi*, tem sido observada a produção de quimiocinas no tecido cardíaco. Durante a fase crônica foram observadas quimiocinas indutíveis por IFN- γ como CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10, em lesões cardíacas de camundongos com 120 dias de infecção (Teixeira *et al.*, 2002). Outros autores observaram que camundongos transgênicos superexpressando CCL2/MCP-1 ou TNF- α no coração desenvolvem hipertrofia e dilatação cardíaca (Kolattukudy *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 2000).

Dos Santos *et al.* (2001) encontraram uma alta porcentagem de linfócitos T CD8⁺ presentes no miocárdio de camundongos infectados com *T. cruzi* (120 dias de infecção), expressando um fenótipo de ativação caracterizado como CD62L^{low} LFA-1^{high} VLA-4^{high}. Os autores também encontraram vários fatores induzidos por IFN- γ como a molécula de adesão VCAM-1 e quimiocinas como CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CXCL9/Mig e

CXCL10/IP-10, que estão expressas no miocárdio de camundongos infectados e podem contribuir para o intenso recrutamento celular e, portanto, para o estabelecimento e manutenção da miocardite induzida pela infecção com *T. cruzi*.

Corroborando esses dados, outros autores também demonstram que quimiocinas como CCL3/MIP1- α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES, ligantes do receptor CCR5, foram detectadas no coração de camundongos infectados com *T. cruzi* (17 dias de infecção) em associação com linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Machado *et al.*, 2005). Foi observado ainda que camundongos deficientes do receptor CCR5 apresentam drástica redução do infiltrado inflamatório cardíaco, indicando a importância do receptor CCR5 na migração de linfócitos e controle da replicação local do parasita (Machado *et al.*, 2005). Aliberti *et al.* (2001) também demonstraram a presença de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no miocárdio e a produção de quimiocinas como CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10 neste tecido, sugerindo que estas quimiocinas podem estar envolvidas na atração de linfócitos para o coração de animais infectados com *T. cruzi* (9 dias de infecção).

Face à predominância de células T Th1 no infiltrado da CCC, é razoável esperarmos alterações na expressão de tais moléculas no sítio da lesão.

Estudos recentes indicam uma regulação positiva de quimiocinas em processos inflamatórios no miocárdio associados com infarto (Baggiolini, 2001; Frangogiannis *et al.*, 2001; Frangogiannis *et al.*, 2002^a; Frangogiannis *et al.*, 2002^b; Gerard e Rollins, 2001) e com a cardiomiopatia isquêmica (Frangogiannis *et al.*, 2002^b; Dewald *et al.*, 2003). Elevadas concentrações

plasmáticas de quimiocinas tem sido associadas com o pior prognóstico na falência cardíaca (Filippatos *et al.*, 2003) e cardiomiopatia dilatada (Aukrust *et al.*, 1998). Contudo, o exato papel da sinalização de quimiocinas na patologia do miocárdio permanece pouco compreendido.

Dados sugerem que cardiomiócitos podem ter um papel ativo na resposta inflamatória, não somente por produzir quimiocinas, mas também por expressarem vários receptores de quimiocinas dos subtipos CC e CXC (Damas *et al.*, 2000^a; Damas *et al.*, 2000^b). A descoberta de quimiocinas no tecido cardíaco em associação aos cardiomiócitos sugere que a produção local de quimiocinas pode exercer efeitos no miocárdio, possivelmente atuando através de mecanismos autócrinos e/ou parácrinos (Cunha-Neto *et al.*, 2005).

1.4 PAPEL DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SOBRE OS CARDIOMIÓCITOS – HIPERTROFIA

Análises dos aspectos celulares e moleculares da hipertrofia de cardiomiócitos em cultura mostraram que durante a hipertrofia ocorre aumento no tamanho da célula, aumento da expressão de genes embrionários, incluindo genes para peptídeos natriuréticos e acúmulo de proteínas contráteis (Chien *et al.*, 1993; Hunter e Chien, 1996).

Na hipertrofia cardíaca, observa-se um aumento no tamanho da célula na ausência de divisão celular, acompanhado por alterações qualitativas e quantitativas da expressão gênica. O aumento na expressão dos genes

fetais, como por exemplo, cadeia pesada de beta-miosina, alfa-actina e fator natriurético atrial (ANF, do inglês “atrial natriuretic factor”), ocorre concomitante à diminuição de expressão da cadeia pesada de alfa-miosina e da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (Schaub *et al.*, 1997).

A indução de genes para peptídeos natriuréticos é uma característica de hipertrofia e também um indicador prognóstico de gravidade clínica. Os peptídeos natriuréticos: fator natriurético atrial (ANF) e o peptídeo natriurético cerebral (BNP, do inglês “brain natriuretic peptide”) são hormônios circulantes de origem cardíaca. O ANF é sintetizado no átrio e o BNP no ventrículo, e ambos apresentam importante papel na regulação do volume e pressão sanguínea (revisado em Nishikimi *et al.*, 2006).

Estudos demonstram elevadas concentrações de ANF e BNP na circulação de pacientes chagásicos crônicos com cardiomiopatia (Piazza *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 2002; Benvenuti *et al.*, 2003), contudo, o aumento na síntese desses peptídeos não foi relacionado à inflamação. Resultados recentes de nosso grupo utilizando *microarray* de cDNA mostraram indução do perfil hipertrófico/embrionário de expressão gênica com aumento de expressão de ANF, e das proteínas sarcoméricas alfa-actina de músculo cardíaco esquelético, alfa-actina de músculo liso, cadeia leve de miosina-2, cadeia pesada de miosina cardíaca, cadeia pesada de miosina de músculo liso, e teletonina em miocárdio de pacientes com CCC ou CDI em comparação a miocárdio de indivíduos saudáveis (Cunha-Neto *et al.*, 2005).

A hipertrofia do miocárdio é um dos primeiros eventos a ocorrer no desenvolvimento clínico da insuficiência cardíaca e é um importante fator de

morbidade e mortalidade. A hipertrofia do miocárdio pode ocorrer em resposta a uma variedade de estímulos mecânicos/hemodinâmicos (sobrecarga pressão/volume), hormonais (angiotensina II, endotelina 1, hormônio tireoideano), e inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-18, MCP-1) (Chandrasekar *et al.*, 2004; Cunha-Neto *et al.*, 2005).

Nosso grupo recentemente demonstrou a participação do IFN- γ na hipertrofia de cardiomiócitos por meio da técnica de qRT-PCR. Cardiomiócitos, obtidos de fetos de camundongos, quando colocados em cultura na presença de IFN- γ apenas, ou em combinação com CCL2/MCP-1, aumentaram em 15 e 400 vezes, respectivamente, a expressão de *ANF*, um dos genes fetais cuja expressão está envolvida na hipertrofia e falência cardíaca (Cunha-Neto *et al.*, 2005).

Chandrasekar *et al.* (2004) demonstraram que a IL-18 induz transcrição do gene *ANF* e hipertrofia de cardiomiócitos em cultura, sugerindo que a IL-18 poderia ter um papel no início e na progressão da falência do coração, estado caracterizado pela hipertrofia do miocárdio.

Além disso, estudos demonstraram que cardiomiócitos de rato em cultura tratados com TNF- α produzem CCL2/MCP-1, o que pode aumentar a resposta inflamatória no miocárdio por induzir a produção de IL-1 β e IL-6 em cardiomiócitos (Damas *et al.*, 2001). A IL-1 β e o TNF- α induzem diretamente resposta hipertrófica em cardiomiócitos em cultura (Schaub *et al.*, 1997; Yokoyama *et al.*, 1997; Petersen e Burleigh, 2003). Em suma, os resultados demonstram que cardiomiócitos são capazes de responder ao estímulo de diversos mediadores inflamatórios, apresentando respostas biológicas.

Dados da literatura demonstram também que cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* expressam RNAm para mediadores como TNF- α , IL-1 β e iNOS e para quimiocinas como CXCL2/MIP-2, CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES e CCL2/MCP-1 (Machado *et al.*, 2000; Talvani *et al.*, 2000). Cardiomiócitos respondem a estímulos como IFN- γ , IL-1 β , TNF- α ou quimiocinas, produzindo altos níveis de NO (Machado *et al.*, 2000). O NO pode regular diretamente as propriedades contráteis das células musculares (Balligand *et al.*, 1994) levando a depressão da função cardíaca (Joe *et al.*, 1998) e dano ao miocárdio (Ishiyama *et al.*, 1997).

1.5 CARDIOMIOPATIAS DE ETIOLOGIA NÃO INFLAMATÓRIA

As cardiomiopatias são definidas como doenças do miocárdio associadas com disfunção cardíaca, sendo classificadas pela patofisiologia dominante ou, se possível, pela etiologia e/ou fatores patogénéticos (WHO/ISFC Task Force, 2003). As cardiomiopatias são classificadas como: cardiomiopatia hipertrófica, cardiomiopatia restritiva, cardiomiopatia hipertensiva, cardiomiopatia isquêmica e cardiomiopatia dilatada, dentre outras. A dilatação e hipertrofia ventriculares são características comuns a todas, em seu estado terminal (WHO/ISFC Task Force, 2003).

A cardiomiopatia hipertrófica é caracterizada pela hipertrofia do ventrículo esquerdo e/ou direito, que torna-se assimétrico e envolve o septo interventricular (Wigle *et al.*, 1985).

A cardiomiopatia restritiva é caracterizada pelo reduzido volume diastólico de um ou ambos os ventrículos com função sistólica normal ou próxima do normal, e com hipertrofia leve ou ausente (revisado em Sangiorgi, 2003).

A cardiomiopatia hipertensiva é descrita como uma hipertrofia do ventrículo esquerdo em associação com características de cardiomiopatia dilatada ou restritiva com falência cardíaca (WHO/ISFC Task Force, 2003).

A cardiomiopatia isquêmica apresenta-se como uma cardiomiopatia dilatada com contractibilidade prejudicada, que é explicada pela doença da artéria coronária ou dano isquêmico (WHO/ISFC Task Force, 2003).

A cardiomiopatia dilatada é caracterizada pela presença de dilatação e contração prejudicada do ventrículo esquerdo ou ambos os ventrículos, podendo ser classificada como idiopática, genética/familiar, viral e/ou autoimune e tóxica/alcoólica (WHO/ISFC Task Force, 2003).

A Cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) é uma doença do músculo cardíaco caracterizada por dilatação ventricular, disfunção contrátil dos ventrículos direito e/ou esquerdo e sintomas de insuficiência cardíaca congestiva. As características histopatológicas da CDI incluem fibrose, necrose de miócitos e ausência ou leve infiltração de células mononucleares (De Maria *et al.*, 1993). Estudos sugerem uma etiologia de origem viral para a CDI, possivelmente mediada por mecanismos imunológicos. Evidências indiretas indicam que o vírus Coxsackie B3 pode causar 7-30% das miocardites agudas, dos quais aproximadamente 10% podem progredir para a CDI (Helin *et al.*, 1968). Outros vírus também podem estar associados a miocardite/CDI como o adenovírus, vírus da influenza, citomegalovírus e

HIV, porém o papel desses vírus ainda não foi amplamente estudado (Woodruff, 1980; Liu *et al.*, 1996). A presença de um fator auto-imune na CDI foi relatada pela identificação de auto-anticorpos específicos, infiltrado inflamatório e citocinas pró-inflamatórias (Maisch *et al.*, 2000). Há também evidências que fatores genéticos tenham um importante papel na patogênese da CDI contribuindo para a suscetibilidade ou determinando mudanças funcionais e estruturais que caracterizam a expressão fenotípica da doença (Caforio *et al.*, 1996).

A elevada expressão de mediadores inflamatórios na circulação e no miocárdio predispõe à falência cardíaca congestiva através de vários mecanismos. A ativação de leucócitos e a migração dessas células da circulação para áreas de inflamação no miocárdio parece ser um importante fator na resposta imunológica na falência cardíaca congestiva (Devaux *et al.*, 1997). Interações entre monócitos ativados e o miocárdio humano tem sido encontradas na falência cardíaca congestiva independente de sua causa (Devaux *et al.*, 1997). Corroborando essas observações, estudos sugerem que citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1, modulam as funções cardiovasculares através de vários mecanismos (Mann e Young, 1994). Yndestad *et al.* (2003) demonstraram que células T provenientes do sangue periférico de pacientes com falência cardíaca crônica regulam positivamente a expressão gênica de IFN- γ , IL-18, TNF- α , FasL e CCL3/MIP-1 α , sugerindo que células T podem representar uma importante fonte celular na resposta imune na falência cardíaca, possivelmente apresentando um papel patogênico nesta doença.

Quimiocinas podem indiretamente levar ao dano e disfunção do músculo cardíaco através da ativação e produção de espécies reativas do oxigênio, metaloproteinases de matriz e citocinas inflamatórias (Rollins *et al.*, 1991; Luster, 1998; Murdoch e Finn, 2000). As quimiocinas também podem regular outros processos biológicos importantes na patogênese da falência cardíaca, por exemplo fibrose, angiogênese e apoptose (Koch *et al.*, 1992; Luster, 1998; Murdoch e Finn, 2000).

Dados da literatura demonstram que CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES são produzidos por vários leucócitos, contudo CCL5/RANTES também é produzido por plaquetas (Baggiolini *et al.*, 1994; Holme *et al.*, 1998). Weyrich *et al.* (1996) demonstraram que plaquetas ativadas estimulam a produção de CCL2/MCP-1 em monócitos através do aumento de secreção de CCL5/RANTES, sugerindo que a interação monócito-plaqueta possa contribuir para o aumento dos níveis de quimiocinas CC na falência cardíaca congestiva.

Adicionalmente, Aukrust *et al.* (1998) demonstraram que células isoladas do sangue periférico de pacientes com falência cardíaca congestiva, incluindo cardiomiopatias isquêmica e não-isquêmica, secretam elevados níveis das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES, e que esses níveis correlacionam-se com a gravidade dos sintomas e com o grau de disfunção do ventrículo esquerdo. Outro grupo demonstrou a presença de CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8 e CXCR4 em cardiomiócitos e em células vasculares do músculo liso, sugerindo que cardiomiócitos também poderiam ter um papel ativo no processo inflamatório produzindo quimiocinas e expressando seus receptores (Damas *et al.*, 2000).

O aumento da expressão de quimiocinas no miocárdio e de seus correspondentes receptores em leucócitos infiltrantes e/ou cardiomiócitos nas várias formas de falência cardíaca sugere um importante papel para as interações relacionadas a quimiocinas na patogênese das cardiomiopatias (Aukrust *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

Na doença de Chagas o estabelecimento de uma resposta inflamatória é importante no controle do parasitismo intenso característico da fase aguda, entretanto, essa resposta pode acarretar o desenvolvimento de uma cardiomiopatia de natureza inflamatória na fase crônica (CCC). Curiosamente, os fatores que determinam a composição do infiltrado inflamatório e contribuem com a migração e acúmulo das células inflamatórias dentro do tecido cardíaco na CCC são ainda desconhecidos.

Visto que pacientes com CCC evoluem para um pior prognóstico em comparação a pacientes portadores de outras cardiomiopatias de natureza não inflamatória e considerando que a principal diferença entre estas patologias é a presença do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de chagásicos, é possível hipotetizar que diversos mediadores inflamatórios produzidos localmente estejam envolvidos nos mecanismos do pior prognóstico. Portanto, a identificação dos mediadores inflamatórios diferencialmente expressos entre esses grupos e seus efeitos biológicos se torna ferramenta no entendimento da participação desses mediadores na patologia da CCC.

Mediadores como IL-6 e a expressão de RNAm codificando as quimiocinas CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10, bem como os receptores CCR5 e

CXCR3 já foram identificados no tecido cardíaco de pacientes com CCC, entretanto, pouco se sabe sobre a participação destes no dano cardíaco. Por outro lado, embora mediadores como IL-18, IL-12, IL-1 β , CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES tenham sido observados no tecido cardíaco de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, não se sabe se são expressos no miocárdio de pacientes com CCC.

Dessa forma, o objetivo geral do presente trabalho é avaliar a expressão local dos mediadores citados acima, além de outras citocinas do padrão pró- e antiinflamatório, citocinas regulatórias e quimiocinas inflamatórias e seus receptores envolvidos na migração diferencial de linfócitos T de memória e do fenótipo Th1/Th2. A identificação de genes diferencialmente expressos na CCC permitirá a obtenção de um perfil da expressão destes genes no miocárdio de pacientes com CCC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

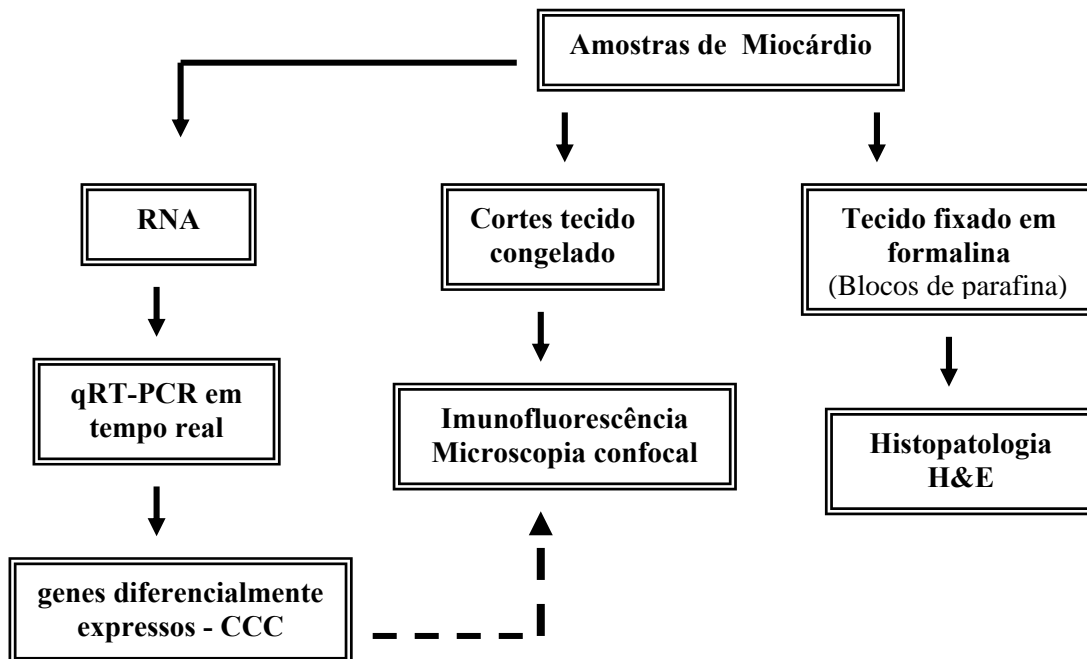
1. Investigar a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias/Th1 (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IL-23), citocinas antiinflamatórias/Th2 (IL-4 e IL-13), da citocina regulatória TGF- β e do fator de transcrição Foxp3 em amostras de miocárdio de portadores de CCC e portadores de cardiomiopatias de etiologia não inflamatória (CNI), em comparação com miocárdio de doadores saudáveis.

2. Investigar a expressão gênica de quimiocinas envolvidas na migração de células inflamatórias e seus receptores (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP1- β , CCL5/RANTES e o receptor CCR5), na migração de células T de memória e seu receptor (CCL19/ELC, CCL21/SLC, e o receptor CCR7), e quimiocinas envolvidas na migração diferencial de linfócitos Th1/Th2 e seus receptores (CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10 e seu receptor CXCR3 para Th1; CCL22/MDC e CCL17/TARC, CCL1/I-309 e os receptores CCR4 e CCR8 para Th2), em amostras do miocárdio de portadores de CCC e portadores de CNI, em comparação com miocárdio de doadores saudáveis.
3. Estudar a expressão das proteínas codificadas por transcritos diferencialmente expressos, conforme os resultados de qRT-PCR, em cortes de miocárdio com células infiltrantes CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ através da técnica de imunofluorescência com microscopia confocal.

3. MÉTODOS

3.1 ESTRATÉGIA E DESENHO EXPERIMENTAL

Para identificar genes diferencialmente expressos entre os grupos estudados, extraímos o RNA de amostras de miocárdio de pacientes com CCC ou CNI e de amostras de miocárdio de indivíduos saudáveis. Através da técnica de qRT-PCR em tempo real, identificamos os genes diferencialmente expressos entre os grupos estudados, utilizando seqüências específicas para os genes de interesse, que foram previamente padronizados. Após a identificação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos CCC e CNI, avaliamos a presença das proteínas codificadas por esses transcritos diferencialmente expressos, através da técnica de imunofluorescência com microscopia confocal. Análises histopatológicas foram realizadas com amostras de miocárdio submetidas à coloração histológica por hematoxilina e eosina (H&E). O desenho experimental pode ser observado no esquema abaixo.



3.2 AMOSTRAS DE MIOCÁRDIO HUMANO

Foram utilizadas amostras de tecido miocárdico de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC; n= 14) e amostras de tecido miocárdico de pacientes com outras cardiomiopatias de etiologia não inflamatória (CNI; n=8), submetidos ao transplante cardíaco. O grupo de pacientes com CNI é composto de três pacientes com Cardiomiopatia Isquêmica e cinco pacientes com Cardiomiopatia Dilatada Idiopática. Amostras de tecido miocárdico de doadores saudáveis, obtidas de indivíduos em morte encefálica e cujos corações não foram utilizados para transplante cardíaco, foram utilizadas como grupo controle (N; n= 6). Os fragmentos de explante de corações de portadores de CCC ou CNI (aproximadamente 100 g

da parede lateral do ventrículo esquerdo) foram obtidos no centro cirúrgico durante o transplante cardíaco. A obtenção das amostras foi possível devido a uma colaboração entre o Laboratório de Imunologia e a equipe de Transplante Cardíaco do InCor-HC/FMUSP, coordenada pelo Prof. Dr. Noedir Stolf, Dr. Ronaldo Honorato e Dr. Alfredo Fiorelli. As amostras foram conservadas em nitrogênio líquido para extração do RNA e pequenos fragmentos dessas amostras foram conservados em meio de inclusão O.C.T. (*Tissue-Tek*, Sakura, Finetechnical Co, Tokyo, Japan) para ensaios de imunofluorescência.

As características destas amostras estão descritas na Tabela 1. A média de idade (média \pm desvio padrão) dos pacientes com CCC era $47,2 \pm 14,6$ (16-62), sendo cinco pacientes do sexo masculino e nove do sexo feminino, enquanto que os pacientes com CNI apresentavam média de idade (média \pm desvio padrão) de $53,3 \pm 7,5$ (39-63), sendo oito pacientes do sexo masculino. A média de idade dos doadores do grupo controle (média \pm desvio padrão) é de $32,2 \pm 12,8$ (20-46), sendo seis indivíduos do sexo masculino. A fração de ejeção (FE), medida durante um ecocardiograma, indica os níveis de alteração de função do músculo cardíaco (capacidade cardíaca em bombear o sangue) e de distúrbios de condução elétrica. Quanto menor a fração de ejeção, maior o comprometimento cardíaco, sendo classificada como grave uma $FE \leq 0,4$.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo de pesquisa nº 739/05.

Tabela 1. Descrição dos pacientes com CCC, CNI e doadores saudáveis (N), dos quais foram obtidas as amostras de miocárdio

| Identificação Amostra | Etiologia | Sexo | Idade | FE |
|----------------------------------|------------------|-------------|--------------|-----------|
| CCC-1 | CCC | M | 16 | ND |
| CCC-2 | CCC | F | 44 | 0,21 |
| CCC-3 | CCC | F | 62 | 0,15 |
| CCC-4 | CCC | F | 24 | 0,18 |
| CCC-5 | CCC | M | 50 | 0,23 |
| CCC-6 | CCC | F | 47 | ND |
| CCC-7 | CCC | F | 49 | 0,15 |
| CCC-8 | CCC | M | 28 | 0,21 |
| CCC-9 | CCC | F | 55 | 0,36 |
| CCC-10 | CCC | M | 58 | 0,29 |
| CCC-11 | CCC | M | 57 | ND |
| CCC-12 | CCC | F | 60 | 0,2 |
| CCC-13 | CCC | F | 61 | 0,27 |
| CCC-14 | CCC | F | 50 | 0,25 |
| CNI-1 | CDI | M | 53 | 0,19 |
| CNI-2 | CDI | M | 39 | 0,16 |
| CNI-3 | CDI | M | 63 | 0,38 |
| CNI-4 | CDI | M | 55 | 0,19 |
| CNI-5 | CDI | M | 50 | 0,2 |
| CNI-6 | C. Isq. | M | 62 | 0,37 |
| CNI-7 | C.Isq. | M | 52 | 0,33 |
| CNI-8 | C.Isq. | M | 52 | 0,3 |
| N-1 | N | M | 46 | ND |
| N-2 | N | M | 40 | ND |
| N-3 | N | M | 22 | ND |
| N-4 | N | M | 20 | ND |
| N-5 | N | M | 45 | ND |
| N-6 | N | M | 20 | ND |

CCC – Cardiomiopatia Chagásica Crônica; CNI – Cardiomiopatia de etiologia não inflamatória; CDI – Cardiomiopatia Dilatada Idiopática; C.Isq. – Cardiomiopatia Isquêmica; N – doadores de coração saudáveis; FE - fração de ejeção; ND – não determinada. M- masculino; F – feminino.

3.3 OBTENÇÃO DE cDNA

3.3.1 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA foi extraído pelo método baseado em Chomczynski e Sacchi (1987), o qual utiliza solução de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para isolamento de RNA total. Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe a célula mantendo a integridade do RNA. A técnica consistiu inicialmente na homogeneização de amostras de tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) de aproximadamente 20-40 mg em solução de Trizol utilizando homogeneizador de tecido (Power Gen 1000, Fisher Scientific, Atlanta, USA). Após a incubação das amostras por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir completa dissociação de complexos de nucleoproteínas, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de Trizol, seguido de agitação vigorosa por aproximadamente 15 segundos. O material foi posteriormente incubado por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos a 1120 g a 4°C. Após esta centrifugação ocorre a separação da solução em três fases (aquosa, interface e orgânica). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 0,5 mL de álcool isopropílico para cada mL de Trizol, para a precipitação do RNA. Este tubo foi homogeneizado por inversão, e após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugado novamente a 1120 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA lavado com etanol 75% diluído em água DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), seguido de centrifugação a 640 g por 5

minutos a 4°C. O RNA assim obtido foi deixado secar por 5 minutos para evaporação do etanol e então ressuspendido em 10 µL de água DEPC. Este material foi mantido a -80°C até o momento da transcrição reversa.

3.3.2 QUANTIFICAÇÃO DE RNA E TRATAMENTO COM DNASE

Após extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (Beckman, DU530, Fullerton, CA, USA) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da relação entre 260 e 280nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores de razão entre 1,6 e 1,9. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que a densidade ótica (DO) igual a 1 corresponde a 40 µg de RNA / mL no comprimento de onda de 260 nm (Sambrook, 1989). Além disto, uma alíquota de RNA foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% para visualização da integridade das amostras, observando as duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S e também possíveis contaminações com DNA (Figura 3).

Para evitar possíveis contaminações com DNA, o RNA foi tratado com rDNase, de acordo com a recomendação do fabricante. Adicionou-se para cada 1 µg de RNA total 1 unidade de rDNase I (DNase recombinante bovina Usb, USA), 1 µL de tampão 10x rDNase e água DEPC q.s.p. para 9 µL, e a reação foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Após o tempo de incubação foi adicionado 1 µL da solução de inativação da enzima para cada 1 µg de RNA total, e incubou-se por 10 minutos a 65°C. Para avaliar a

qualidade do RNA após o tratamento com DNase I, 1µg de RNA tratado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram consideradas adequadas quando as bandas de 28S e 18S se mostraram íntegras e nenhum traço de DNA genômico foi detectado.

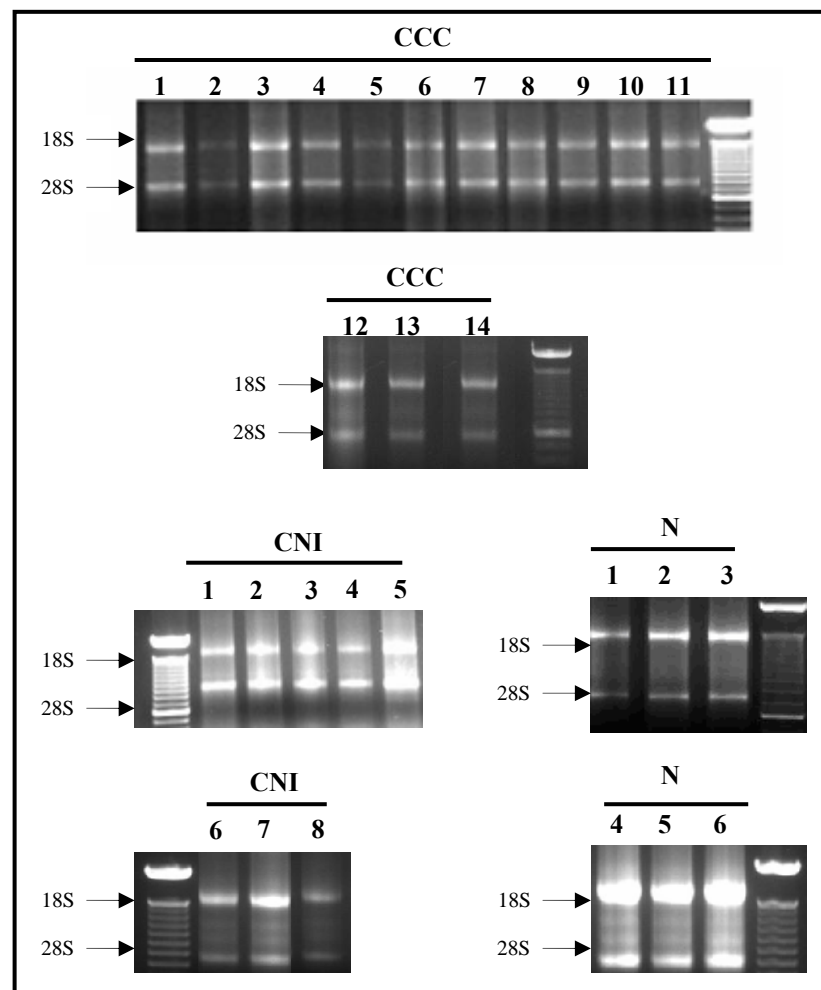


Figura 3. Avaliação da integridade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose. 1 µg de RNA de cada amostra foi carregado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) e submetido a corrida eletroforética a 100 V durante 40 minutos. Amostras de RNA: numeração de 1 a 14 corresponde a amostras provenientes de miocárdio de pacientes com CCC; numeração de 1 a 8 corresponde a amostras provenientes de miocárdio de pacientes com CNI; numeração de 1 a 6 corresponde a amostras provenientes de miocárdio de doadores saudáveis (N – miocárdio controle). Ao final ou início de cada figura podemos observar o marcador de peso molecular de 100pb (Ladder 100bp, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

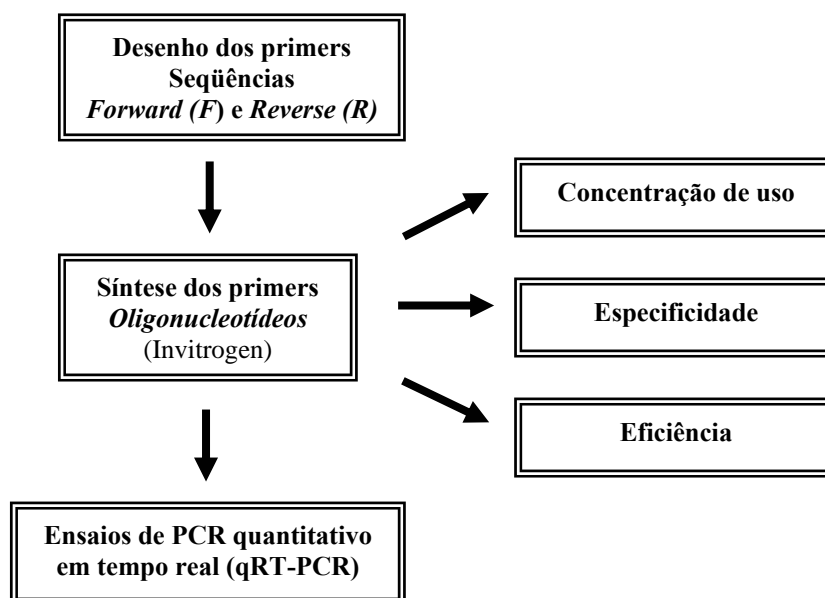
3.3.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA

Após constatação da qualidade e pureza do RNA e do tratamento do RNA total com DNase, foi feita a transcrição reversa de 5µg de RNA total para cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa Super-script II™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para este protocolo foi adicionado ao RNA 1µL de oligodT (500 µg/mL), 1µL de dNTP (10mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e água DEPC q.s.p. 20µL. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos em termociclador (MJ research, Inc. Watertown, MA, USA). Em seguida foram adicionados ao tubo de reação 4µL de tampão de transcrição 5x, 2µL de DTT 0,1M e 1µL de inibidor de RNase (40U/µL) (RNase OUT™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram então colocadas em termociclador a 42°C por 2 minutos. Por último foi adicionado 1µL da enzima transcriptase reversa (200U/µL), e esta solução foi colocada novamente em termociclador a 42°C por 50 minutos seguidos de 70°C por 15 minutos. Ao final da transcrição o cDNA foi mantido a -20°C.

3.4 EXPRESSÃO GÊNICA - PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

3.4.1 SEQÜÊNCIAS DE PRIMERS

Os primers utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram desenhados, sintetizados, padronizados quanto a sua concentração de uso e verificados quanto a sua especificidade, e eficiência, como mostrado no esquema abaixo:



Todas as etapas citadas acima, que antecedem os ensaios de qRT-PCR, são necessárias e foram cuidadosamente seguidas, garantindo a qualidade de nossos resultados.

3.4.2 DESENHO E PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS

Os primers utilizados nas reações de qRT-PCR foram desenhados pelo programa *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O tamanho dos primers variou de 18 a 25 pares de bases (pb), T_m de 59-61°C (T_m , do inglês “melting point”) e o conteúdo de GC de 40-60%. O tamanho dos produtos de amplificação gerados variou de 81 a 119pb e seu T_m de 73-85°C. Na Tabela 2 podemos observar a sequência e características dos primers que foram utilizados nas reações de qRT-PCR.

Tabela 2. Descrição e identificação dos genes estudados, sequência dos primers utilizados e características do produto de amplificação

| Gene Bank Nº Acesso Gene Bank | Sequências 5'→ 3' | Tam Ampl | Tm Ampl | Concent. / Diluição | E |
|----------------------------------|--|-------------|------------|------------------------|--------|
| IL-6 M14584 | TCAGCCCTGAGAAAGGAGACATG GCATCCATCTTTTTCAGCCATCT | 111pb | 77°C | 100nM / 1:10 | 2,0 |
| IL-18 D49950 | GCATCAACTTTGTGGCAATGAAA AAGCTTGCCAAAGTAATCTGACTCC | 95pb | 73°C | 200nM / 1:10 | 2,2 |
| IL-1β M15330 | AGGATATGGAGCAACAAGTGGTG ATTCTTTTCCTTGAGGCCCAAG | 98pb | 80°C | 200nM / 1:5 | 2,0* |
| IL-12p35 NM_000882 | GCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAG TTGAAATTCAGGGCTGCAT | 92pb | 77°C | 200nM / 1:5 | 2,2* |
| IL-12p40 NM_002187 | TGTCAAAAGCAGCAGAGGCTCT CTTGTTGTCCCCTCTGACTCTCTC | 91pb | 82°C | 200nM / 1:5 | 1,9* |
| IL-23 NM_016584 | GGACAACAGTCAGTTCTGCTTGC AGGCTCCCCTGTGAAAATATCC | 91pb | 78°C | 200nM / 1:5 | 1,9* |
| IL-4 M13982 | TCCGATTCTGAAACGGCT TCTGGTTGGCTTCTTCACAG | 81pb | 83°C | 200nM / 1:5 | 2,2** |
| IL-13 X69079 | ACCTGACAGCTGGCATGTACTG AGAATCCGCTCAGCATCCTCT | 99pb | 82°C | 200nM / 1:5 | 2,0** |
| TGF-β M38449 | GGTGGAAACCCACAACGAAAT TCTCGGAGCTCTGATGTGTTGA | 85pb | 75°C | 200nM / 1:10 | 1,9 |
| IL-8 NM_000584 | TGCGCCAACACAGAAATTATTGTAA TCAGCCCTCTTCAAAACTTCTCC | 110pb | 78°C | 100nM / 1:10 | 2,1 |
| Foxp3 NM_014009 | GAGAAGGGCAGGGCACAAT TGGGCTGCATGGCAC | 101pb | 83°C | 200nM / 1:5 | 2,0*** |
| CCL3/MIP1α AF043339 | ACCAGTTCTCTGCATCACTTGCT GCTGCTCGTCTCAAAGTAGTCAGC | 110pb | 82°C | 200nM / 1:5 | 2,1 |
| CCL4/MIP-1β J04130 | GCTTCCTCGCAACTTTGTGGT CACTGGGATCAGCACAGACTTG | 110pb | 80°C | 300nM / 1:10 | 1,9 |
| CCL5/RANTES M21121 | CGTGCCACATCAAGGAGTATT CACACATTGGCGTTCTTTC | 91pb | 80°C | 400nM / 1:10 | 2,0 |
| CCR5 U57840 | TCCGCTCTACTCACTGGTGTTC CATGCTCTTCAGCCTTTTGCAG | 91pb | 78°C | 100nM / 1:10 | 2,2 |
| CCL17/TARC D43767 | CACATCCACGCAGCTCGA TGGTACCACGTCTTCAGCTTTCTA | 98pb | 81°C | 200nM / 1:5 | 2,0 |
| CCL22/MDC U83171 | CTGCGCGTGGTGAAACACTT CACAGATCTCCTTATCCCTGAAGGT | 91pb | 81°C | 200nM / 1:10 | 2,0 |
| CCR4 X85740 | CCCTTCCTGGCTTTCTGTTC TTCCACGTCGTGGAGTTGAGA | 91pb | 78°C | 400nM / 1:10 | 2,0 |
| CCL19/ELC NM_006274 | GCCTGCTGGTTCTCTGGACTT TTTCTGGGTCACAGACAGGCA | 86pb | 81°C | 100nM / 1:10 | 2,0 |
| CCL21/SLC NM_002989 | TCCATCCCAGCTATCCTGTTCT TGCTTTGCCATGCTGCATCA | 108pb | 83°C | 300nM / 1:10 | 2,0 |
| CCR7 L31581 | CTCTCCTTGTCATTTTCCAGGTATG TTGGAGCACAAAGACTCGAACA | 109pb | 79°C | 200nM / 1:10 | 2,0 |
| CCL11/-309 J04130 | CAGCTCCATCTGCTCCAATGA CCTCTGAACCATCCAAGTGTG | 91pb | 79°C | 200nM / 1:5 | 2,0* |
| CCR8 NM_005201 | ATGCCCTAAAGGTGAGGACGAT ACTAGCAATGGGATGGTAGCCA | 91pb | 80°C | 200nM / 1:5 | 2,0 |
| CXCL9/Mig X72755 | TCTGATTGAGTGCAAGGAACC GGTCTTTCAAGGATTGTAGGTGGA | 98pb | 79°C | 100nM / 1:10 | 2,0 |
| CXCL10/IP-10 X02530 | TCCACGTGTTGAGATCATTGCTA GCTTTCAGTAAATTCTTGATGGCC | 93pb | 74°C | 300nM / 1:10 | 1,9 |
| CXCR3 NM_001504 | GTCCCTGAGGTGAGTGACCACC ACGAGTCACTCTCGTTTTCTCCA | 106pb | 80°C | 200nM / 1:10 | 2,0 |
| ANF NM_006172 | GGTCAGACCAGAGCTAATCCCA TCTTTTCTTCCAAATGGTCCAGC | 91pb | 78°C | 200nM / 1:10 | 2,0 |
| BNP NM_002521 | TGCTCTTCTTGCACTCTGGCTTT GGTTGCGCTGCTCCTGTAAC | 105pb | 85°C | 200nM / 1:10 | 1,9 |
| GAPDH NM_002046 | TGGTCTCCTCTGACTTCA AGCCAAATTCGTTGTCAT | 117pb | 82°C | 200nM / 1:5 ou 1:10 | 2,0 |

O número de acesso foi obtido no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Tam Ampl - tamanho do produto de amplificação; pb - pares de base; Tm Ampl - temperatura do produto amplificado; Concent. / diluição - concentração de uso do primer e diluição de uso de cDNA; E – eficiência; * eficiência calculada utilizando amostra de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com fito-hemaglutinina (PHA); ** eficiência calculada utilizando amostra de cDNA provenientes de cornetos nasais obtidos em cirurgia de turbinectomia de pacientes portadores de rinite alérgica obstrutiva; *** eficiência calculada utilizando amostra de cDNA provenientes de linfócitos T purificados de sangue periférico .

3.4.3 REAÇÃO DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR foram realizadas em triplicatas em placas de 96 poços, usando o reagente “SYBR-Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o equipamento “Perkin-Elmer ABI PRISM 7500 Sequence Detection System” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual de instruções do fabricante ABI PRISM 7500. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn+ - Rn-$), onde $Rn+$ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e $Rn-$ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e o ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa foi estabelecido um valor de ΔRn , correspondente a linha de corte (*Threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de primers. O número do ciclo em que a ΔRn cruza o threshold corresponde ao Ct (Ct , do inglês “cycle threshold”) da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de RNAm alvo presente na amostra e quanto menor o seu valor, maior é quantidade de

RNA presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001), utilizando como gene de referência (endógeno) GAPDH (D-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Amostras de miocárdio de indivíduos saudáveis (N) foram utilizadas como controle (calibrador) de nosso ensaio, ou seja, o valor de quantificação relativa (QR) de cada amostra, CCC ou CNI, foi calculado considerando o valor da média ΔCt do grupo N. Consideramos significativo todo o valor de $QR \geq 2$ (genes regulados positivamente) ou $QR \leq 0,5$ (genes regulados negativamente) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis (N).

Fórmula utilizada para a quantificação relativa (QR):

$$QR = 2^{\Delta\Delta Ct}, \text{ onde } \Delta Ct = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{referência}}, \text{ e } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{controle}}$$

3.4.4 CONCENTRAÇÃO DE USO DOS PRIMERS

A concentração de uso de cada par de seqüências de primers foi inicialmente padronizada. Em reações de qRT-PCR foi utilizado um *pool* de cDNA de todas as amostras de miocárdio (CCC e CNI), onde foram testadas as concentrações de 100nM, 200nM, 300nM, 400nM e 500nM para cada par de seqüência de primers. Após as reações de qRT-PCR foram comparados os valores de Ct de cada par de primers em cada concentração e foi escolhida a concentração com base no valor de Ct , de forma que a concentração de primer não fosse um fator limitante da reação. Na Tabela 3

podemos observar a sequência e características dos primers que foram utilizados nas reações de qRT-PCR.

3.4.5 ESPECIFICIDADE E ADEQUAÇÃO DOS PRIMERS

A especificidade dos primers desenhados foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitoração da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras é proporcional à abundância de duplas fitas, nas quais se intercala o SYBR-Green e, portanto, decresce com o aumento da temperatura. Quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento do produto de amplificação (*amplicon*).

3.4.6 CÁLCULO DA EFICIÊNCIA

O cálculo da eficiência de cada par de primers foi realizado como sugerido em Pfaffl *et al.* (2002). A avaliação da eficiência indica a real cinética de amplificação da sequência de primer testada, bem como sua reprodutibilidade e exatidão. Para calcularmos o valor da eficiência de cada par de primers (*F* e *R*), utilizou-se um *pool* de todas as amostras estudadas

(*pool* cDNA). Em seguida diluímos esse *pool* em diluições seriadas (1:10 a 1:1250 ou 1:5 a 1:625), e realizamos ensaios de qRT-PCR, com cada primer de interesse, já padronizado quanto a sua concentração de uso. Após a reação de qRT-PCR, as médias dos valores de Ct das triplicatas de cada diluição foram utilizadas no cálculo da eficiência. Para cada sequência de primers construímos um gráfico com base no valor logaritmo das diluições testadas (log ng RNA; eixo X), e pelos valores da média de Ct (eixo Y). O valor da inclinação da reta (slope) foi utilizado para determinar a eficiência dos primers para cada gene de interesse, com base na fórmula:

$$E = (10^{-1/\text{slope}})$$

Valores de eficiência entre 1,8 e 2,2 significam reprodutibilidade e exatidão na cinética de amplificação (Pfaffl, 2001^a; Pfaffl, 2001^b; Meijerink *et al.*, 2001). Através das curvas de eficiência também determinamos a diluição de cDNA das amostras que utilizamos nas reações de qRT-PCR para determinarmos a expressão de cada gene. Na Tabela 2 podemos observar o valor de eficiência de cada primer. Para algumas sequências de primers a eficiência foi testada em amostras de cDNA proveniente de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com fito-hemaglutinina (PHA) por 3h, amostras de cDNA provenientes linfócitos T purificados obtidos de sangue periférico ou em amostras de cDNA provenientes de cornetos nasais obtidos em cirurgia de turbinectomia de pacientes portadores de rinite alérgica obstrutiva. A eficiência destes primers não pode ser testada no *pool* de cDNA de miocárdio, pois as amostras que compõem

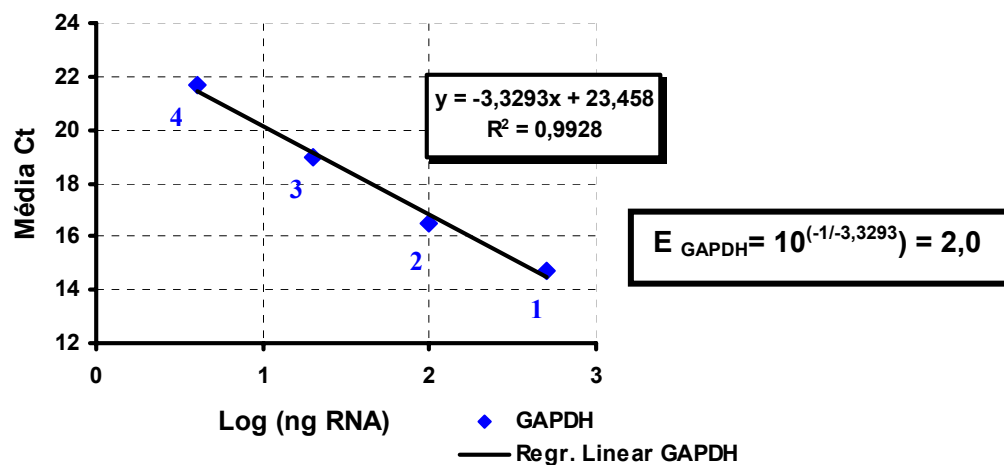
esse *pool* (amostras de cDNA de CCC e CNI) apresentam baixa ou nenhuma expressão destes genes, o que dificulta a detecção nas maiores diluições.

Para o gene endógeno GAPDH foram verificados os valores de eficiência em dois tipos de diluições seriadas: 1:5 a 1:625 e 1:10 a 1:1250 do *pool* de amostras de cDNA. Isso foi feito porque a melhor diluição de cDNA utilizada para alguns genes foi de 1:5, e a diluição de cDNA do gene de referência (endógeno) deve ser a mesma utilizada para verificar a expressão de cada gene de interesse (alvo), uma vez que o gene endógeno é utilizado como controle interno da reação de qRT-PCR.

O valor da eficiência, o gráfico da eficiência, a amplificação das amostras e a curva de dissociação são apresentados na Figura 4 para o primer de GAPDH; os valores de eficiência para os demais primers utilizados no trabalho podem ser observados no item Anexos A.

Após verificarmos que os experimentos preencheram todos os critérios de validação para qRT-PCR (eficiência e especificidade) e determinarmos a diluição cDNA a ser usada para quantificar cada gene de interesse, iniciamos nossos experimentos de quantificação da expressão gênica.

A



B

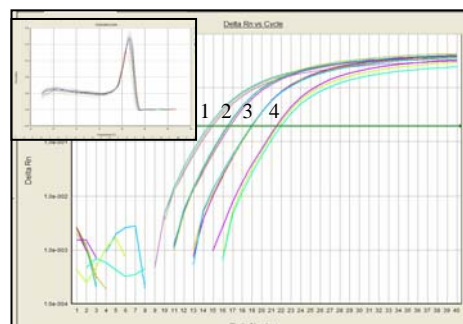


Figura 4: Cálculo da eficiência para o gene endógeno GAPDH. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4 cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA).

3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA COM MICROSCOPIA CONFOCAL

3.5.1 PREPARAÇÃO DO MATERIAL E OBTENÇÃO DOS CORTES

Amostras de tecido miocárdico (CCC n=14; CNI n=8 e N n=6) foram colocadas em meio de inclusão O.C.T. (*Tissue-Tek*, Sakura, Finetechnical Co, Tokyo, Japan) e imediatamente mergulhadas em isopentano -70°C e armazenadas a -80°C até o processamento. Fragmentos de 5µm de espessura de cada amostra foram obtidos no Micrótomo criostato, colocados em lâminas silanizadas (*Micro Slides*, VWR Scientific, West Chester, PA) e fixados com acetona (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 4°C por 10 minutos. Os cortes foram armazenados a -80°C. As amostras de tecido miocárdico (CCC n=14; CNI n=8 e N n=6) também foram fixadas em formalina e inclusas em parafina pelo serviço de Anatomia e Patologia do InCor – HC/FMUSP, onde foram realizadas as análises histopatológicas pelo Dr. Luiz Benvenuti.

3.5.2 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA

Para certificarmos da qualidade e preservação do tecido, um fragmento de cada corte obtido em criostato foi submetido à coloração histológica por hematoxilina (Merck, Darmstadt, Alemanha) e eosina (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, BR). Os cortes foram submetidos a três banhos de água corrente por 5 minutos cada e corados com hematoxilina

durante 15 segundos. Em seguida, as lâminas foram submetidas a um banho de água corrente por 15 minutos e, então, corados com eosina durante 40 segundos. Posteriormente, foi realizada desidratação por passagens em uma seqüência de banhos em álcool (Synth, Merck, Darmstadt, Alemanha) 70%, 80%, 85% e três banhos com álcool 95%. Em seguida, foram realizados três passagens em xilol (Synth, Merck, Darmstadt, Alemanha) para diafanização, e finalmente, as lâminas foram montadas com *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.5.3 REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

As imunofluorescências diretas para os marcadores CD3, CD4, CD8, CCR5, CXCR3, CCR4, CCL5/RANTES e CXCL9/Mig foram realizadas utilizando cortes com 5µm de espessura em lâminas silanizadas (Micro Slides, VWR Scientific, West Chester, PA). Os anticorpos e suas especificações estão mostrados na Tabela 3. Todos os anticorpos foram previamente titulados.

Tabela 3. Especificações dos anticorpos utilizados no ensaio de imunofluorescência com microscopia confocal

| Anticorpos | Fluorocromo | Especificações/Isotipo | Diluição |
|---|-------------|-----------------------------|----------|
| CD3 (Caltag, Burlingame, CA) | PE | camundongo anti-humano IgG1 | 1:40 |
| CD4 (Caltag, Burlingame, CA) | PE | camundongo anti-humano IgG1 | 1:40 |
| CD8 (Caltag, Burlingame, CA) | PE | camundongo anti-humano IgG1 | 1:40 |
| CCR5 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) | PE | camundongo anti-humano IgG1 | 1:40 |
| CXCR3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) | PE | camundongo anti-humano IgG1 | 1:40 |
| CCR4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) | N/C | camundongo anti-humano IgG1 | 1:40 |
| CCL5/RANTES (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) | N/C | camundongo anti-humano IgG1 | 1:40 |
| CXCL9/Mig (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) | N/C | camundongo anti-humano IgG1 | 1:40 |
| CI (Pharmingen-BD, San Jose, CA) | PE | camundongo anti-humano IgG1 | 1:40 |
| Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) | — | cabra anti-camundongo IgG | 1:200 |
| Alexa 546 (Molecular Probes, Eugene, OR) | — | cabra anti-camundongo IgG | 1:200 |
| Alexa 633 (Molecular Probes, Eugene, OR) | — | cabra anti-camundongo IgG | 1:200 |

PE (Ficoeritrina); CI (controle de isotipo); N/C (anticorpos monoclonais não conjugados a fluorocromo); “—” (anticorpo secundário marcado com fluorocromo).

As reações de imunofluorescência foram feitas com cortes armazenados a -80°C, utilizando uma metodologia adaptada de Barbosa et al. (1999). Os cortes foram submetidos a uma seqüência de cinco banhos de três minutos em PBS (tampão salina fosfato). Para reduzir as marcações inespecíficas, os cortes foram incubados com PBS/BSA 2% (BSA, soro albumina bovina) durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados os anticorpos monoclonais diluídos em PBS/BSA 2%. Os cortes foram incubados por aproximadamente 15 horas a 4°C. Posteriormente, foram realizados cinco banhos de três minutos em PBS, e as lâminas foram secas. Foram adicionados, então, os anticorpos secundários, e nos casos em que os anticorpos primários que já apresentavam fluorocromo conjugado foram adicionados anticorpos secundários com o mesmo fluorocromo, amplificando assim a fluorescência. Após 45 minutos de incubação, foram realizados cinco banhos de três minutos, e secagem das lâminas. Posteriormente, os cortes foram incubados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride – SIGMA-Aldrich, Steinheim, Alemanha) 1:400 em PBS/BSA 2% durante 40 minutos e foi realizada uma nova etapa de cinco banhos de três minutos em PBS. As lâminas foram montadas com Hydromount (National Diagnostics, Atlanta, GA, U.S.A) e armazenadas a 4°C, protegidas da luz por, no máximo, 72 horas, até que fosse realizada a aquisição das imagens no Microscópio Confocal a laser Zeiss LSM 510 Meta/UV. Em lâminas separadas para cada paciente, foram realizados três tipos de controles negativos: a) cortes somente com DAPI, b) cortes incubados com anticorpos IgG não específicos marcados com FITC ou PE (controle de

isotipo - CTL) e com anticorpos secundários com o mesmo fluoróforo e c) cortes incubados somente com os anticorpos secundários, para descartar a marcação inespecífica. Fragmentos de tecido linfóide foram utilizados como controles positivos da reação, onde foram observadas células mononucleares positivas para os marcadores CD3, CD4, CD8, CCR5 e CXCR3 (Figura 5) e células positivas para CCR4, CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10 (Figura 6).

3.5.4 MICROSCOPIA CONFOCAL

As imagens foram obtidas por microscopia confocal (Bio-Rad MRC 1024 laser scanning confocal) utilizando o programa Lasersharpe 3.0 acoplado a um Microscópio Confocal Zeiss LSM 510 Meta/UV, com objetiva de imersão em óleo (63X). O laser Enterprise (351 e 364nm), e os lasers Argônio (458, 477, 488, e 514 nm), Hélio-Neônio (543 nm) e Hélio-Neônio (633 nm) foram usados para excitar as preparações através das linhas de 363nm, 488nm, 546nm ou 633nm. A luz emitida foi selecionada utilizando filtros 522/35 para FITC ou DAPI; 598/40 para PE e 633 para Alexa633). Para visualizar as imagens de campo claro utilizamos os filtros 598/40 ou 633 dependendo do filtro utilizado para a visualização do fluorocromo conjugado ao anticorpo utilizado.

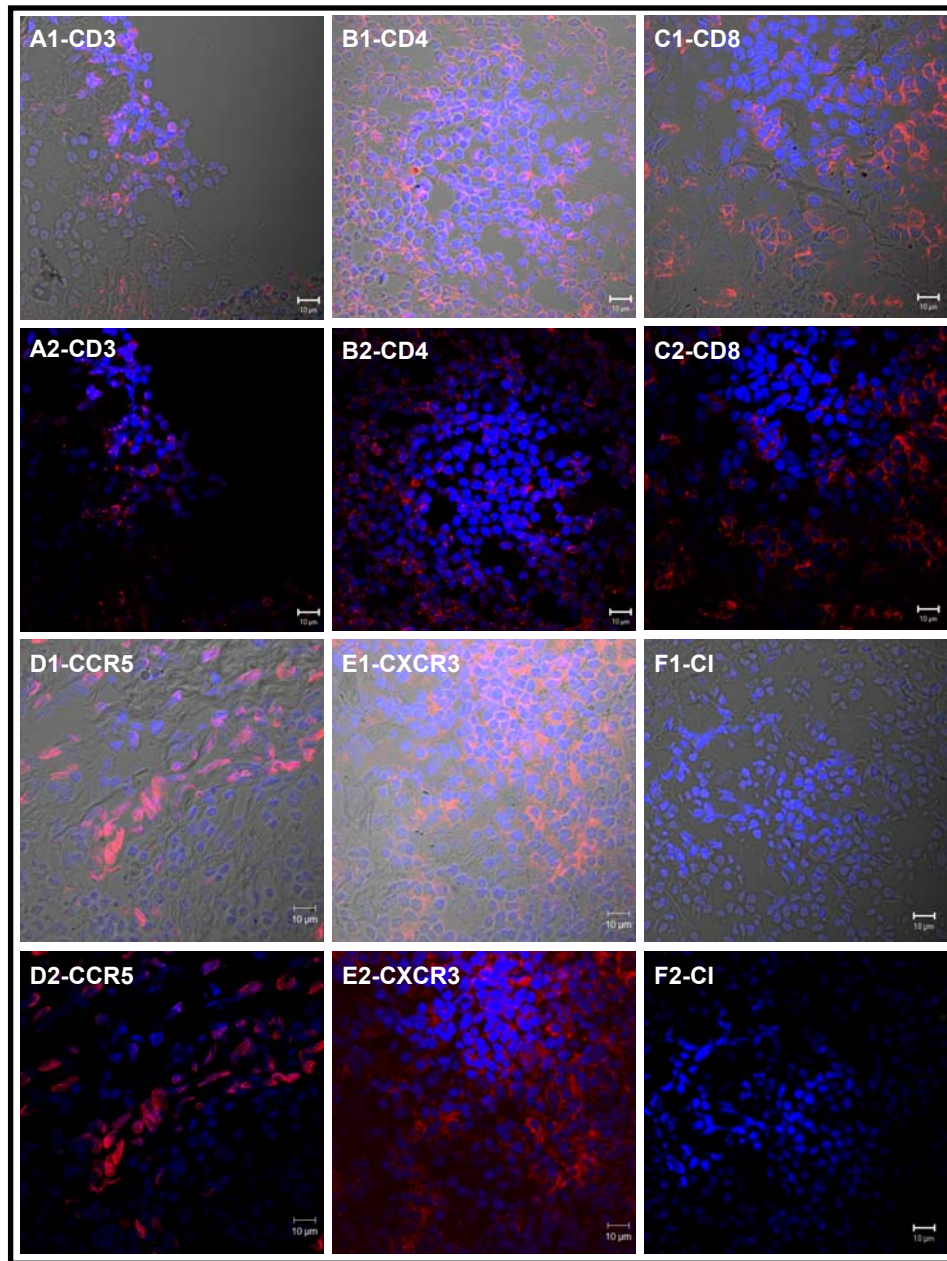


Figura 5: Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CCR5⁺ ou CXCR3⁺ em tecido linfóide. Cortes de tecido linfóide corados com anti-CD3 (A1 e A2), anti-CD4 (B1 e B2), anti-CD8 (C1 e C2), anti-CCR5 (D1 e D2), anti-CXCR3 (E1 e E2) e anti-IgG não específica (F1 e F2). Os fragmentos de tecido linfóide foram utilizados como controle positivo para titulação dos anticorpos. Os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CCR5, anti-CXCR3 e anti-IgG são conjugados com PE e o sinal foi amplificado com o uso de anticorpos secundários conjugados com Alexa 546 (vermelho). Os cortes foram também corados com DAPI. Nas imagens de campo claro (A1, B1, C1, D1, E1 e F1) podemos visualizar o tecido e verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente; nas imagens de campo escuro (A2, B2, C2, D2, E2 e F2) são visualizadas apenas as células positivas para os marcadores (vermelho) e a coloração dos núcleos com DAPI (azul).

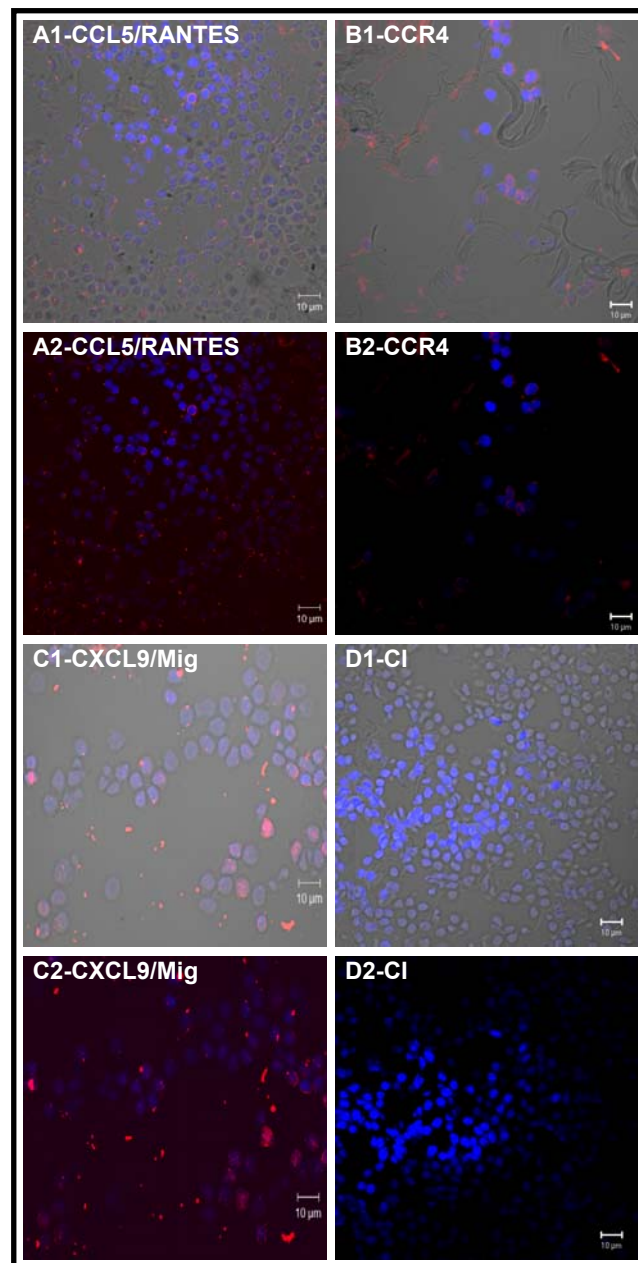


Figura 6: Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CCL5/RANTES+, CCR4+ e CXCL9/Mig+ em tecido linfóide. Cortes de tecido linfóide corados com anti-CCL5/RANTES (A1 e A2), anti-CCR4 (B1 e B2), anti-CXCL9/Mig⁺ (C1 e C2) e anti-IgG não específica (D1 e D2). Os fragmentos de tecido linfóide foram utilizados como controle positivo para titulação dos anticorpos. Os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CCR5, anti-CXCR3 e anti-IgG são conjugados com PE e o sinal foi amplificado com o uso de anticorpos secundários conjugados com Alexa 546 (vermelho). Os cortes foram também corados com DAPI. Nas imagens de campo claro (A1, B1, C1, D1, E1 e F1) podemos visualizar o tecido e verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente; nas imagens de campo escuro (A2, B2, C2, D2, E2 e F2) são visualizadas apenas as células positivas para os marcadores (vermelho) e a coloração dos núcleos com DAPI (azul).

3.5.5 ANÁLISE DAS IMAGENS

O processamento e análise das imagens foram realizados utilizando os programas Laserssharp (Bio-Rad), Confocal Assistant e *ImageTool*® 2.03. Foram capturados seis campos para cada lâmina, utilizando-se comprimentos de onda específicos para fluorocromo e DAPI. A análise da expressão de cada marcador baseou-se na identificação de cada fluorescência FITC/Alexa488, PE/Alexa546 ou Alexa633 nas células presentes no tecido miocárdico, utilizando programa específico (*ImageTool*® 2.03). Para todas as amostras foram obtidas imagens de campo escuro e claro. Nas imagens de campo escuro são visualizadas as marcações fluorescentes, sendo a imagem utilizada na análise. As dúvidas quanto à marcação de uma determinada célula foram resolvidas com o aumento da imagem ou com a imagem de campo claro, na qual se visualiza o tecido e se pode verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente. A marcação com DAPI facilita a identificação das células por formar complexos fluorescentes com as fitas duplas de DNA no núcleo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo teste U não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre duas amostras independentes, amostras provenientes de pacientes com CCC e amostras provenientes de pacientes com CNI, utilizando o programa Graphpad Prism versão 4.0. Nos

experimentos de qRT-PCR consideramos todo o valor de $QR \geq 2$ (genes regulados positivamente) ou $QR \leq 0,5$ (genes regulados negativamente) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis. As correlações foram feitas com o teste de Spearman r , utilizando o programa SPSS. A concordância observada entre a expressão dos genes estudados e os diferentes fragmentos de amostras de miocárdio de pacientes com CCC foi calculada pelo teste estatístico denominado índice Kappa. Valores de índice kappa entre 0,81-1,00 indicam concordância perfeita e os valores entre 0,41-0,80 concordância moderada, utilizamos o site <http://www.dmi.columbia.edu/homepages/chuangj/kappa/> para realizar estas análises.

4. RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS *IL-1B*, *IL-6*, *IL-12*, *IL-18* E *IL-23*, DAS CITOCINAS ANTIINFLAMATÓRIAS *IL-4* E *IL-13*, DA CITOCINA REGULATÓRIA *TGF-B*, DA QUIMIOCINA *CXCL8/IL-8* E DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *FOXP3* NO TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM CCC E DE PACIENTES COM CNI

Citocinas e quimiocinas são importantes mediadores que podem estimular ou inibir a resposta inflamatória. Por essa razão, investigamos a expressão gênica de citocinas e quimiocinas em amostras de miocárdio de pacientes com CCC ou CNI.

A Figura 7 mostra os níveis de expressão de RNAm de citocinas e quimiocinas no miocárdio de pacientes com CCC e de pacientes com CNI. Pode-se observar que a expressão de *IL-18* está significativamente aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparamos com a expressão em amostras de miocárdio de pacientes com CNI ($p=0,01$; Figura 7A; Tabela 4). Contudo, não observamos diferença estatisticamente significativa na expressão gênica das citocinas *IL-6*, *IL-12p35* e da quimiocina *CXCL8/IL-8* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparada com amostras de miocárdio de pacientes com CNI (Figura 7 B-D). Observamos também que, em um número significativo das amostras de ambos os grupos, a expressão dos genes de *IL-6* e *CXCL8/IL-8* é regulada negativamente em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis (Tabela 4). A expressão da cadeia *p40* de *IL-12*,

bem como a expressão de *IL-1 β* , *IL-23* e *IL-4* não foi detectada em nenhuma amostra de miocárdio (CCC, CNI e doadores saudáveis; Tabela 4).

Quanto à expressão gênica da citocina antiinflamatória *IL-13* e da citocina regulatória *TGF- β* , não observamos diferença estatística quando comparamos a expressão em amostras de miocárdio de pacientes com CCC com amostras de miocárdio de pacientes com CNI, e estas não se mostraram aumentadas em relação aos controles (Figura 7 E e F, Tabela 4). Entretanto, observamos que a expressão de *IL-18* é significativamente aumentada em relação a expressão da citocina antiinflamatória *IL-13* e da citocina regulatória *TGF- β* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC ($p=0,02$ e $p= 0,0002$, respectivamente), corroborando o predomínio de um perfil Th1 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (Figura 8A).

A expressão gênica do fator de transcrição *Foxp3* não foi detectada em amostras de miocárdio de doadores saudáveis, dessa forma a expressão relativa desse fator de transcrição não pôde ter seu QR calculado. Entretanto, observando os valores do ΔCt de cada amostra, a mediana de *Foxp3* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC foi semelhante à encontrada em amostras de miocárdio de pacientes com CNI (Figura 8B).

Em conjunto, os resultados sugerem que dentre os mediadores inflamatórios e o fator transcripcional aqui estudados, observamos expressão diferencial consistente apenas de *IL-18* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC.

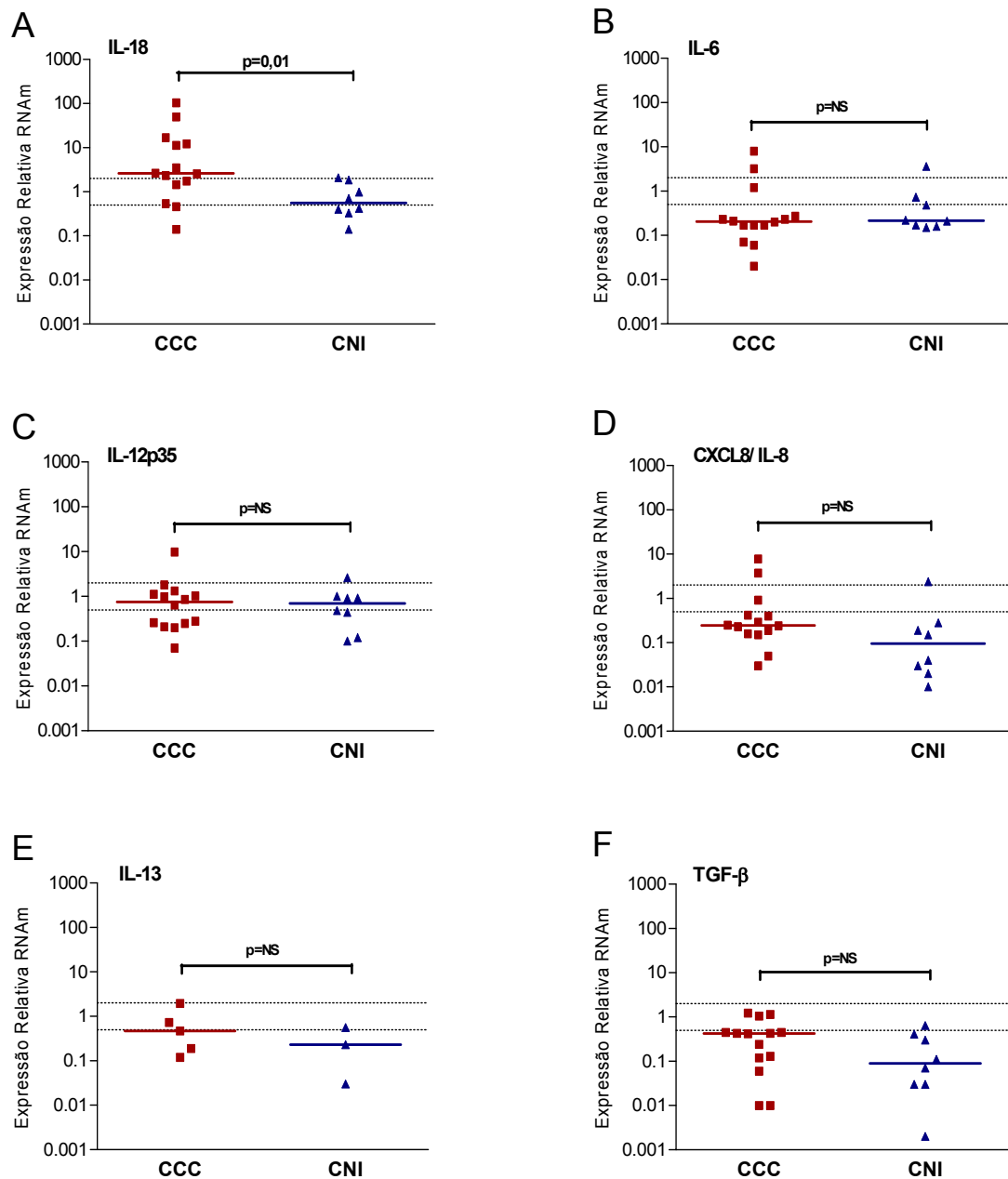


Figura 7. Expressão relativa de *IL-18*, *IL-6*, *IL-12p35*, *CXCL8/IL-8*, *IL-13* e *TGF-β* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e pacientes com CNI. Valores de expressão relativa para o gene de *IL-18* (A), *IL-6* (B), *IL-12p35* (C), *CXCL8/IL-8* (D), *IL-13* (E) e *TGF-β* (F). Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR. Os valores de QR foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizados pelo gene de referência, *GAPDH*, e expressos em relação às amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de doadores saudáveis (n=6). As barras horizontais representam as medianas de cada grupo; linhas pontilhadas representam valores de QR ≥ 2 (regulados positivamente) e QR $\leq 0,5$ (regulados negativamente) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Foram utilizadas amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de 14 pacientes com CCC (quadrados) e de 8 pacientes com CNI (triângulos). Em 9 amostras de pacientes com CCC e 4 de CNI não foi detectada a expressão de *IL-13*. Valor de p bicaudal obtido pelo teste não-paramétrico U de Mann-Whitney. “NS” - não significativo.

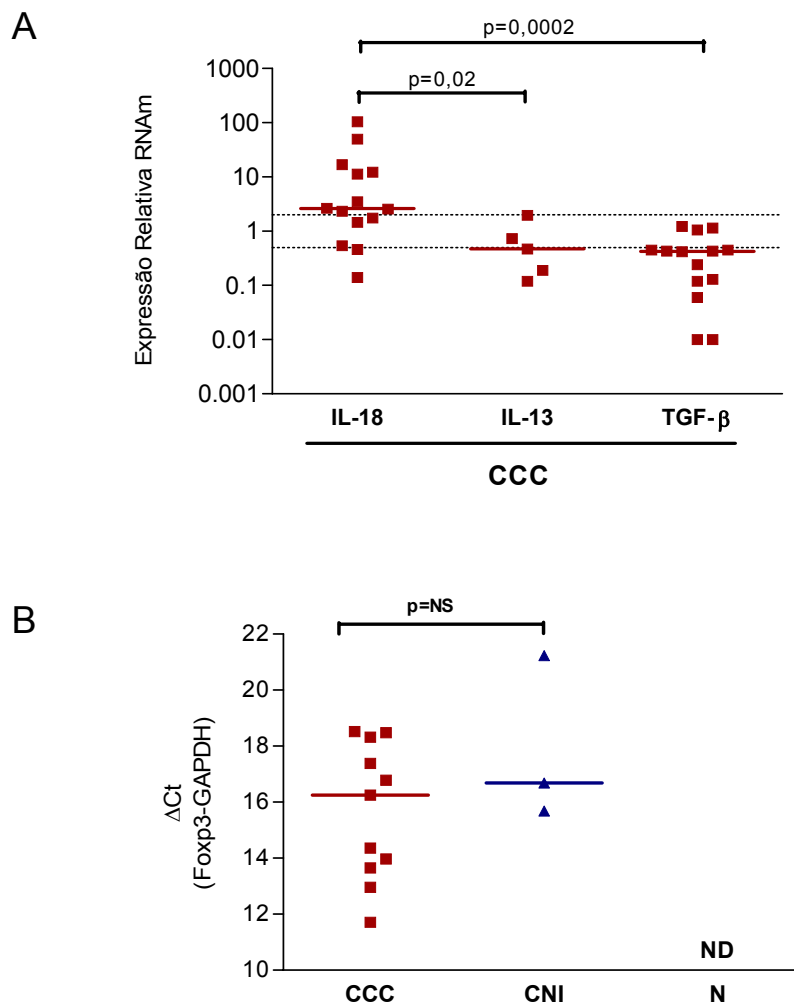


Figura 8. Comparação da expressão relativa dos mediadores *IL-18*, *IL-13* e *TGF- β* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. Valores de ΔCt de *Foxp3*. A. Valores de expressão relativa para *IL-18*, *IL-13* e *TGF- β* em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=14; quadrados) e de pacientes com CNI (n=8; triângulos). Análise da quantificação relativa (QR) por RT-PCR. Os valores de QR foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência, *GAPDH*, e expressos em relação a amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de doadores saudáveis (controles normais; n=6). As barras horizontais representam a mediana de cada grupo; linhas pontilhadas representam valores de $QR \geq 2$ (regulados positivamente) e $QR \leq 0,5$ (regulados negativamente) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Em 9 amostras de pacientes com CCC não foi detectada a expressão de *IL-13*. Valores de p bicaudais obtidos pelo teste não-paramétrico U de Mann-Whitney. B. Valores de ΔCt que representam a diferença dentro de cada amostra entre a média de Ct do gene *Foxp3* e a média de Ct do gene *GAPDH*; quanto menor o valor de ΔCt maior é a quantidade de RNAm do gene alvo presente na amostra. As barras horizontais representam as medianas de cada grupo. Nas amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de doadores saudáveis (N; n=6). Em três amostras de miocárdio de paciente com CCC e em dez amostras de pacientes com CNI não foi detectado Ct para *Foxp3*. “ND” – não detectado. “NS” – não significativo.

Tabela 4. Valores individuais de QR para os genes de *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12p35*, *IL-12p40*, *IL-18*, *IL-23*, *CXCL8/IL-8*, *IL-4*, *IL-13*, *TGF- β* e *Foxp3*

| Amostras | <i>IL-1β</i> | <i>IL-6</i> | <i>IL-12p35</i> | <i>IL-12p40</i> | <i>IL-18</i> | <i>IL-23</i> | <i>CXCL8/IL-8</i> | <i>IL-4</i> | <i>IL-13</i> | <i>TGF-β</i> | <i>Foxp3</i> |
|----------------|-------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|-------------------|-------------|--------------|-------------------------------|--------------|
| CCC-1 | * | 0,17 | 0,20 | * | 1,75 | * | 0,16 | * | - | 0,01 | ** |
| CCC-2 | * | 0,17 | 1,03 | * | 0,14 | * | 0,29 | * | - | 0,43 | ** |
| CCC-3 | * | 0,06 | 0,26 | * | 2,64 | * | 0,05 | * | 0,19 | 0,06 | ** |
| CCC-4 | * | 0,23 | 0,21 | * | 2,34 | * | 0,19 | * | - | 0,12 | ** |
| CCC-5 | * | 7,99 | 9,81 | * | 104,10 | * | 7,80 | * | - | 0,42 | ** |
| CCC-6 | * | 3,21 | 0,64 | * | 0,54 | * | 3,75 | * | 0,73 | 0,24 | ** |
| CCC-7 | * | 0,23 | 0,25 | * | 12,28 | * | 0,92 | * | 0,12 | 0,13 | ** |
| CCC-8 | * | 0,07 | 0,07 | * | 16,93 | * | 0,25 | * | - | 0,01 | ** |
| CCC-9 | * | 0,02 | 1,33 | * | 0,46 | * | 0,24 | * | 0,47 | 0,45 | ** |
| CCC-10 | * | 0,27 | 0,86 | * | 11,35 | * | 0,40 | * | - | 1,22 | ** |
| CCC-11 | * | 1,19 | 1,81 | * | 1,46 | * | 0,42 | * | 1,97 | 1,14 | ** |
| CCC-12 | * | 0,21 | 0,98 | * | 49,71 | * | 0,23 | * | - | 1,05 | ** |
| CCC-13 | * | 0,17 | 0,28 | * | 3,50 | * | 0,03 | * | - | 0,45 | ** |
| CCC-14 | * | 0,20 | 1,11 | * | 2,57 | * | 0,15 | * | - | 0,43 | ** |
| Mediana | | 0,2 | 0,7 | | 2,6 | | 0,2 | | 0,5 | 0,4 | |
| CNI-1 | * | 0,16 | 0,48 | * | 2,07 | * | 0,28 | * | 0,23 | 0,11 | ** |
| CNI-2 | * | 0,48 | 2,62 | * | 0,14 | * | 0,19 | * | 0,56 | 0,30 | ** |
| CNI-3 | * | 3,59 | 0,92 | * | 0,42 | * | 2,38 | * | - | 0,07 | ** |
| CNI-4 | * | 0,17 | 0,91 | * | 0,70 | * | 0,01 | * | - | 0,002 | ** |
| CNI-5 | * | 0,15 | 1,00 | * | 0,98 | * | 0,02 | * | - | 0,03 | ** |
| CNI-6 | * | 0,22 | 0,44 | * | 0,40 | * | 0,04 | * | - | 0,03 | ** |
| CNI-7 | * | 0,21 | 0,10 | * | 0,33 | * | 0,03 | * | 0,03 | 0,41 | ** |
| CNI-8 | * | 0,73 | 0,12 | * | 1,86 | * | 0,15 | * | - | 0,64 | ** |
| Mediana | | 0,2 | 0,7 | | 0,6 | | 0,1 | | 0,4 | 0,1 | |

Valores de QR referentes as Figuras 7 e 8; em destaque, os valores de QR ≥ 2 vezes em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis; valor da mediana de cada gene estudado nos grupos CCC e CNI; “-” indica que na amostra não foi detectada a expressão do gene de *IL-13*; “*” indica que a expressão do gene não foi detectada na amostra e também não foi detectada em amostras de doadores saudáveis; “**” indica que o QR não pode ser calculado, pois não se detectou a expressão do gene em amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Os cálculos detalhados para a obtenção dos valores de QR são mostrados no item Anexos B.

4.2 EXPRESSÃO GÊNICA DE QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES ASSOCIADOS COM A MIGRAÇÃO DIFERENCIAL DE LINFÓCITOS Th1 E Th2 NO TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM CCC E PACIENTES COM CNI

Com o objetivo de identificar o perfil de mediadores inflamatórios associados com a migração diferencial de linfócitos e monócitos de padrão Th1 e Th2 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC ou CNI, avaliamos a expressão gênica dos receptores CCR5 e CXCR3, que são expressos por células do fenótipo Th1, e dos receptores CCR4 e CCR8 que são associados a linfócitos T do tipo Th2.

Os resultados mostram que a expressão do receptor *CCR5* e seus ligantes *CCL3/MIP-1 α* , *CCL4/MIP-1 β* e *CCL5/RANTES* está significativamente aumentada no grupo CCC quando comparada ao grupo CNI ($p=0,02$, $p=0,02$, $p=0,004$ e $p=0,0007$, respectivamente; Figura 9; Tabela 5). Adicionalmente, a expressão do receptor *CXCR3* e dos seus ligantes *CXCL9/Mig* e *CXCL10/IP-10* está significativamente aumentada em amostras de pacientes com CCC quando comparada ao grupo CNI ($p=0,01$, $p=0,0009$ e $p=0,0003$, respectivamente; Figura 10; Tabela 6).

Considerando as amostras de miocárdio de pacientes com CCC, observamos correlações positivas significativas entre os receptores e seus ligantes como *CXCL9/Mig* e *CXCR3* ($p=0,0001$, $r=0,881$), *CXCL10/IP-10* e *CXCR3* ($p=0,04$, $r=0,537$) bem como correlações entre ligantes como *CXCL9/Mig* e *CXCL10/IP-10* ($p=0,003$, $r=0,725$), *CXCL9/Mig* e *CCL5/RANTES* ($p=0,0001$, $r=0,859$), *CCL4/MIP-1 β* e *CXCL10/IP-10*

($p=0,003$, $r=0,736$), entre receptores e ligantes de famílias diferentes como *CXCR3* e *CCL5/RANTES* ($p=0,002$, $r=0,749$), *CCR5* e *CXCL9/Mig* ($p=0,008$, $r=0,679$), e entre receptores *CCR5* e *CXCR3* ($p=0,003$, $r=0,723$) (Figura 11).

Investigando os níveis de RNAm dos receptores *CCR4* e *CCR8*, e seus ligantes que são associados a linfócitos T do tipo Th2 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e pacientes com CNI, observamos que a expressão de *CCR4* e de seu ligante *CCL17/TARC* está significativamente aumentada em amostras de pacientes com CCC quando comparada ao grupo CNI ($p=0,01$ e $p=0,02$, respectivamente; Figura 12A, Tabela 7). Não há diferença estatisticamente significativa quando comparamos os níveis de expressão de *CCR8* entre o grupo CCC e o grupo CNI (Figura 12A, Tabela 7), contudo, a mediana de expressão de *CCR8* é regulada positivamente no grupo de pacientes com CCC em relação aos controles (Tabela 7).

A expressão de *CCL22/MDC*, ligante de *CCR4*, não foi detectada em amostras de miocárdio de doadores saudáveis, dessa forma a expressão relativa dessa quimiocina não pôde ter seu QR calculado (Figura 12B). A expressão de *CCL11-309*, ligante de *CCR8*, não foi detectada em nenhuma amostra de miocárdio dos grupos estudados (CCC, CNI e doadores saudáveis; Tabela 7). Não observamos correlações positivas entre os níveis de expressão gênica de receptores e ligantes associados ao perfil Th2 em amostras de pacientes CCC em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis (dados não mostrados).

Em conjunto, os resultados sugerem o predomínio de um perfil Th1 com maior expressão de *CXCR3* e *CCR5* no grupo de pacientes com CCC em relação ao grupo de pacientes com CNI. Entretanto, observamos que há também a expressão de alguns genes que codificam proteínas associadas ao perfil Th2, como o receptor *CCR4* e seu ligante *CCL17/TARC*.

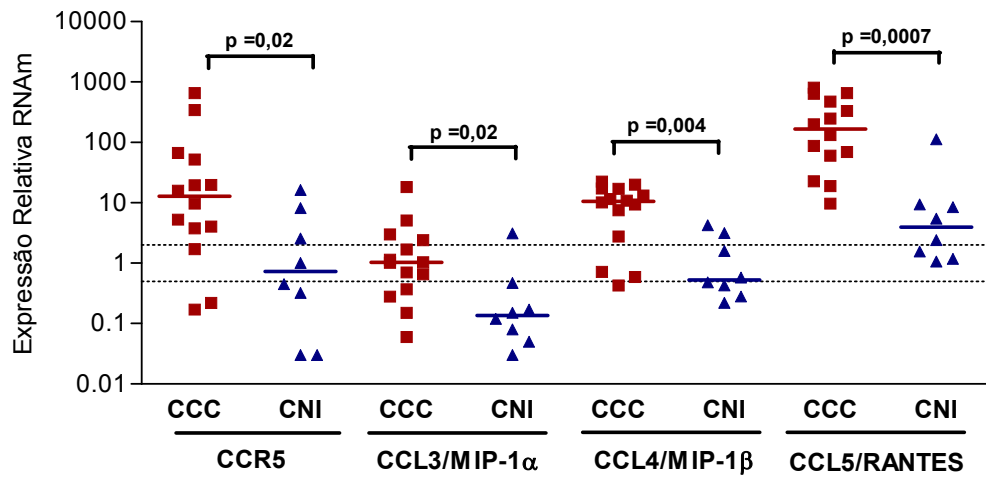


Figura 9. Expressão relativa do receptor *CCR5* e seus ligantes *CCL3/MIP-1α*, *CCL4/MIP-1β* e *CCL5/RANTES* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e pacientes com CNI. Valores de expressão relativa em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=14; quadrados) e pacientes com CNI (n=8; triângulos). Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR. Os valores de QR foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizados pelo gene de referência, *GAPDH*, e expressos em relação a amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de doadores saudáveis (controles normais; n=6). As barras horizontais representam as medianas de cada grupo; linhas pontilhadas representam valores de QR ≥ 2 (regulados positivamente) e QR $\leq 0,5$ (regulados negativamente) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Valores de p bicaudais obtidos pelo teste não-paramétrico U de Mann-Whitney.

Tabela 5. Valores individuais de QR para os genes de *CCR5*, *CCL3/MIP-1 α* , *CCL4/MIP-1 β* e *CCL5/RANTES*

| Amostras | <i>CCR5</i> | <i>CCL3/MIP-1α</i> | <i>CCL4/MIP-1β</i> | <i>CCL5/RANTES</i> |
|-----------------|--------------------|---|--|---------------------------|
| CCC-1 | 15,98 | 0,06 | 0,43 | 22,74 |
| CCC-2 | 3,76 | 0,15 | 0,59 | 69,28 |
| CCC-3 | 19,93 | 0,70 | 17,27 | 331,79 |
| CCC-4 | 9,68 | 0,28 | 7,51 | 87,98 |
| CCC-5 | 343,96 | 18,28 | 20,04 | 658,24 |
| CCC-6 | 0,17 | 1,14 | 10,15 | 133,05 |
| CCC-7 | 52,25 | 1,02 | 22,63 | 199,85 |
| CCC-8 | 67,42 | 0,66 | 10,88 | 250,52 |
| CCC-9 | 19,65 | 0,37 | 11,54 | 60,27 |
| CCC-10 | 1,70 | 2,99 | 17,03 | 808,33 |
| CCC-11 | 0,22 | 5,09 | 9,34 | 18,96 |
| CCC-12 | 655,65 | 2,40 | 2,78 | 641,72 |
| CCC-13 | 4,07 | 1,04 | 0,72 | 9,75 |
| CCC-14 | 5,27 | 1,68 | 13,26 | 473,58 |
| Mediana | 12,8 | 1,0 | 10,5 | 166,5 |
| CNI-1 | 16,27 | 0,08 | 0,43 | 8,50 |
| CNI-2 | 8,13 | 0,17 | 3,13 | 9,38 |
| CNI-3 | 0,45 | 0,12 | 1,60 | 5,48 |
| CNI-4 | 0,03 | 0,47 | 0,58 | 1,18 |
| CNI-5 | 0,03 | 3,10 | 0,22 | 1,56 |
| CNI-6 | 1,00 | 0,15 | 0,48 | 2,42 |
| CNI-7 | 2,57 | 0,03 | 0,28 | 1,06 |
| CNI-8 | 0,32 | 0,05 | 4,26 | 112,94 |
| Mediana | 0,7 | 0,1 | 0,5 | 3,9 |

Valores de QR referentes a Figura 9; em destaque, os valores de QR ≥ 2 vezes em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis; valor da mediana de cada gene estudado nos grupos CCC e CNI. Os cálculos detalhados para a obtenção dos valores de QR são apresentados no item Anexos B.

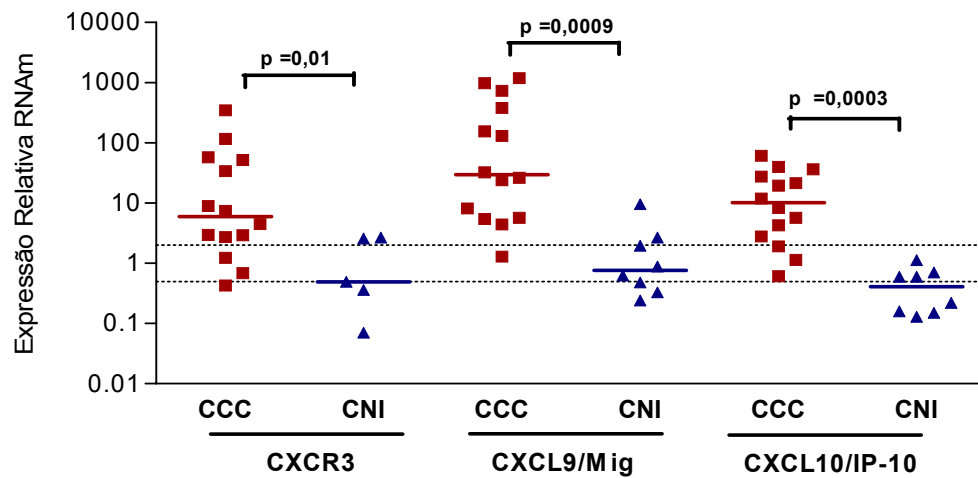


Figura 10. Expressão relativa do receptor *CXCR3* e seus ligantes *CXCL9/Mig* e *CXCL10/IP-10* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e pacientes com CNI. A. Valores de expressão relativa em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=14; quadrados) e pacientes com CNI (n=8; triângulos). Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR. Os valores de QR calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizados pelo gene de referência, *GAPDH*, e expressos em relação às amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de doadores saudáveis (controles normais; n=6). As barras horizontais representam a mediana de cada grupo; linhas pontilhadas representam valores QR ≥ 2 (regulados positivamente) e QR $\leq 0,5$ (regulados negativamente) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Em três amostras de pacientes com CNI não foi detectada a expressão de *CXCR3*. Valores de p bicaudais obtidos pelo teste não-paramétrico U de Mann-Whitney.

Tabela 6. Valores de QR individuais para os genes de *CXCR3*, *CXCL9/Mig* e *CXCL10/IP-10*

| Amostras | <i>CXCR3</i> | <i>CXCL9/Mig</i> | <i>CXCL10/IP-10</i> |
|----------------|--------------|------------------|---------------------|
| CCC-1 | 2,74 | 5,70 | 1,14 |
| CCC-2 | 0,69 | 4,46 | 1,92 |
| CCC-3 | 34,02 | 32,64 | 5,69 |
| CCC-4 | 2,92 | 24,22 | 2,81 |
| CCC-5 | 116,38 | 987,79 | 40,19 |
| CCC-6 | 2,98 | 26,52 | 19,50 |
| CCC-7 | 57,96 | 384,21 | 60,97 |
| CCC-8 | 51,91 | 734,73 | 36,67 |
| CCC-9 | 1,24 | 8,13 | 4,31 |
| CCC-10 | 7,45 | 130,64 | 27,68 |
| CCC-11 | 0,43 | 5,44 | 21,62 |
| CCC-12 | 348,49 | 1190,26 | 12,00 |
| CCC-13 | 4,47 | 1,30 | 0,61 |
| CCC-14 | 8,98 | 155,03 | 8,34 |
| Mediana | 6,0 | 29,6 | 10,2 |
| CNI-1 | 2,59 | 2,69 | 0,60 |
| CNI-2 | 0,49 | 0,89 | 0,60 |
| CNI-3 | - | 1,96 | 0,22 |
| CNI-4 | - | 0,48 | 1,13 |
| CNI-5 | - | 0,24 | 0,15 |
| CNI-6 | 0,07 | 0,63 | 0,16 |
| CNI-7 | 0,36 | 0,33 | 0,13 |
| CNI-8 | 2,67 | 9,63 | 0,70 |
| Mediana | 0,5 | 0,8 | 0,4 |

Valores referentes a Figura 10; em destaque, os valores de QR ≥ 2 vezes em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis; valor da mediana de cada gene estudado nos grupos CCC e CNI; “-” indica que na amostra não foi detectada a expressão do gene *CXCR3*. Os cálculos detalhados para a obtenção dos valores de QR são apresentados no item Anexos B.

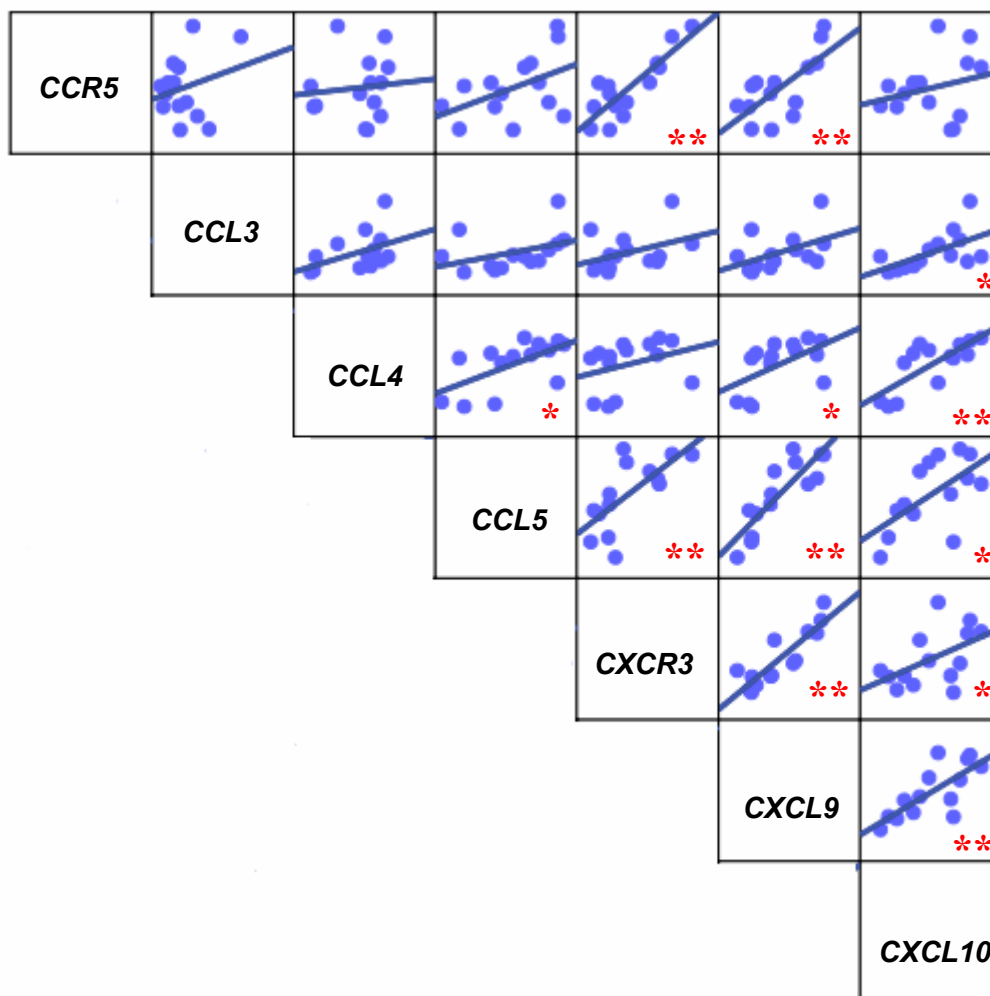


Figura 11. Correlação entre os níveis de expressão gênica de receptores e ligantes associados ao perfil Th1 em amostras de pacientes CCC. Correlações positivas entre os níveis de expressão gênica de receptores (CCR5 e CXCR3) e ligantes (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10) associados ao perfil Th1 em amostras de pacientes CCC (n=14) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis. **p<0,01 e *p<0,05, valores de p bicaudais obtidos pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman.

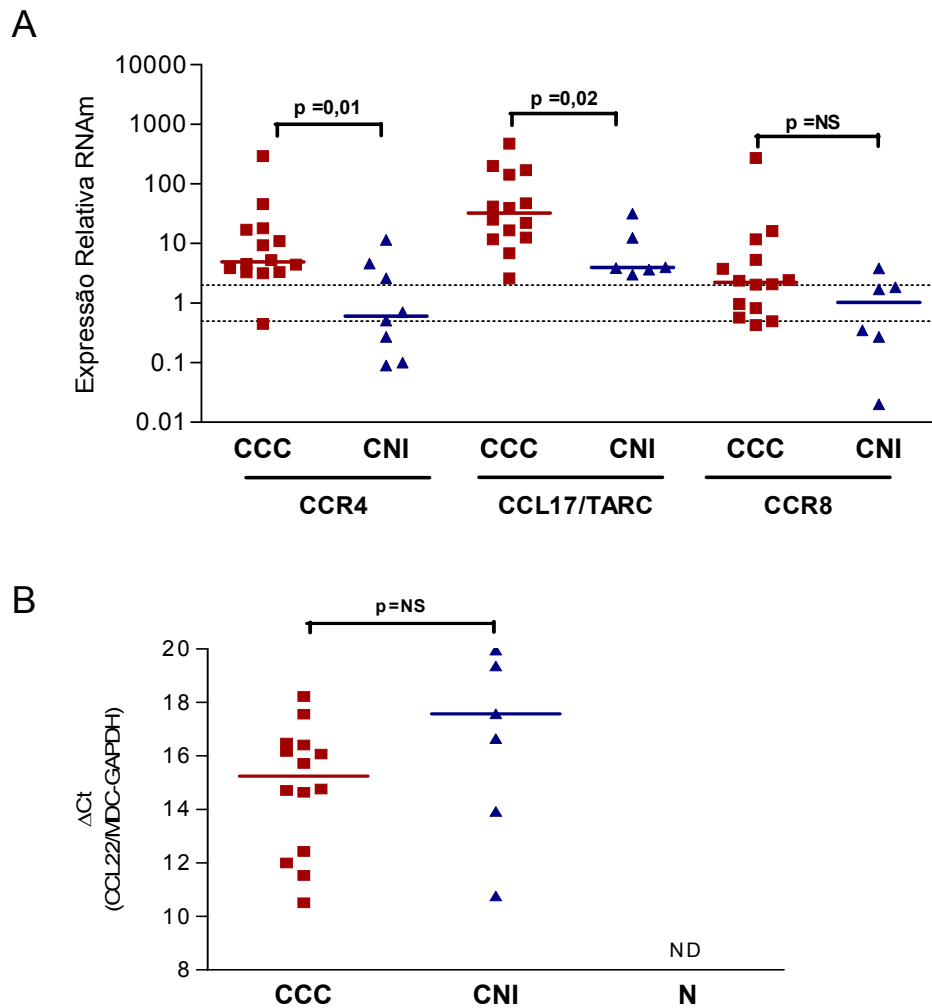


Figura 12. Expressão relativa dos receptores *CCR4* e *CCR8* e do ligante *CCL17/TARC*. Valores de ΔCt de *CCL22/MDC*. A. Valores de expressão relativa para os genes de *CCR4*, *CCL17/TARC* e *CCR8* em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=14; quadrados) e pacientes com CNI (n=8; triângulos). Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR. Os valores de QR foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência, *GAPDH*, e expressos em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis (controles normais; n=6). As barras horizontais representam a mediana de cada grupo; linhas pontilhadas representam valores QR ≥ 2 (regulados positivamente) e QR $\leq 0,5$ (regulados negativamente) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Em duas amostras de miocárdio de pacientes com CNI não foi detectada a expressão de *CCL17/TARC* e *CCR8*. Valores de p bicaudais obtidos pelo teste não-paramétrico U de Mann-Whitney. **B.** Valores de ΔCt que representam a diferença dentro de cada amostra entre a média de Ct do gene *CCL22/MDC* e a média de Ct do gene *GAPDH*; quanto menor o valor de ΔCt maior é a quantidade de RNAm do gene alvo presente na amostra. As barras horizontais representam as medianas de cada grupo. Nas amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de doadores saudáveis (N; n=6) e em duas amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de paciente com CNI não foi detectado Ct para *CCL22/MDC*. “ND” – não detectado. “NS” – não significativo.

Tabela 7. Valores de QR individuais para os genes de *CCR4*, *CCL17/TARC*, *CCL22/MDC*, *CCR8* e *CCL1/I-309*

| Amostras | <i>CCR4</i> | <i>CCL17/TARC</i> | <i>CCL22/MDC</i> | <i>CCR8</i> | <i>CCL1/I-309</i> |
|----------------|-------------|-------------------|------------------|-------------|-------------------|
| CCC-1 | 3,30 | 25,27 | ** | 2,38 | * |
| CCC-2 | 3,85 | 6,84 | ** | 3,77 | * |
| CCC-3 | 4,42 | 11,88 | ** | 2,05 | * |
| CCC-4 | 9,37 | 16,66 | ** | 2,08 | * |
| CCC-5 | 46,01 | 476,73 | ** | 11,78 | * |
| CCC-6 | 11,03 | 22,26 | ** | 5,36 | * |
| CCC-7 | 3,32 | 171,64 | ** | 0,50 | * |
| CCC-8 | 5,30 | 199,89 | ** | 0,83 | * |
| CCC-9 | 17,09 | 12,66 | ** | 16,33 | * |
| CCC-10 | 4,54 | 47,42 | ** | 0,43 | * |
| CCC-11 | 0,45 | 41,91 | ** | 0,57 | * |
| CCC-12 | 294,30 | 144,53 | ** | 272,91 | * |
| CCC-13 | 3,17 | 2,63 | ** | 2,45 | * |
| CCC-14 | 18,15 | 39,45 | ** | 0,97 | * |
| Mediana | 4,92 | 32,4 | | 2,2 | |
| CNI-1 | 2,63 | 31,95 | ** | 0,35 | * |
| CNI-2 | 11,57 | 12,45 | ** | 3,83 | * |
| CNI-3 | 0,27 | - | ** | - | * |
| CNI-4 | 0,09 | - | ** | - | * |
| CNI-5 | 0,10 | 3,88 | ** | 0,27 | * |
| CNI-6 | 0,51 | 3,66 | ** | 1,86 | * |
| CNI-7 | 0,70 | 3,01 | ** | 1,70 | * |
| CNI-8 | 4,61 | 4,01 | ** | 0,02 | * |
| Mediana | 0,6 | 3,9 | | 1,0 | |

Valores de QR referentes a Figura 12; em destaque, os valores de QR ≥ 2 vezes em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis; valor da mediana de cada gene estudado nos grupos CCC e CNI; “-” indica que na amostra não foi detectada a expressão do gene de interesse (*CCL17/TARC* e *CCR8*); “**” indica que o QR não pode ser calculado, pois não se detectou a expressão do gene em amostras de miocárdio de doadores saudáveis; “*” indica que a expressão do gene não foi detectada na amostra e também não foi detectada em amostras de doadores saudáveis. Os cálculos detalhados para a obtenção dos valores de QR são apresentados no item Anexos B.

4.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE *CCL19/ELC* E *CCL21/SLC*, LIGANTES DO RECEPTOR *CCR7* NO TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM CCC E NO TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM CNI

O receptor *CCR7* está envolvido com a migração de células T de memória e células T *naïve*. Nós avaliamos a expressão deste receptor e de seus ligantes, *CCL19/ELC* e *CCL21/SLC* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e de pacientes com CNI. Os resultados mostram que a expressão de *CCL19/ELC* está significativamente aumentada em amostras de pacientes com CCC ($p=0,01$) quando comparada ao grupo CNI (Figura 13A, Tabela 8). A mediana de expressão de *CCL21/SLC* é equivalente em ambos os grupos estudados, CCC e CNI (Figura 13A, Tabela 8).

A expressão de *CCR7* não foi detectada em amostras de miocárdio de doadores saudáveis, dessa forma a expressão relativa desse receptor não pôde ter seu QR calculado. Entretanto, observando os valores do ΔCt de cada amostra, a mediana do ΔCt de *CCR7* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC se apresenta menor que a encontrada em amostras de miocárdio de pacientes com CNI, e é estatisticamente diferente entre os grupos CCC e CNI ($p=0,01$; Figura 13B), sugerindo expressão aumentada entre as amostras de miocárdio de pacientes com CCC, consistente com o infiltrado inflamatório. Adicionalmente, observamos que entre as cinco amostras que apresentam os menores valores de ΔCt , e portanto maior expressão, para *CCR7*, estão as amostras CCC-7 e CCC-8, que apresentam

os maiores valores de QR para *CCL19/ELC* (Tabela 8). Não observamos correlações positivas entre os níveis de expressão gênica dos ligantes *CCL19/ELC* e *CCL21/SLC* associados a migração de células de memória em amostras de pacientes CCC em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis (dado não mostrado).

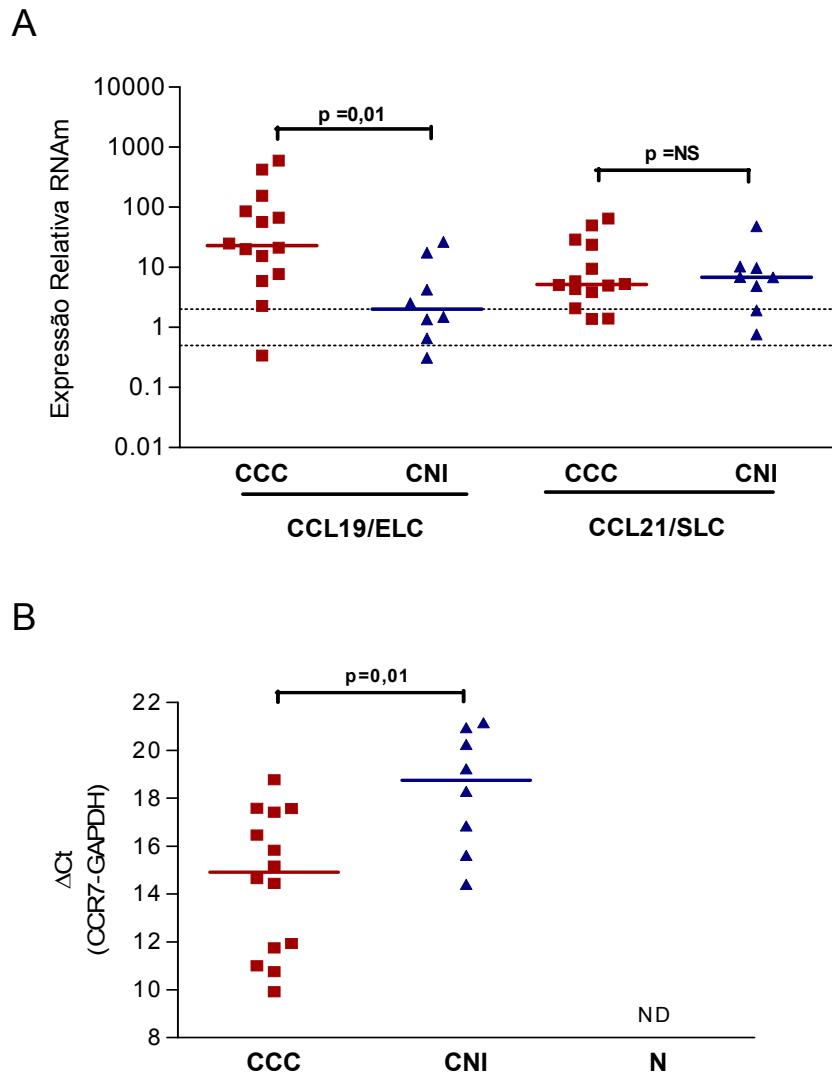


Figura 13. Expressão relativa de *CCL19/ELC* e *CCL21/SLC*. Valores de ΔCt de *CCR7*. A. Valores de expressão relativa para os genes de *CCL19/ELC* e *CCL21/SLC* em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=14; quadrados) e pacientes com CNI (n=8; triângulos). Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR. Os valores de QR foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência, *GAPDH*, e expressos em relação a amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de doadores saudáveis (controle normal; n=6). As barras horizontais representam a mediana de cada grupo; linhas pontilhadas representam valores de QR ≥ 2 (regulados positivamente) e Q $\leq 0,5$ (regulados negativamente) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis. B. Valores de ΔCt que representa a diferença dentro de cada amostra entre a média de Ct do gene *CCR7* e a média de Ct do gene *GAPDH*; quanto menor o valor de ΔCt maior é a quantidade de RNAm do gene alvo presente na amostra. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. Nas amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de doadores saudáveis (n=6) não foi detectado Ct para *CCR7*. “ND” – não detectado. “NS” – não significativo. Valor de p bicaudal obtido pelo teste não-paramétrico U de Mann-Whitney.

Tabela 8. Valores individuais de QR para os genes *CCL19/ELC* e *CCL21/SLC*, ligantes do receptor *CCR7*

| Amostras | <i>CCL19/ELC</i> | <i>CCL21/SLC</i> | <i>CCR7</i> |
|----------------|------------------|------------------|-------------|
| CCC-1 | 21,23 | 9,50 | ** |
| CCC-2 | 2,27 | 3,89 | ** |
| CCC-3 | 67,46 | 4,97 | ** |
| CCC-4 | 85,75 | 1,40 | ** |
| CCC-5 | 5,90 | 64,76 | ** |
| CCC-6 | 20,09 | 23,92 | ** |
| CCC-7 | 598,41 | 4,35 | ** |
| CCC-8 | 425,50 | 5,07 | ** |
| CCC-9 | 7,68 | 1,39 | ** |
| CCC-10 | 25,08 | 5,29 | ** |
| CCC-11 | 15,39 | 5,88 | ** |
| CCC-12 | 57,51 | 29,15 | ** |
| CCC-13 | 0,34 | 2,08 | ** |
| CCC-14 | 155,67 | 50,03 | ** |
| Mediana | 23,16 | 5,18 | |
| CNI-1 | 26,59 | 9,67 | ** |
| CNI-2 | 2,52 | 0,76 | ** |
| CNI-3 | 1,35 | 10,29 | ** |
| CNI-4 | 0,66 | 4,85 | ** |
| CNI-5 | 4,22 | 1,92 | ** |
| CNI-6 | 1,48 | 6,82 | ** |
| CNI-7 | 0,31 | 6,84 | ** |
| CNI-8 | 17,51 | 48,04 | ** |
| Mediana | 2,0 | 6,8 | |

Valores de QR referentes a Figura 13; em destaque, os valores de QR ≥ 2 vezes em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis; valor da mediana de cada gene estudado nos grupos CCC e CNI; “**” indica que o QR não pode ser calculado, pois não se detectou a expressão do gene em amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Os cálculos detalhados para a obtenção dos valores de QR são apresentados no item Anexos B.

4.4 EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM OS PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS: FATOR NATRIURÉTICO ATRIAL (ANF) E PEPTÍDEO NATRIURÉTICO CEREBRAL (BNP) NO TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM CCC E DE PACIENTES COM CNI

Para avaliar a indução de peptídeos natriuréticos, associados à hipertrofia e insuficiência cardíaca, avaliamos a expressão gênica dos peptídeos *ANF* e *BNP*.

Nossos resultados mostram que a mediana de expressão de *ANF* é oito vezes maior no grupo CCC quando comparada ao grupo CNI (Tabela 9). Contudo, a expressão de *ANF* não é estatisticamente diferente entre os grupos estudados ($p=0,14$; Figura 14A).

Em relação à expressão de *BNP*, observamos que sua mediana de expressão é três vezes maior no grupo de pacientes com CCC que no grupo de pacientes com CNI (Figura 14A), embora esta diferença também não seja estatisticamente significativa ($p=0,06$).

Considerando as amostras de miocárdio de pacientes com CCC, observamos correlações positivas significativas entre a expressão gênica de *ANF* e *BNP* ($p=0,0001$, $r=0,876$; Figura 14B).

A expressão gênica aumentada de *ANF* e *BNP* é provavelmente um indicador de hipertrofia em ambos os grupos estudados.

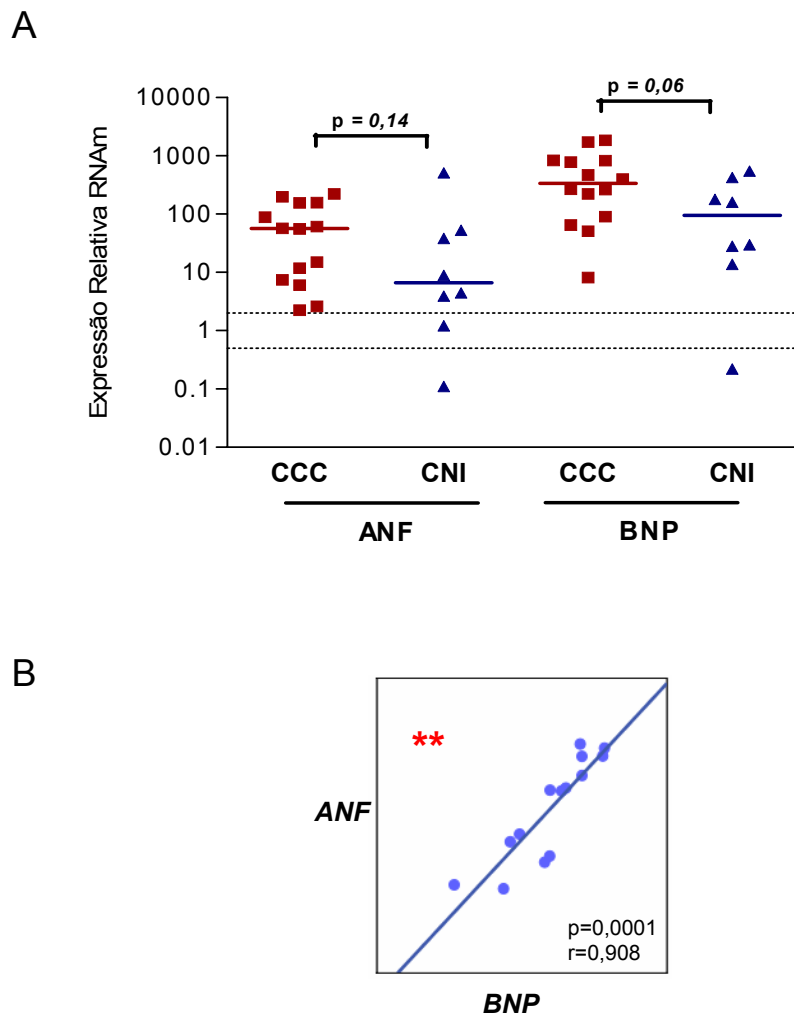


Figura 14. Expressão relativa de *ANF* e *BNP* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e pacientes com CNI. Correlação positiva entre os níveis de expressão gênica de *ANF* e *BNP* em amostras de pacientes CCC. A. Valores de expressão relativa para *ANF* e *BNP* em amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de pacientes com CCC (n=14; quadrados) e de pacientes com CNI (n=8; triângulos). Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR. Os valores de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizados pelo gene de referência, *GAPDH*, e expressos em relação a amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de doadores saudáveis (n=6). As barras horizontais representam a mediana de cada grupo; linhas pontilhadas representam valores de QR ≥ 2 (regulados positivamente) e QR $\leq 0,5$ (regulados negativamente) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Valores de p bicaudais obtidos pelo teste não-paramétrico U de Mann-Whitney. B. Correlação positiva entre os níveis de expressão gênica de *ANF* e *BNP* em amostras de pacientes CCC. Correlações positivas entre os níveis de expressão de *ANF* e *BNP* em amostras de pacientes CCC (n=14) em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis. **p<0,01, valor de p bicaudal obtido pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman.

Tabela 9. Valores individuais de QR para os genes de *ANF* e *BNP*

| Amostras | <i>ANF</i> | <i>BNP</i> |
|-----------------|-------------------|-------------------|
| CCC-1 | 6,04 | 221,55 |
| CCC-2 | 223,59 | 780,63 |
| CCC-3 | 2,24 | 51,19 |
| CCC-4 | 55,76 | 402,68 |
| CCC-5 | 60,99 | 468,80 |
| CCC-6 | 57,09 | 268,88 |
| CCC-7 | 15,05 | 90,88 |
| CCC-8 | 2,63 | 8,13 |
| CCC-9 | 155,28 | 828,20 |
| CCC-10 | 88,18 | 832,61 |
| CCC-11 | 11,81 | 64,98 |
| CCC-12 | 7,43 | 264,63 |
| CCC-13 | 157,12 | 1729,13 |
| CCC-14 | 198,55 | 1844,27 |
| Mediana | 56,4 | 335,8 |
| CNI-1 | 53,00 | 160,14 |
| CNI-2 | 510,01 | 425,25 |
| CNI-3 | 1,21 | 13,69 |
| CNI-4 | 4,44 | 29,85 |
| CNI-5 | 38,33 | 179,71 |
| CNI-6 | 3,93 | 28,13 |
| CNI-7 | 0,11 | 0,22 |
| CNI-8 | 8,89 | 546,28 |
| Mediana | 6,7 | 95,0 |

Valores de QR referentes a Figura 14; em destaque, os valores de QR ≥ 2 vezes em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis; valor da mediana de cada gene estudado nos grupos CCC e CNI. Os cálculos detalhados para a obtenção dos valores de QR são apresentados no item Anexos B.

4.5 CORRELAÇÕES ENTRE A EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO PERFIL Th1 E Th2 NO TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM CCC

Avaliando a expressão de genes associados ao perfil Th1 e Th2 observamos a expressão dos genes codificando ambos os perfis em amostras de miocárdio de pacientes com CCC.

Na Tabela 10 compilamos os dados das Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Observamos que as medianas de expressão gênica de citocinas, quimiocinas e receptores que codificam proteínas associadas com o perfil Th2, em amostras de pacientes com CCC são comparativamente inferiores aos observados para as citocinas, quimiocinas e receptores envolvidos com a quimiotaxia de células com perfil Th1, com exceção de *CCL17/TARC*.

Observamos também que os genes que codificam proteínas envolvidas em processos inflamatórios no miocárdio de pacientes com CCC se classificam em ordem decrescente de valores de mediana de expressão: *CCL5/RANTES*, *CCL17/TARC*, *CXCL9/Mig*, *CCL19/ELC*, *CCR5*, *CCL4/MIP-1 β* , *CXCL10/IP-10*, *CXCR3*, *CCL21/SLC*, *CCR4*, *IL-18* e *CCR8* (Tabela 10).

Adicionalmente, observamos correlações positivas significativas entre a expressão de genes que codificam proteínas associadas ao perfil Th1 e Th2 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. Consideramos somente a expressão de genes que apresentam valores de QR da mediana do grupo CCC $\geq 2x$ em relação a amostras de miocárdio de doadores

saudáveis (Tabela 10) e valor de p significativo ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) em relação ao grupo CNI (Figuras 7, 9, 10, 12 e 13).

Correlações positivas significativas em amostras de miocárdio de pacientes com CCC foram observadas entre a citocina *IL-18* e ligantes e receptores de quimiocinas de perfil Th1 como: *IL-18* e *CXCL9/Mig* ($p = 0,001$, $r = 0,771$), *IL-18* e *CXCL10/IP-10* ($p = 0,04$, $r = 0,556$), *IL-18* e *CCL5/RANTES* ($p = 0,01$, $r = 0,640$), *IL-18* e *CCR5* ($p = 0,008$, $r = 0,675$), *IL-18* e *CXCR3* ($p = 0,0001$, $r = 0,908$) (Figura 15). Adicionalmente encontramos correlação significativa também entre *IL-18* e *CCL17/TARC* ($p = 0,006$, $r = 0,692$), ligante de perfil Th2 (Figura 15). Observamos correlações positivas significativas ($p < 0,01$) entre um ligante associado ao perfil Th2 e ligantes associados ao perfil Th1 como: *CCL17/TARC* e *CXCL9/Mig* ($p = 0,001$, $r = 0,802$), *CCL17/TARC* e *CXCL10/IP-10*, ($p = 0,0001$, $r = 0,859$), *CCL17/TARC* e *CCL5/RANTES* ($p = 0,02$, $r = 0,596$), *CCL17/TARC* e *CXCR3* ($p = 0,02$, $r = 0,609$) (Figura 15).

A Tabela 11 sintetiza a expressão dos genes estudados em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. Comparando a expressão dos genes inflamatórios, constata-se que as medianas de expressão de todos os genes são maiores em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (Tabela 11) que em amostras de miocárdio de pacientes com CNI (Tabela 11).

Tabela 10. Valores individuais de QR de citocinas, quimiocinas, receptores e peptídeos natriuréticos em amostras de miocárdio de pacientes com CCC

| Genes | | Amostras | | | | | | | | | | | | | | % amostras QR≥2x/gene | Mediana QR |
|--|--------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------------------------|---------------|
| | | CCC-1 | CCC-2 | CCC-3 | CCC-4 | CCC-5 | CCC-6 | CCC-7 | CCC-8 | CCC-9 | CCC-10 | CCC-11 | CCC-12 | CCC-13 | CCC-14 | | |
| Citocinas pró-Th1 | IL-1β | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | | |
| | IL-6 | 0,17 | 0,17 | 0,06 | 0,23 | 7,99 | 3,21 | 0,23 | 0,07 | 0,02 | 0,27 | 1,19 | 0,21 | 0,17 | 0,20 | 14 | 0,2 |
| | IL-12p35 | 0,20 | 1,03 | 0,26 | 0,21 | 9,81 | 0,64 | 0,25 | 0,07 | 1,33 | 0,86 | 1,81 | 0,98 | 0,28 | 1,11 | 7 | 0,7 |
| | IL-12p40 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | | |
| | IL-18 | 1,75 | 0,14 | 2,64 | 2,34 | 104,10 | 0,54 | 12,28 | 16,93 | 0,46 | 11,35 | 1,46 | 49,71 | 3,50 | 2,57 | 64 | 2,6 |
| | IL-23 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | | |
| Citocinas pró-Th2 | IL-4 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | | |
| | IL-13 | - | - | 0,19 | - | - | 0,73 | 0,12 | - | 0,47 | - | 1,97 | - | - | - | | 0,5 |
| Citocina regulatória | TGF-β | 0,01 | 0,43 | 0,06 | 0,12 | 0,42 | 0,24 | 0,13 | 0,01 | 0,45 | 1,22 | 1,14 | 1,05 | 0,45 | 0,43 | | 0,4 |
| Fator de transcrição | Foxp3 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | | |
| Quimiocinas e Receptores Th1 | CCL3/MIP-1α | 0,06 | 0,15 | 0,70 | 0,28 | 18,28 | 1,14 | 1,02 | 0,66 | 0,37 | 2,99 | 5,09 | 2,40 | 1,04 | 1,68 | 29 | 1,0 |
| | CCL4/MIP-1β | 0,43 | 0,59 | 17,27 | 7,51 | 20,04 | 10,15 | 22,63 | 10,88 | 11,54 | 17,03 | 9,34 | 2,78 | 0,72 | 13,26 | 79 | 10,5 |
| | CCL5/RANTES | 22,74 | 69,28 | 331,79 | 87,98 | 658,24 | 133,05 | 199,85 | 250,52 | 60,27 | 808,33 | 18,96 | 641,72 | 9,75 | 473,58 | 100 | 166,5 |
| | CCR5 | 15,98 | 3,76 | 19,93 | 9,68 | 343,96 | 0,02 | 52,25 | 67,42 | 19,65 | 1,70 | 0,22 | 655,65 | 4,07 | 5,27 | 79 | 12,8 |
| | CXCL9/Mig | 5,70 | 4,46 | 32,64 | 24,22 | 987,79 | 26,52 | 384,21 | 734,73 | 8,13 | 130,64 | 5,44 | 1190,26 | 1,30 | 155,03 | 93 | 29,6 |
| | CXCL10/IP-10 | 1,14 | 1,92 | 5,69 | 2,81 | 40,19 | 19,50 | 60,97 | 36,67 | 4,31 | 27,68 | 21,62 | 12,00 | 0,61 | 8,34 | 79 | 10,2 |
| | CXCR3 | 2,74 | 0,69 | 34,02 | 2,92 | 116,38 | 2,98 | 57,96 | 51,91 | 1,24 | 7,45 | 0,43 | 348,49 | 4,47 | 8,98 | 79 | 6,0 |
| | CCL22/MDC | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | | |
| Quimiocinas e Receptores Th2 | CCL17/TARC | 25,27 | 6,84 | 11,88 | 16,66 | 476,73 | 22,26 | 171,64 | 199,89 | 12,66 | 47,42 | 41,91 | 144,53 | 2,63 | 39,45 | 100 | 32,4 |
| | CCR4 | 3,30 | 3,85 | 4,42 | 9,37 | 46,01 | 11,03 | 3,32 | 5,30 | 17,09 | 4,54 | 0,45 | 294,30 | 3,17 | 18,15 | 93 | 4,9 |
| | CCL1/I-309 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | | |
| | CCR8 | 2,38 | 3,77 | 2,05 | 2,08 | 11,78 | 5,36 | 0,50 | 0,83 | 16,33 | 0,43 | 0,57 | 272,91 | 2,45 | 0,97 | 64 | 2,2 |
| Quimiocinas e Receptores Memória | CCL19/ELC | 21,23 | 2,27 | 67,46 | 85,75 | 5,90 | 20,09 | 598,41 | 425,50 | 7,68 | 25,08 | 15,39 | 57,51 | 0,34 | 155,67 | 93 | 23,2 |
| | CCL21/SLC | 9,50 | 3,89 | 4,97 | 1,40 | 64,76 | 23,92 | 4,35 | 5,07 | 1,39 | 5,29 | 5,88 | 29,15 | 2,08 | 50,03 | 86 | 5,2 |
| | CCR7 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | | |
| Quimiocina | IL-8 | 0,16 | 0,29 | 0,05 | 0,19 | 7,80 | 3,75 | 0,92 | 0,25 | 0,24 | 0,40 | 0,42 | 0,23 | 0,03 | 0,15 | 14 | |
| Peptídeos Natriuréticos | ANF | 6,04 | 223,59 | 2,24 | 55,76 | 60,99 | 57,09 | 15,05 | 2,63 | 155,28 | 88,18 | 11,81 | 7,43 | 157,12 | 198,55 | 100 | 56,4 |
| | BNP | 221,55 | 780,63 | 51,19 | 402,68 | 468,80 | 268,88 | 90,88 | 8,13 | 828,20 | 832,61 | 64,98 | 264,63 | 1729,13 | 1844 | 100 | 335,8 |

Valores de QR referentes as Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9; em destaque, os valores de QR ≥ 2 vezes em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis; valor da mediana de cada gene; % amostras QR ≥ 2 vezes em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis; “-” indica que na amostra não foi detectado a expressão do gene de interesse; “*” indica que a expressão do gene não foi detectada na amostra e também não foi detectada em amostras de doadores saudáveis; “***” indica que o QR não pode ser calculado, pois não se detectou a expressão do gene em amostras de miocárdio de doadores saudáveis.

Tabela 11. Valores individuais de QR de citocinas, quimiocinas, receptores e peptídeos natriuréticos em amostras de miocárdio de pacientes com CNI

| | Genes | Amostras | | | | | | | | % amostras QR≥2x/gene | Mediana QR |
|--|---------------------|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|-------------|---------------|--------------------------|---------------|
| | | CNI-1 | CNI-2 | CNI-3 | CNI-4 | CNI-5 | CNI-6 | CNI-7 | CNI-8 | | |
| Citocinas pró-Th1 | <i>IL-1β</i> | * | * | * | * | * | * | * | * | | |
| | <i>IL-6</i> | 0,16 | 0,48 | 3,59 | 0,17 | 0,15 | 0,22 | 0,21 | 0,73 | 13 | 0,2 |
| | <i>IL-12p35</i> | 0,48 | 2,62 | 0,92 | 0,91 | 1,00 | 0,44 | 0,10 | 0,12 | 13 | 0,7 |
| | <i>IL-12p40</i> | * | * | * | * | * | * | * | * | | |
| | <i>IL-18</i> | 2,07 | 0,14 | 0,42 | 0,70 | 0,98 | 0,40 | 0,33 | 1,86 | 13 | 0,6 |
| Citocinas pró-Th2 | <i>IL-23</i> | * | * | * | * | * | * | * | * | | |
| | <i>IL-4</i> | * | * | * | * | * | * | * | * | | |
| Citocina regulatória Fator de transcrição | <i>IL-13</i> | 0,23 | 0,56 | - | - | - | - | 0,03 | - | | 0,2 |
| | <i>TGF-β</i> | 0,11 | 0,30 | 0,07 | 0,01 | 0,03 | 0,03 | 0,41 | 0,64 | | 0,1 |
| Quimiocinas e Receptores Th1 | <i>Foxp3</i> | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | | |
| | <i>CCL3/MIP-1α</i> | 0,08 | 0,17 | 0,12 | 0,47 | 3,10 | 0,15 | 0,03 | 0,05 | 13 | 0,1 |
| | <i>CCL4/MIP-1β</i> | 0,43 | 3,13 | 1,60 | 0,58 | 0,22 | 0,48 | 0,28 | 4,26 | 25 | 0,5 |
| | <i>CCL5/RANTES</i> | 8,50 | 9,38 | 5,48 | 1,18 | 1,56 | 2,42 | 1,06 | 112,94 | 63 | 4,0 |
| | <i>CCR5</i> | 16,27 | 8,13 | 0,45 | 0,03 | 0,03 | 1,00 | 2,57 | 0,32 | 38 | 0,7 |
| | <i>CXCL9/Mig</i> | 2,69 | 0,89 | 1,96 | 0,48 | 0,24 | 0,63 | 0,33 | 9,63 | 13 | 0,8 |
| | <i>CXCL10/IP-10</i> | 0,60 | 0,60 | 0,22 | 1,13 | 0,15 | 0,16 | 0,13 | 0,70 | | 0,4 |
| | <i>CXCR3</i> | 2,59 | 0,49 | - | - | - | 0,07 | 0,36 | 2,67 | 13 | 0,5 |
| Quimiocinas e Receptores Th2 | <i>CCL22/MDC</i> | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | | |
| | <i>CCL17/TARC</i> | 31,95 | 12,45 | - | - | 3,88 | 3,66 | 3,01 | 4,01 | 100 | 3,9 |
| | <i>CCR4</i> | 2,63 | 11,57 | 0,27 | 0,09 | 0,10 | 0,51 | 0,70 | 4,61 | 38 | 0,6 |
| | <i>CCL1/I-309</i> | * | * | * | * | * | * | * | * | | |
| Quimiocinas e Receptores Memória | <i>CCR8</i> | 0,35 | 3,83 | - | - | 0,27 | 1,86 | 1,70 | 0,02 | 13 | 1,0 |
| | <i>CCL19/ELC</i> | 26,59 | 2,52 | 1,35 | 0,66 | 4,22 | 1,48 | 0,31 | 17,51 | 50 | 2,0 |
| | <i>CCL21/SLC</i> | 9,67 | 0,76 | 10,29 | 4,85 | 1,92 | 6,82 | 6,84 | 48,04 | 38 | 6,8 |
| Quimiocina | <i>CCR7</i> | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | | |
| Peptídeos Natriuréticos | <i>IL-8</i> | 0,28 | 0,19 | 2,38 | 0,01 | 0,02 | 0,04 | 0,03 | 0,15 | | |
| | <i>ANF</i> | 53,00 | 510,01 | 1,21 | 4,44 | 38,33 | 3,93 | 0,11 | 8,89 | 75 | 6,7 |
| | <i>BNP</i> | 160,14 | 425,25 | 13,69 | 29,85 | 179,71 | 28,13 | 0,22 | 546,28 | 88 | 95,0 |

Valores de QR referentes as Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9; em destaque, os valores de QR ≥ 2 vezes em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis; valor da mediana de cada gene; % amostras QR ≥ 2 vezes em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis; “-” indica que na amostra não foi detectado a expressão do gene de interesse; “*” indica que a expressão do gene não foi detectada na amostra e também não foi detectada em amostras de doadores saudáveis; “**” indica que o QR não pode ser calculado, pois não se detectou a expressão do gene em amostras de miocárdio de doadores saudáveis.

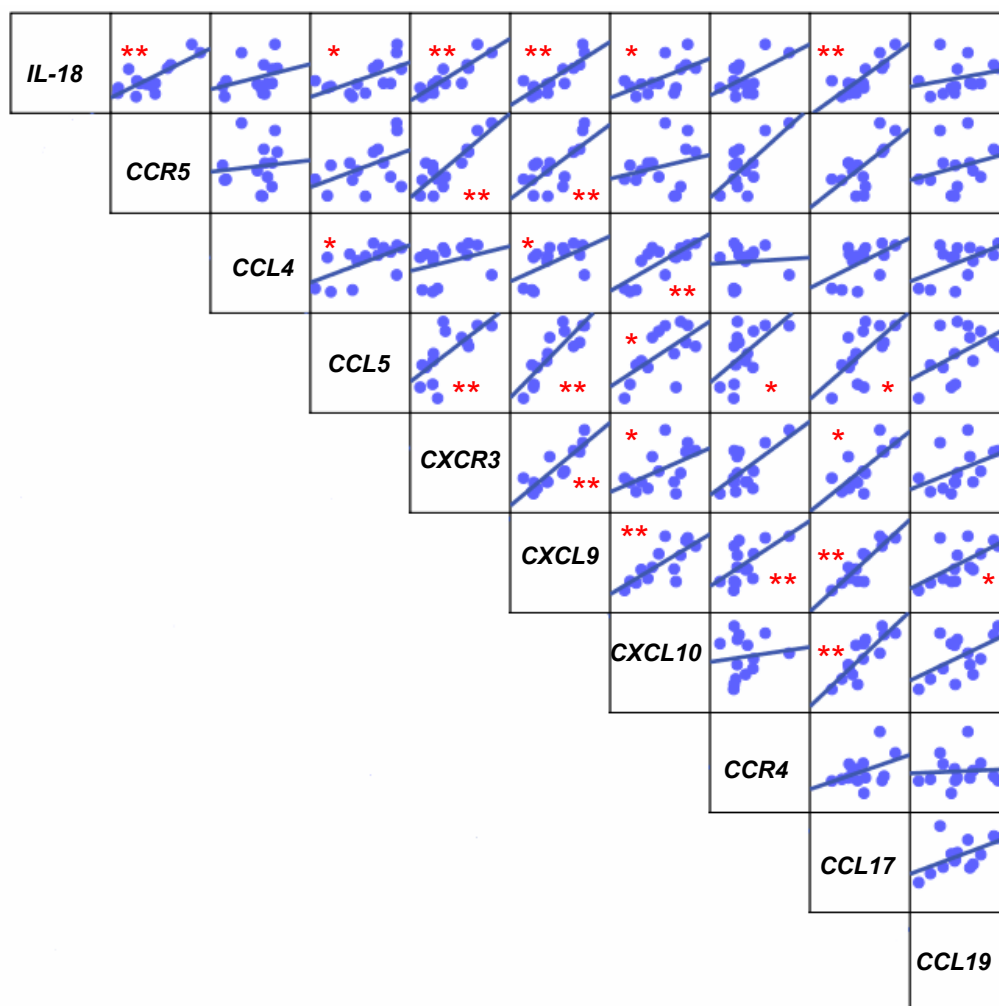


Figura 15. Correlação entre os níveis de expressão gênica em amostras de pacientes. Correlações positivas entre os níveis de expressão gênica de receptores e ligantes associados ao perfil Th1 e Th2 considerando somente a expressão de genes que apresentam valores de QR da mediana do grupo CCC $\geq 2x$ em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis e valor de p de significativo ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) em relação ao grupo CNI. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$, valores de p bicaudais obtidos pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman.

4.6 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA INDIVIDUAL EM AMOSTRAS DE MIOCÁRDIO DE DIVERSOS LOCAIS

Observando diferenças de magnitude de expressão gênica global de uma amostra para outra, questionamos se as diferenças se deviam à heterogeneidade do infiltrado, ou se representavam padrões de inflamação mantidos no indivíduo. Para tal, estudamos a expressão gênica em diferentes fragmentos de miocárdio (parede livre do ventrículo esquerdo) dos mesmos pacientes com CCC.

Na Tabela 12 estão representados vinte dos genes estudados e sete fragmentos oriundos de três amostras de miocárdio de pacientes com CCC, sendo obtidos: três fragmentos aleatórios de locais distantes da amostra identificada como CCC-7 e dois fragmentos de locais distantes das amostras CCC-9 e CCC-10. Observamos que dos 20 genes estudados (com valores de expressão) em múltiplas amostras de três pacientes, houve expressão concordante em 53 de 59 condições testadas (aumento ou redução da expressão de um dado gene em todos os fragmentos testados do mesmo indivíduo). Observamos que a expressão é consistente em cada paciente (Tabela 13), pois há concordância (medida pelo índice Kappa) e correlação positiva entre a expressão dos 20 genes estudados e os diferentes fragmentos de três amostras de pacientes com CCC.

Tabela 12. Valores de expressão gênica de diferentes fragmentos de três amostras de pacientes com CCC

| Genes | Amostras | | | | | | |
|---------------------|----------|---------|---------|--------|---------|--------|----------|
| | CCC-7 | CCC-7.1 | CCC-7.2 | CCC-9 | CCC-9.1 | CCC-10 | CCC-10.1 |
| <i>IL-6</i> | 0,23 | 0,07 | 0,07 | 0,02 | 0,14 | 0,27 | 0,50 |
| <i>IL-12p35</i> | 0,25 | 0,25 | 0,08 | 1,33 | 1,16 | 0,86 | 0,90 |
| <i>IL-18</i> | 12,28 | 4,50 | 6,49 | 0,46 | 0,48 | 11,35 | 19,19 |
| <i>IL-13</i> | 0,12 | 0,07 | 0,08 | 0,47 | 0,04 | - | - |
| <i>TGF-β</i> | 0,13 | 0,14 | 0,10 | 0,45 | 0,06 | 1,22 | 1,81 |
| <i>CCL3/MIP-1α</i> | 1,02 | 0,67 | 0,39 | 0,37 | 0,18 | 2,99 | 3,08 |
| <i>CCL4/MIP-1β</i> | 22,63 | 16,61 | 16,36 | 11,54 | 7,60 | 17,03 | 22,52 |
| <i>CCL5/RANTES</i> | 199,85 | 237,67 | 136,76 | 60,27 | 0,23 | 808,33 | 1405,27 |
| <i>CCR5</i> | 52,25 | 6,52 | 17,50 | 19,65 | 4,05 | 1,70 | 10,88 |
| <i>CXCL9/Mig</i> | 384,21 | 236,29 | 249,70 | 8,13 | 4,42 | 130,64 | 203,86 |
| <i>CXCL10/IP-10</i> | 60,97 | 35,66 | 23,59 | 4,31 | 1,66 | 27,67 | 24,36 |
| <i>CXCR3</i> | 57,96 | 33,54 | 31,58 | 1,24 | 3,22 | 7,45 | 7,53 |
| <i>CCL17/TARC</i> | 171,64 | 149,09 | 134,00 | 12,66 | 6,37 | 47,42 | 36,84 |
| <i>CCR4</i> | 3,32 | 4,00 | 4,14 | 17,09 | 2,08 | 4,54 | 10,84 |
| <i>CCR8</i> | 0,50 | 0,33 | 0,28 | 16,33 | 0,46 | 0,43 | 0,28 |
| <i>CCL19/ELC</i> | 598,41 | 118,96 | 140,07 | 7,68 | 4,17 | 25,08 | 60,09 |
| <i>CCL21/SLC</i> | 4,35 | 4,45 | 5,65 | 1,39 | 3,46 | 5,29 | 12,31 |
| <i>IL-8</i> | 0,92 | 0,29 | 0,23 | 0,24 | 0,27 | 0,40 | 0,92 |
| <i>ANF</i> | 15,05 | 43,94 | 27,39 | 155,28 | 8,56 | 88,18 | 153,42 |
| <i>BNP</i> | 90,88 | 235,81 | 121,00 | 828,20 | 78,64 | 832,61 | 756,83 |

Valores de QR de 20 genes em diferentes fragmentos de três amostras de pacientes com CCC; em destaque estão os valores de expressão gênica discrepantes entre diferentes fragmentos de miocárdio de uma amostra. “-” indica que na amostra não foi detectada a expressão do gene de *IL-13*.

Tabela 13. Correlação entre a expressão gênica de diferentes fragmentos de três amostras de pacientes com CCC

| Fragmentos | | Índice Kappa | p | r |
|------------|-------------|--------------|--------|-------|
| CCC-7 | vs CCC-7.1 | 1,00 | 0,0001 | 0,961 |
| CCC-7 | vs CCC-7.2 | 1,00 | 0,0001 | 0,976 |
| CCC-7.1 | vs CCC-7.2 | 1,00 | 0,0001 | 0,977 |
| CCC-9 | vs CCC-9.1 | 0,50 | 0,001 | 0,674 |
| CCC-10 | vs CCC-10.1 | 0,87 | 0,0001 | 0,967 |

Valores de QR dos 20 genes em diferentes fragmentos de três amostras de pacientes com CCC referentes a Tabela 12 foram correlacionados e a concordância foi calculada pelo teste estatístico índice Kappa. Valores de índice kappa entre 0,81-1,00 indicam concordância perfeita e os valores entre 0,41-0,80 concordância moderada. Valores de p bicaudais obtidos pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman.

4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM CCC E DE PACIENTES COM CNI

Com o objetivo de correlacionar os dados de expressão gênica com as alterações morfológicas e inflamatórias, realizamos análises histopatológicas do tecido cardíaco de pacientes com CCC e de pacientes com CNI.

As análises histopatológicas de amostras de miocárdio corados com hematoxilina e eosina demonstraram presença de infiltrado inflamatório de grau moderado a intenso em amostras de pacientes com CCC, e ausência em amostras de miocárdio de pacientes com CNI e doadores saudáveis (Tabela 14, Figura 16A). Fibrose e hipertrofia de cardiomiócitos foi observada em ambos os grupos CCC e CNI (Tabela 14).

Considerando somente a expressão de genes que estão aumentados significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC em relação ao grupo CNI, e com valores de $QR \geq 2x$ em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis, realizamos correlações entre a expressão desses genes e a intensidade de miocardite em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. Observamos que os genes que apresentam correlações positivas com a intensidade de miocardite são: CXCL9/Mig ($p=0,008$, $r=0,678$), CXCL10/IP-10 ($p=0,014$, $r=0,640$), CCR4 ($p=0,049$, $r=0,534$), CCL17/TARC ($p=0,015$, $r=0,633$) e CCL19/ELC ($p=0,032$, $r=0,575$) (Figura 16B).

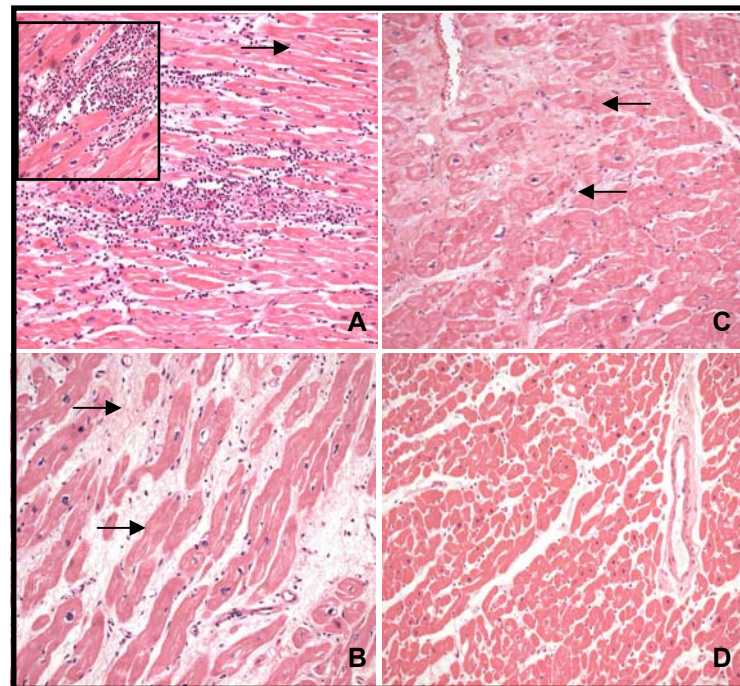
Em conjunto, esses dados sugerem que a frequência aumentada de genes regulados positivamente, os quais codificam proteínas associadas ao processo inflamatório está associada à intensidade de miocardite em amostras de miocárdio de pacientes com CCC.

Tabela 14. Análise histopatológica de amostras de miocárdio de pacientes com CCC, pacientes com CNI e amostras de doadores saudáveis (N)

| Identificação da Amostra | Miocardite | Fibrose | Hipertrofia de cardiomiócitos |
|--------------------------|------------|---------|-------------------------------|
| CCC-1 | 1+ | 1+ | S |
| CCC-2 | 0/1+ | 1+ | S |
| CCC-3 | 1+ | 1+ | S |
| CCC-4 | 2/3+ | 2+ | S |
| CCC-5 | 2/3+ | 2+ | S |
| CCC-6 | 3+ | 3+ | S |
| CCC-7 | 3+ | 2+ | S |
| CCC-8 | 2/3+ | 2+ | S |
| CCC-9 | 2+ | 2+ | S |
| CCC-10 | 2+ | 2+ | S |
| CCC-11 | 2/3+ | 1+ | S |
| CCC-12 | 3+ | 2+ | S |
| CCC-13 | 0 | 1/2+ | S |
| CCC-14 | 3+ | 2/3+ | S |
| CNI-1 | 0 | 1/2+ | S |
| CNI-2 | 0 | 0/1+ | S |
| CNI-3 | 0 | 1+ | S |
| CNI-4 | 0 | 3+ | S |
| CNI-5 | 0 | 2+ | S |
| CNI-6 | 0 | 2/3+ | S |
| CNI-7 | 0 | 3+ | S |
| CNI-8 | 0 | 3+ | S |
| N-1 | 0 | 0 | N |
| N-2 | 0 | 0 | N |
| N-3 | 0 | 0 | N |
| N-4 | 0 | 0 | N |
| N-5 | 0 | 0 | N |
| N-6 | 0 | 0 | N |

Caracterização das amostras quanto a miocardite, fibrose e hipertrofia; valores referentes a presença de miocardite e fibrose: 0: ausente; 1+: discreto; 2+: moderado; 3+: intenso; hipertrofia: S: sim; N: não. Análise realizada pelo Dr. Luiz Benvenuto do Serviço de Anatomia e Patologia do InCor - HC/FMUSP.

A



B

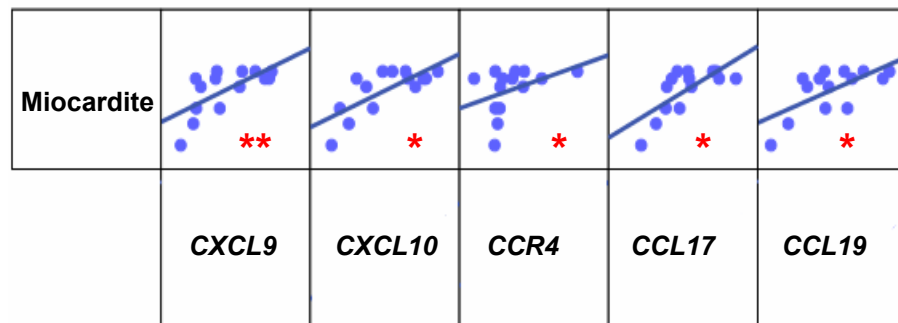


Figura 16. Análise histopatológica do tecido cardíaco de CCC, CNI e doadores saudáveis e correlações positivas entre a presença de miocardite e a expressão de genes associados ao processo inflamatório em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. A. Cortes histológicos representativos de amostras de miocárdio submetidos a coloração com H&E como descrito no Material e Métodos. Miocárdio de paciente com CCC (A; aumento de 200x e canto superior esquerdo ampliação em 400x). Miocárdio de paciente com cardiomiopatia dilatada idiopática (B; grupo CNI; aumento de 200x). Miocárdio de paciente com cardiomiopatia isquêmica (C; grupo CNI; aumento de 200x). Miocárdio de doador saudável (D; aumento de 200x). As setas indicam presença de fibrose ou hipertrofia de cardiomiócitos. B. Correlações positivas entre a presença de miocardite e a expressão gênica do receptor CCR4 e das quimiocinas CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10, CCL17/TARC e CCL19/ELC em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$, valores de p bicaudais obtidos pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman.

4.8 ANÁLISE DA PRESENÇA DE CÉLULAS CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CCR5⁺, CXCR3⁺, CCR4⁺, CCL5/RANTES⁺ E CXCL9/MIG⁺ NO TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM CCC E NO TECIDO CARDÍACO DE PACIENTES COM CNI COM IMUNOFLUORESCÊNCIA POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Com o objetivo de estudar a expressão das proteínas codificadas por transcritos diferencialmente expressos em CCC conforme os resultados obtidos de qRT-PCR, avaliamos a expressão de superfície dos receptores de quimiocinas CCR5, CXCR3 e CCR4 por ensaios de imunofluorescência com microscopia confocal.

A identificação das células que expressam os receptores ou produzem os mediadores estudados no presente trabalho, não foi possível devido à disponibilidade apenas de anticorpos primários produzidos na mesma espécie. Entretanto, com o objetivo de identificar a presença de células mononucleares realizamos algumas marcações para CD3, CD4 e CD8 buscando identificar o perfil de linfócitos T presentes nas amostras estudadas. Observamos células CD3⁺ em todas as amostras de miocárdio de ambos os grupos CCC e CNI e também algumas células CD3⁺ em amostras de indivíduos saudáveis (Figura 17). Embora as análises tenham sido apenas qualitativas, observamos maior número de células CD3⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, onde o infiltrado inflamatório é mais intenso, o que não foi

observado nos demais grupos estudados. Células CD4⁺ e CD8⁺ foram observadas em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e em amostras de pacientes com CNI, contudo, observamos maior número de células positivas em amostras de pacientes com CCC que em amostras de pacientes com CNI (Figuras 18 e 19). Na maioria das amostras de doadores saudáveis, embora observássemos a presença de algumas células CD3⁺, a marcação de células CD4⁺ e CD8⁺ foi ausente ou de baixa intensidade em relação às amostras de CCC e CNI.

Observamos células positivas para os receptores CCR5 e CXCR3 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC que pode ser observado nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Embora as análises tenham sido apenas qualitativas, observamos que 14/14 das amostras de miocárdio de pacientes com CCC apresentam marcação para os receptores CCR5 e CXCR3. Observamos ainda que as marcações são mais intensas em amostras de miocárdio onde o infiltrado inflamatório é também mais intenso. Avaliando a marcação desses receptores em amostras de miocárdio de pacientes com CNI e em amostras de miocárdio de indivíduos saudáveis (N), não observamos a presença de células CCR5⁺ e células CXCR3⁺ (Figuras 20 e 21).

A presença de células CCR5⁺ e células CXCR3⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC demonstra a expressão em nível protéico desses receptores de superfície, corroborando a expressão gênica aumentada observada nessas amostras. Contudo, é importante ressaltar que a presença de infiltrado inflamatório em amostras de miocárdio de

pacientes com CCC de grau moderado a intenso resulta na identificação de células CCR5⁺ e células CXCR3⁺, as quais são raras em amostras de miocárdio de pacientes com CNI onde a presença de infiltrado inflamatório é ausente e poucas células inflamatórias são encontradas.

Células de perfil Th1 expressam os receptores CCR5 e CXCR3 e migram em direção a um foco inflamatório onde há a produção de seus fatores quimiotáticos. Dessa forma, avaliamos também a expressão das quimiocinas CCL5/RANTES e CXCL9/Mig, que apresentam níveis de RNAm significativamente aumentados em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. Observamos a presença de células CCL5/RANTES⁺ e células CXCL9/Mig⁺ em 9/14 e 8/14 amostras de miocárdio de pacientes com CCC, respectivamente. Contudo, não observamos a presença dessas quimiocinas em amostras de miocárdio de pacientes com CNI e em amostras de miocárdio de indivíduos saudáveis (N) (Figuras 22 e 23).

Observamos nas análises de qRT-PCR expressão significativa do receptor CCR4 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, e observamos em 9/14 amostras de miocárdio de pacientes com CCC a presença de células CCR4⁺ (Figura 24). Não foram observadas células CCR4⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CNI ou em amostras de indivíduos saudáveis (Figura 24).

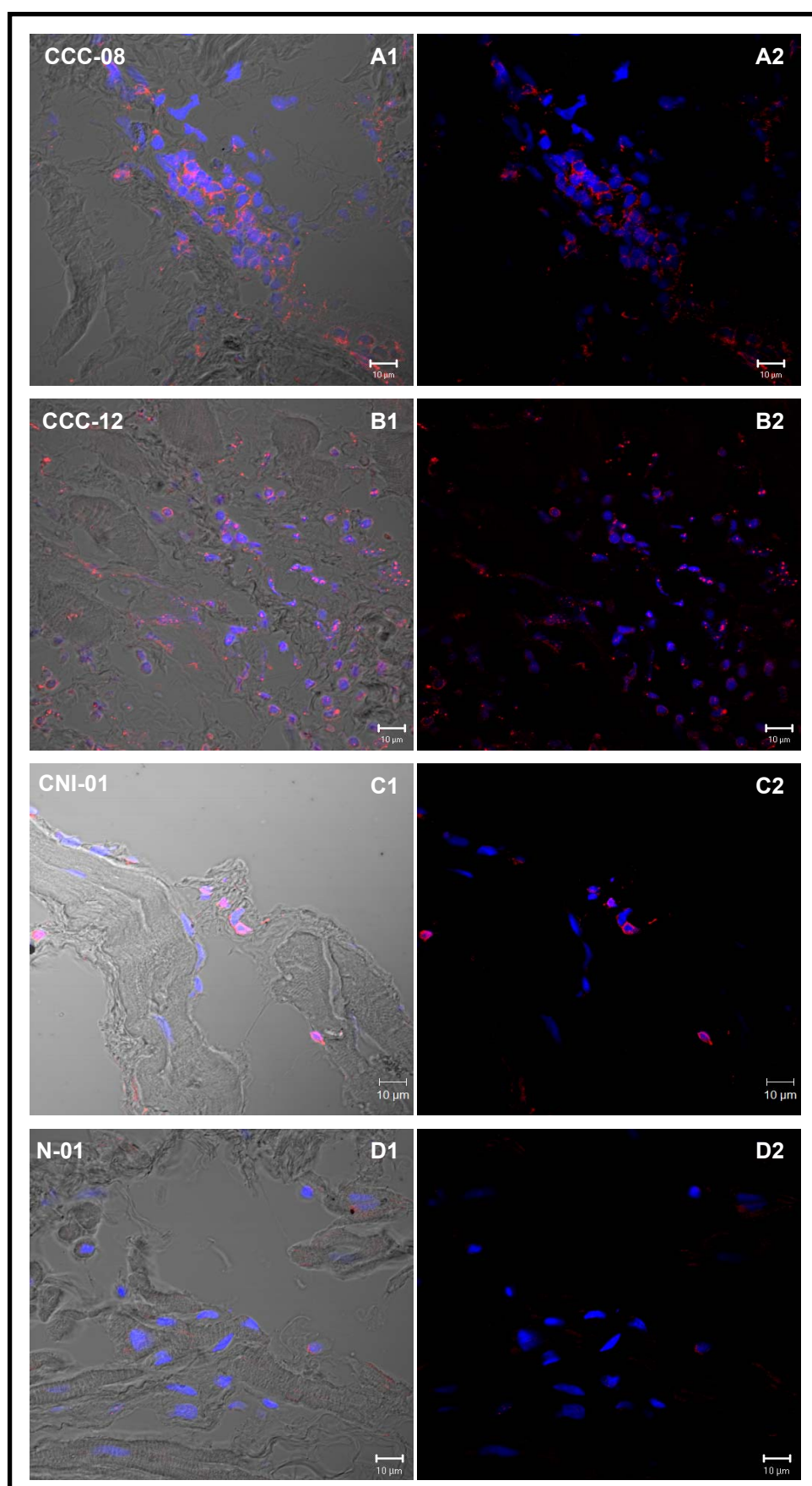


Figura 17. Identificação de células CD3⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CD3⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (A e B), CNI (C) e amostras de miocárdio de doadores saudáveis (D). Os fragmentos de tecido de miocárdio foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD3 marcado com PE e o sinal foi amplificado com anticorpo secundário Alexa 546 (vermelho); os núcleos das células são visualizados em azul (DAPI). As imagens foram obtidas em campo claro (A1, B1, C1 e D1) e escuro (A2, B2, C2 e D2). Nas imagens de campo claro podemos visualizar o tecido e verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente; nas imagens de campo escuro são visualizadas apenas células positivas para CD3 (vermelho) e os núcleos das células (azul; DAPI).

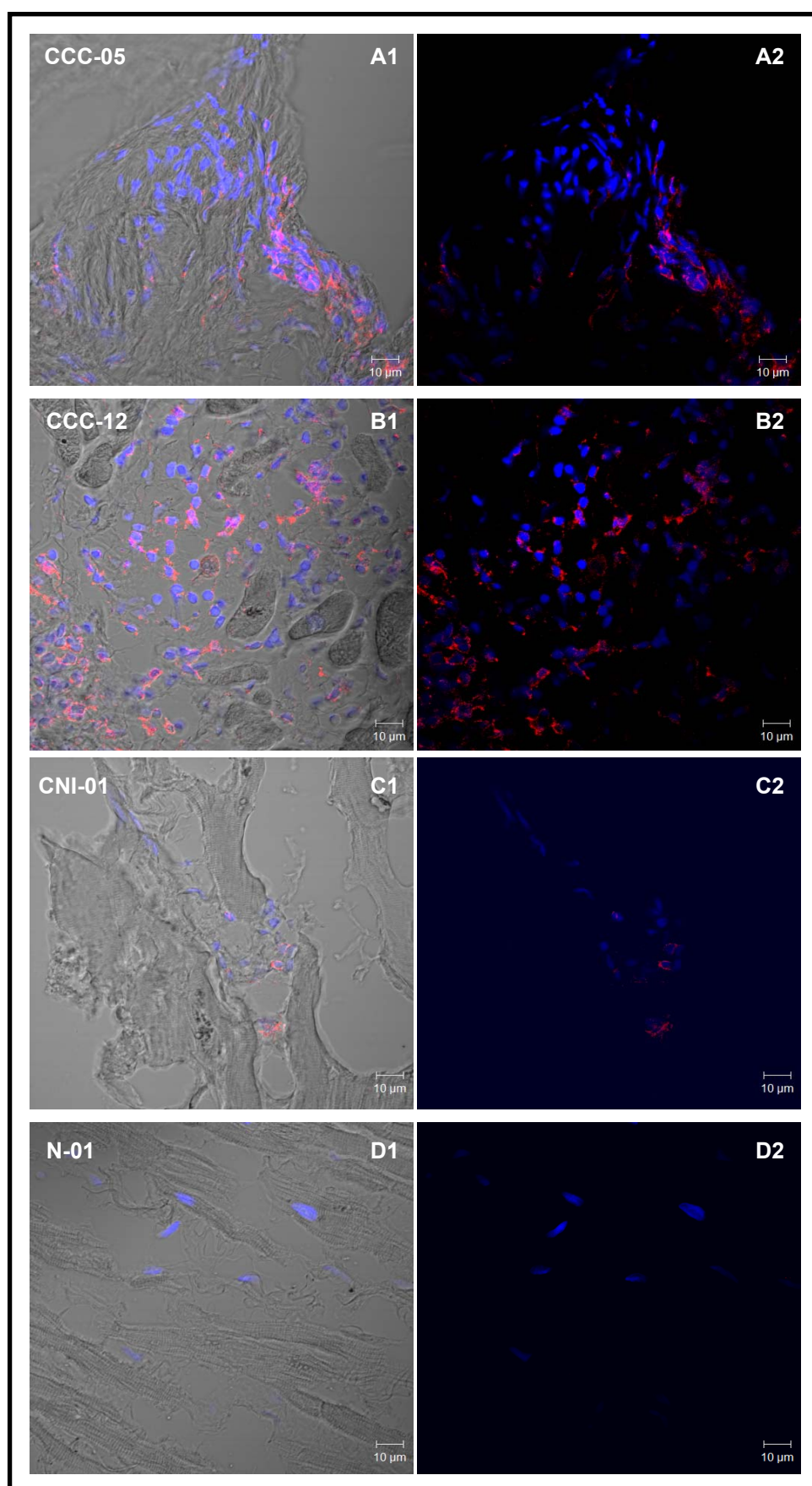


Figura 18. Identificação de células CD4⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CD4⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (A e B), CNI (C) e amostras de miocárdio de doadores saudáveis (D). Os fragmentos de tecido de miocárdio foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD4 marcado com PE e o sinal foi amplificado com anticorpo secundário Alexa 546 (vermelho); os núcleos das células são visualizados em azul (DAPI). As imagens foram obtidas em campo claro (A1, B1, C1 e D1) e escuro (A2, B2, C2 e D2). Nas imagens de campo claro podemos visualizar o tecido e verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente; nas imagens de campo escuro são visualizadas apenas células positivas para CD4 (vermelho) e os núcleos das células (azul; DAPI).

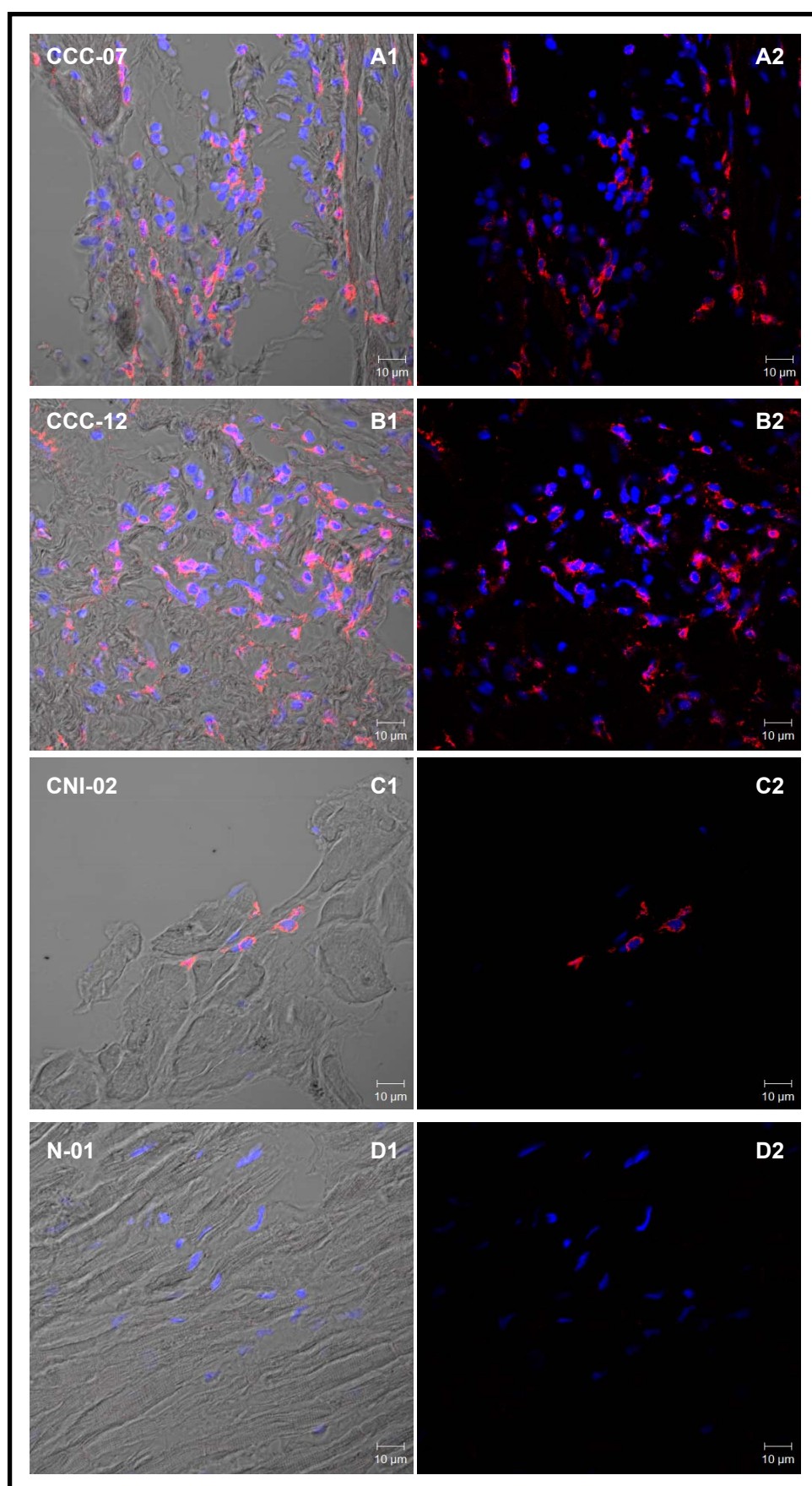


Figura 19. Identificação de células CD8⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CD8⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (A e B), CNI (C) e amostras de miocárdio de doadores saudáveis (D). Os fragmentos de tecido de miocárdio foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD8 marcado com PE e o sinal foi amplificado com anticorpo secundário Alexa 546 (vermelho); os núcleos das células são visualizados em azul (DAPI). As imagens foram obtidas em campo claro (A1, B1, C1 e D1) e escuro (A2, B2, C2 e D2). Nas imagens de campo claro podemos visualizar o tecido e verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente; nas imagens de campo escuro são visualizadas apenas células positivas para CD8 (vermelho) e os núcleos das células (azul; DAPI).

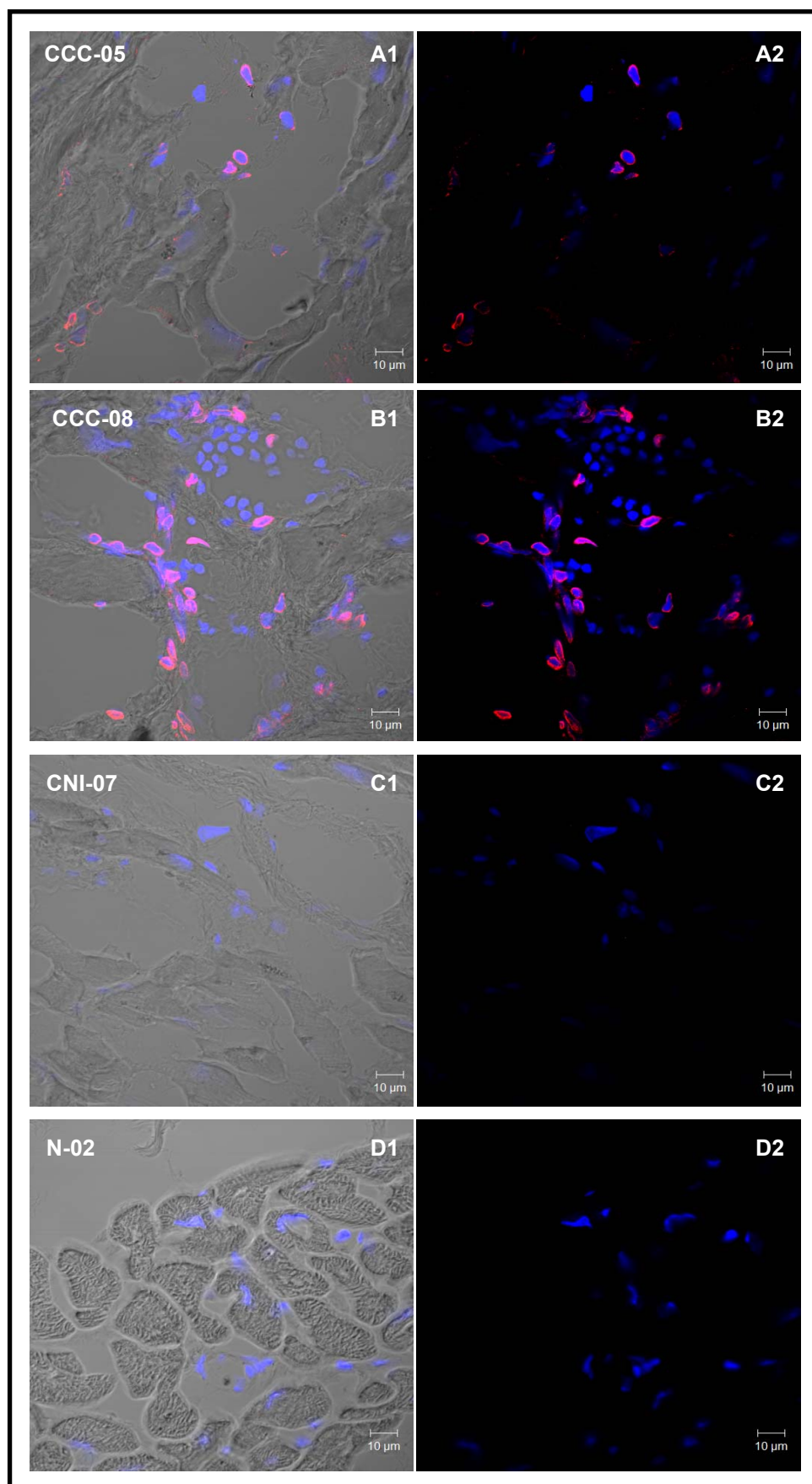


Figura 20. Identificação de células CCR5⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CCR5⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (A e B), CNI (C) e amostras de miocárdio de doadores saudáveis (D). Os fragmentos de tecido de miocárdio foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CCR5 marcado com PE e o sinal foi amplificado com anticorpo secundário Alexa 546 (vermelho); os núcleos das células são visualizados em azul (DAPI). As imagens foram obtidas em campo claro (A1, B1, C1 e D1) e escuro (A2, B2, C2 e D2). Nas imagens de campo claro podemos visualizar o tecido e verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente; nas imagens de campo escuro são visualizadas apenas células positivas para CCR5 (vermelho) e os núcleos das células (azul; DAPI).

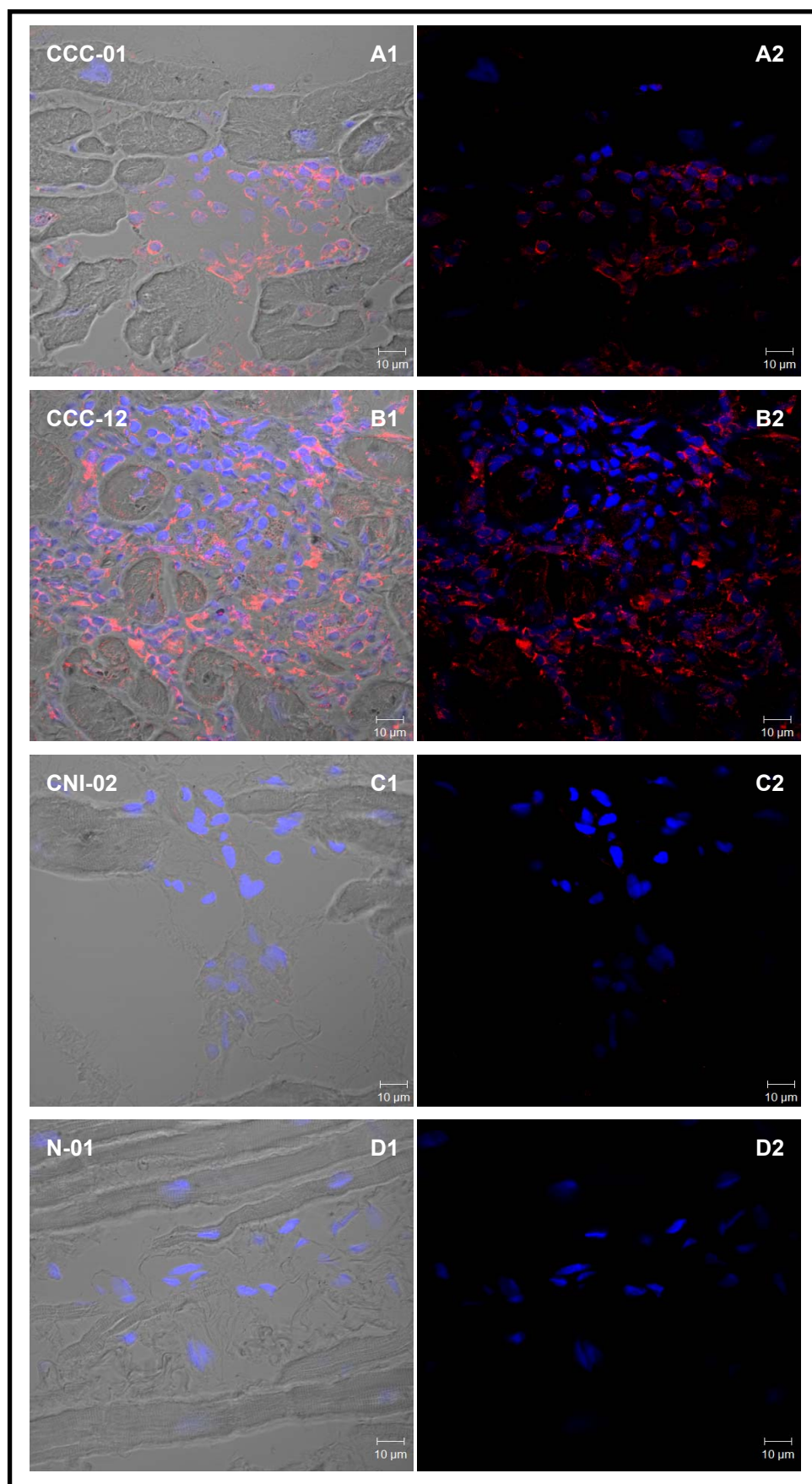


Figura 21. Identificação de células CXCR3⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CXCR3⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (A e B), CNI (C) e amostras de miocárdio de doadores saudáveis (D). Os fragmentos de tecido de miocárdio foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CXCR3 marcado com PE e o sinal foi amplificado com anticorpo secundário Alexa 546 (vermelho); os núcleos das células são visualizados em azul (DAPI). As imagens foram obtidas em campo claro (A1, B1, C1 e D1) e escuro (A2, B2, C2 e D2). Nas imagens de campo claro podemos visualizar o tecido e verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente; nas imagens de campo escuro são visualizadas apenas células positivas para CXCR3 (vermelho) e os núcleos das células (azul; DAPI).

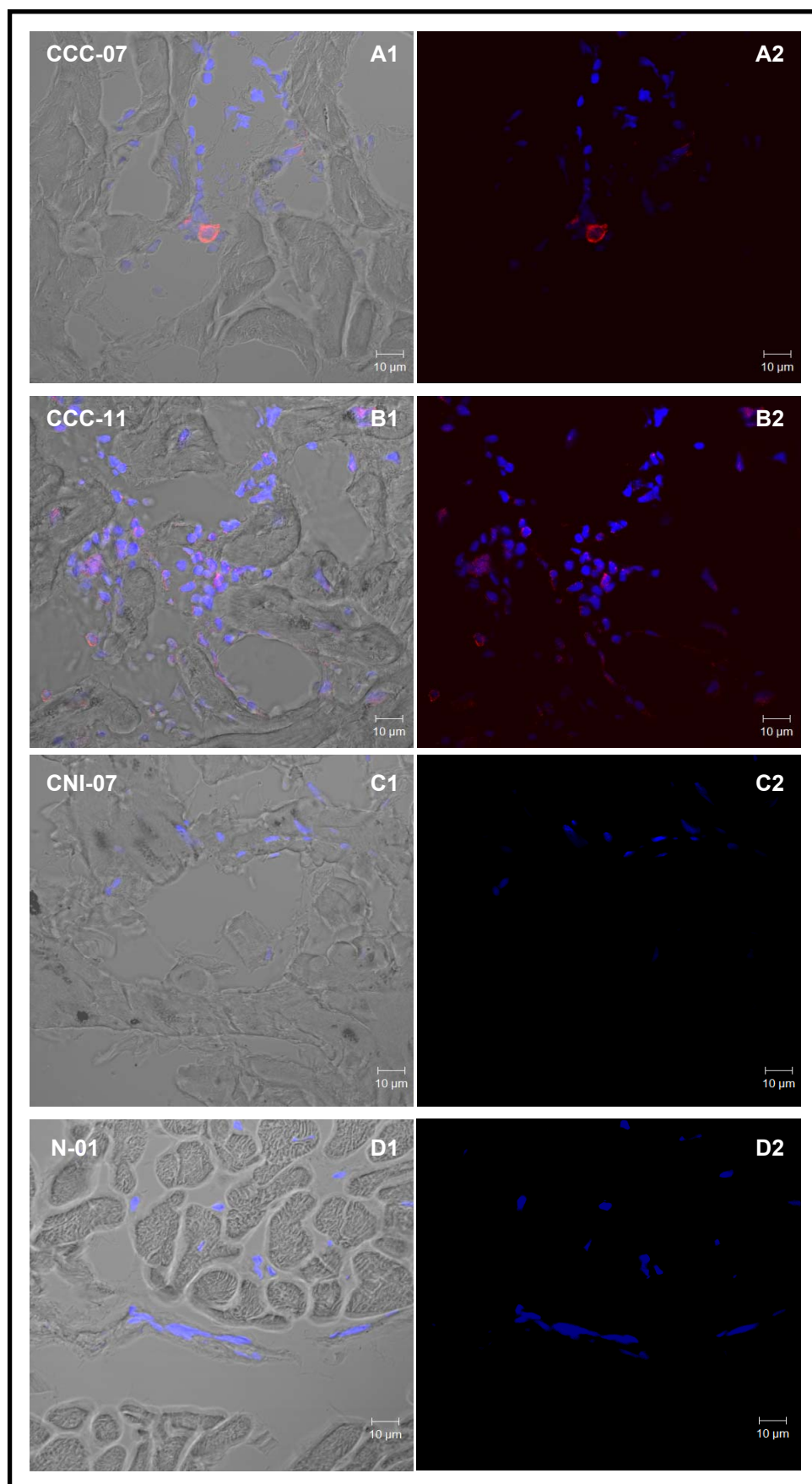


Figura 22. Identificação de células CCL5/RANTES⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CCL5/RANTES⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (A e B), CNI (C) e amostras de miocárdio de doadores saudáveis (D). Os fragmentos de tecido de miocárdio foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CCL5/RANTES e o sinal foi amplificado com anticorpo secundário Alexa 546 (vermelho); os núcleos das células são visualizados em azul (DAPI). As imagens foram obtidas em campo claro (A1, B1, C1 e D1) e escuro (A2, B2, C2 e D2). Nas imagens de campo claro podemos visualizar o tecido e verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente; nas imagens de campo escuro são visualizadas apenas células positivas para CCL5/RANTES (vermelho) e os núcleos das células (azul; DAPI).

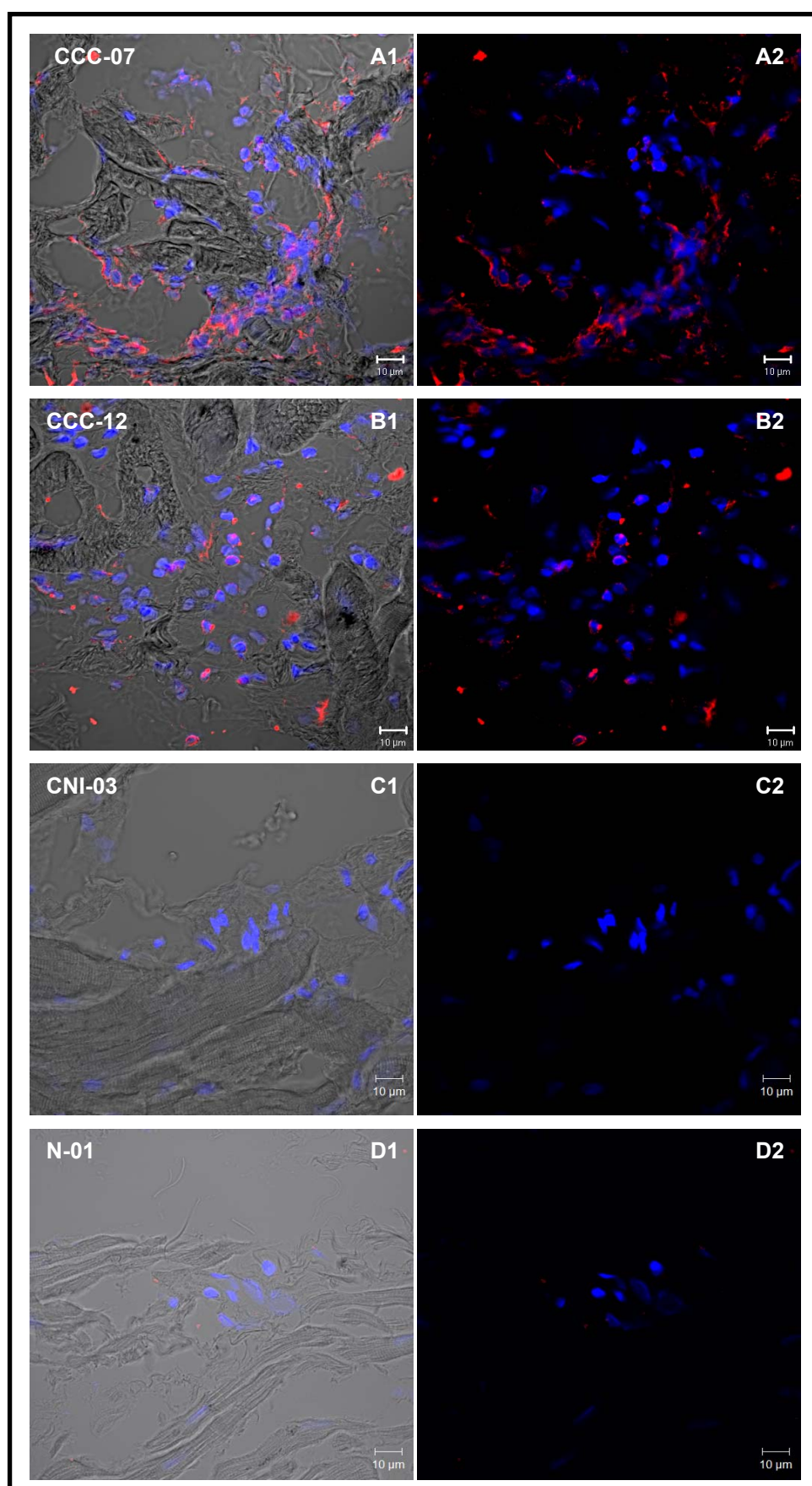


Figura 23. Identificação de células CXCL9/Mig⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CXCL9/Mig⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (A e B), CNI (C) e amostras de miocárdio de doadores saudáveis (D). Os fragmentos de tecido de miocárdio foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CXCL9/Mig e o sinal foi amplificado com anticorpo secundário Alexa 546 (vermelho); os núcleos das células são visualizados em azul (DAPI). As imagens foram obtidas em campo claro (A1, B1, C1 e D1) e escuro (A2, B2, C2 e D2). Nas imagens de campo claro podemos visualizar o tecido e verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente; nas imagens de campo escuro são visualizadas apenas células positivas para CXCL9/Mig (vermelho) e os núcleos das células (azul; DAPI).

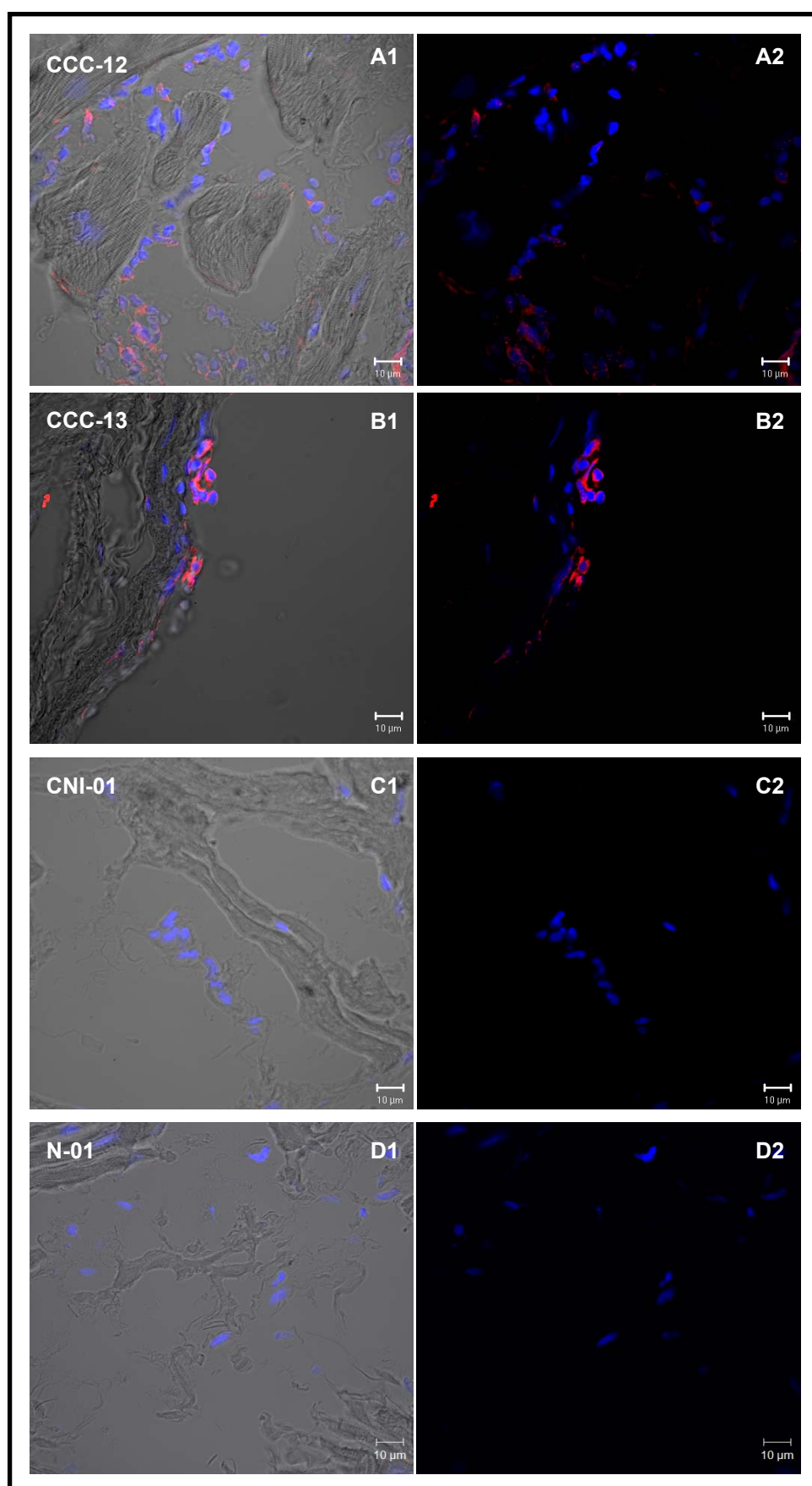


Figura 24. Identificação de células CCR4⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, amostras de pacientes com CNI e amostras de miocárdio de doadores saudáveis. Imagens representativas de análises de microscopia confocal para identificação de células CCR4⁺ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (A e B), CNI (C) e amostras de miocárdio de doadores saudáveis (D). Os fragmentos de tecido de miocárdio foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CCR4 e o sinal foi amplificado com anticorpo secundário Alexa 546 (vermelho); os núcleos das células são visualizados em azul (DAPI). As imagens foram obtidas em campo claro (A1, B1, C1 e D1) e escuro (A2, B2, C2 e D2). Nas imagens de campo claro podemos visualizar o tecido e verificar se a marcação se encontra na célula ou no tecido adjacente; nas imagens de campo escuro são visualizadas apenas células positivas para CCR4 (vermelho) e os núcleos das células (azul; DAPI).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi investigada a expressão gênica no miocárdio de pacientes com CCC e CNI de citocinas do padrão pró-inflamatório, Th1, Th2 e regulatório, e de quimiocinas envolvidas com a migração diferencial de linfócitos T de memória e do fenótipo Th1/Th2, bem como dos receptores de tais quimiocinas, totalizando 28 genes. Com esta análise obtivemos um quadro panorâmico da expressão dos mediadores e receptores, citados acima, no miocárdio de pacientes com CCC e no miocárdio de pacientes com CNI. Nós observamos a expressão gênica aumentada da citocina pró-inflamatória *IL-18*, das quimiocinas *CCL3/MIP-1 α* , *CCL4/MIP-1 β* , *CCL5/RANTES*, *CXCL9/Mig*, *CXCL10/IP-10*, *CCL17/TARC* e *CCL19/ELC* e dos receptores *CXCR3*, *CCR5* e *CCR4* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparada àquela encontrada em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. Adicionalmente, a presença de células mononucleares infiltrantes *CXCR3*⁺, *CCR5*⁺ e *CCR4*⁺ foi observada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. Foram detectadas numerosas células mononucleares do infiltrado inflamatório de tecido cardíaco de pacientes com CCC marcadas com anticorpos monoclonais anti-*CCL5/RANTES* e anti-*CXCL9/Mig*. A expressão gênica aumentada de *IL-18*, quimiocinas e seus receptores e as correlações positivas observadas entre esses mediadores e receptores sugerem um *feedback* positivo atuando na manutenção e amplificação do processo inflamatório na ausência de células

T regulatórias ou células Th2 funcionais, e que a expressão local de quimiocinas como *CCL3/MIP-1 α* , *CCL4/MIP-1 β* , *CCL5/RANTES*, *CXCL9/Mig*, *CXCL10/IP-10* e *CCL19/ELC* poderia atrair células CCR5⁺ e células T CXCR3⁺ para o tecido cardíaco inflamado. Isto é corroborado pela correlação positiva observada entre a expressão de *CXCL9/Mig*, *CXCL10/IP-10*, *CCR4*, *CCL17/TARC* e *CCL19/ELC* e a intensidade de miocardite, sugerindo que a maior expressão desses mediadores no miocárdio de pacientes com CCC está diretamente relacionada com a presença do infiltrado inflamatório. Contudo, a expressão de *CCR4* sugere que células de perfil Th2 – ou células do perfil Th1 expressando *CCR4* – também poderiam ser atraídas pela expressão de *CCL17/TARC* (ligante de *CCR4*) para o tecido cardíaco de pacientes com CCC.

Comparamos a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias/pró-Th1 como *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12*, *IL-18* e *IL-23*, e da quimiocina *CXCL8/IL-8* entre os grupos de pacientes com CCC ou CNI e observamos expressão aumentada consistente apenas de *IL-18* (Figura 7) em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. A mediana de expressão de *IL-6*, *IL-12p35* e *CXCL8/IL-8* em ambos os grupos CCC e CNI não se mostrou aumentada em relação a amostras de miocárdio de doadores saudáveis, e a expressão de *IL-1 β* , *IL-12p40* e *IL-23* não foi detectada em nenhuma amostra de miocárdio (CCC, CNI e doadores saudáveis (Tabela 4).

A baixa expressão gênica de *IL-6* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (Figura 7B) contrasta com resultados de Reis *et al.*

(1997) que demonstraram por imunohistoquímica moderado número de células mononucleares IL-6⁺ no tecido cardíaco de pacientes com CCC. Entretanto, a diferença observada pode ser devida ao uso de metodologias e tipos de amostras distintos dos usados em nosso trabalho.

O achado de aumento exclusivo de *IL-18*, na ausência de outras citocinas pró-inflamatórias, é surpreendente, uma vez que os estímulos à sua produção por macrófagos são compartilhados, como por exemplo ligantes dos receptores Toll-like e IFN- γ (Verreck *et al.*, 2006). Vale ressaltar que o RNAm de muitos mediadores, incluindo IL-1 β , IL-12p35, IL-12p40 e CXCL8/IL-8, contêm um elemento desestabilizante de RNAm (sequência AUUUA) que reduz sua meia vida (Cosman, 1987; Matsushima *et al.*, 1988). O RNAm de IL-18, porém, não apresenta esse elemento, implicando em uma meia-vida mais longa (Tone *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999), o que teria como consequência a permanência do RNAm de IL-18 em reações inflamatórias mais prolongadas e poderia explicar em parte nossos achados de aumento de expressão gênica de *IL-18* no grupo de pacientes com CCC. Alternativamente, o conjunto de estímulos presentes na lesão poderia favorecer a produção específica de IL-18 por macrófagos, que compõem 50% do infiltrado na CCC (Milei *et al.*, 1992).

Na infecção experimental pelo *T. cruzi* foi observado que IL-18 induz a produção de IFN- γ (Muller *et al.*, 2001), e essa produção tem sido associada à resistência do hospedeiro (Gazzinelli *et al.*, 1992) e ao controle do parasitismo (Abrahamsohn, 1998). A presença de IFN- γ tem sido observada no tecido cardíaco de animais infectados com *T. cruzi* (Powell *et*

et al., 1998; Talvani *et al.*, 2000), no miocárdio de pacientes chagásicos (Reis *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1997) e o IFN- γ é produzido *in vitro* por linfócitos T infiltrantes do miocárdio (Abel *et al.*, 2001). Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com CCC apresentam um aumento no número de células produtoras de citocinas Th1, como IFN- γ , em comparação com pacientes com a forma indeterminada da doença (Abel *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003). A IL-18 ativa diretamente o promotor de IFN- γ através da molécula AP-1 (Barbulescu *et al.*, 1998), sugerindo a ativação de uma via molecular adicional no desenvolvimento e diferenciação de células Th1. Contudo, a produção de IFN- γ induzida por IL-18 é aumentada quando IL-18 atua em sinergismo com outras citocinas, como IL-12 e IL-15 (Micallef *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Fantuzzi *et al.*, 1998; Gracie *et al.*, 1999). O exemplo desse sinergismo pode ser observado em culturas de células de tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, onde IL-18 induz produção de IFN- γ e TNF- α em sinergismo com IL-12 e IL-15 em igual intensidade. Nessas culturas também se observou que a adição de TNF- α e IL-1 β induz produção significativa de IL-18 e IL-15 (Gracie *et al.*, 1999). Nosso grupo demonstrou por ensaios de imunohistoquímica a expressão de IL-15 e expressão gênica mais elevada de *IL-15R α* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC quando comparada com amostras de miocárdio de doadores saudáveis, o que sugere a produção e ação dessa citocina *in situ* (Fonseca *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrado que células dendríticas provenientes de animais deficientes do IFN- γ R1 produzem menor quantidade de IL-18 após estímulo com LPS que células

dendríticas de animais selvagens, e os autores sugerem que a sinalização de IFN- γ poderia estimular a maior produção de IL-18 por células dendríticas (Iwai *et al.*, 2008). A IL-18 pode manter a resposta pró-inflamatória ativando diretamente o fator NF- κ B (Matsumoto *et al.*, 1997), aumentando a expressão de moléculas de adesão endoteliais (Vidal-Vanaclocha *et al.*, 2000) ou induzindo a produção de mediadores como TNF- α e iNOS (Okamura *et al.*, 1998; Puren *et al.*, 1998). Nossos resultados de aumento de expressão gênica de *IL-18* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (Figura 7A), aliados aos estudos mencionados acima, sugerem que a expressão local de IL-18 poderia ser induzida por mediadores como IFN- γ e TNF- α (Gracie *et al.*, 1999; Iwai *et al.*, 2008), que estão presentes no tecido cardíaco de pacientes com CCC (Reis *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1997; Abel *et al.*, 2001). IL-18 poderia também regular positivamente a produção local desses mediadores (IFN- γ e TNF- α) (Barbulescu *et al.*, 1998; Gracie *et al.*, 1999), por si ou em sinergismo com outros mediadores, como IL-15 (Fonseca *et al.*, 2007) e assim em um *feedback* positivo manter a expressão desses mediadores no miocárdio de pacientes com CCC. É importante ressaltar que os níveis de expressão gênica de *IL-15* correlacionam-se positivamente com os níveis de *IL-18* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (dado não mostrado).

Nós observamos também que a expressão de *IL-18* correlaciona-se positivamente com a expressão gênica das quimiocinas *CCL5/RANTES*, *CXCL9/Mig*, *CXCL10/IP-10* e *CCL17/TARC*, e dos receptores *CXCR3* e *CCR5*, mas não com as quimiocinas *CCL4/MIP-1 β* , *CCL19/ELC* e o receptor

CCR4 (Figura 15). Têm sido relatado que IL-18 induz a síntese de CCL3/MIP-1 α (Puren *et al.*, 1998) e foi demonstrado que as concentrações plasmáticas de IL-18 correlacionam-se positivamente com as concentrações de CXCL10/IP-10 e CXCL9/Mig em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (Lit *et al.*, 2006). As correlações observadas, portanto, sugerem que a IL-18 poderia também estar envolvida com a produção dessas quimiocinas no tecido cardíaco de pacientes com CCC diretamente ou induzindo a produção de IFN- γ , que regula positivamente a expressão de quimiocinas e seus receptores (Bacon *et al.* 1995; Rathanaswani *et al.*, 1995; Farber, 1997; Bonecchi *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998), o que direta ou indiretamente poderia estar relacionado com a migração de células T CXCR3⁺ e CCR5⁺. Alternativamente, as abundantes células Th1 poderiam produzir estímulos, como IFN- γ e TNF- α , que aumentariam a expressão de IL-18. Além de amplificar o processo inflamatório, a IL-18 produzida localmente poderia também induzir a hipertrofia de cardiomiócitos na CCC (Chandrasekar *et al.*, 2005; Majumdar *et al.*, 2008), atuando na disfunção cardíaca. Pacientes com falência cardíaca congestiva apresentam níveis circulantes aumentados de IL-18, e existe correlação entre os níveis de IL-18 no soro e a severidade da disfunção e dano cardíaco (Seta *et al.*, 2000). Neste estudo também se demonstrou que IL-18 induz a expressão do gene *ANF*, que participa do perfil hipertrófico de expressão gênica (Seta *et al.*, 2000).

Em nosso trabalho, observamos que a expressão gênica de *TGF- β* não se mostrou aumentada no grupo de pacientes com CCC (Figura 7F). Entretanto, dados da literatura demonstraram que pacientes com CCC

apresentam níveis circulantes elevados de TGF- β e marcação positiva para Smad2 fosforilada em biópsias cardíacas, um marcador de ativação da via de sinalização de TGF- β (Araujo-Jorge *et al.*, 2002). As metodologias utilizadas para se verificar a presença de TGF- β nesse trabalho e no nosso são diferentes, pois avaliamos a abundância do RNAm e não um marcador da via de sinalização de TGF- β . É importante ressaltar que mecanismos pós-transcripcionais e/ou pós-traducionais regulam a expressão de TGF- β (Kim *et al.*, 1992), contudo a expressão gênica diminuída de TGF- β observada exclui a participação de TGF- β em nossas amostras.

Em nosso trabalho também investigamos a expressão gênica de *Foxp3* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC e CNI. *Foxp3* é uma proteína nuclear cuja expressão caracteriza células T regulatórias (Treg) (revisado em Campbell e Ziegler, 2007). Dados da literatura sugerem que na infecção experimental pelo *T. cruzi*, células Treg não regulam a resposta efetora de células T CD8⁺ durante a fase aguda ou crônica da infecção (Kotner e Tarleton, 2007). Contudo, Mariano *et al.* (2008) demonstraram que durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi* (16 dias de infecção) ocorre alta expressão de *Foxp3* no tecido cardíaco de camundongos infectados, e o tratamento com anticorpos anti-GITR e anti-CD25 resulta no aumento da resposta inflamatória e mortalidade desses animais, sugerindo que células Treg estão envolvidas no controle da resposta inflamatória exacerbada na fase aguda da infecção. Araújo *et al.* (2007) observaram que pacientes com a forma indeterminada da doença apresentam frequência aumentada de células T CD4⁺CD25⁺*Foxp3*⁺IL-10⁺ em

relação a pacientes com a forma cardíaca e sugeriram que a produção de IL-10 é importante no controle do desenvolvimento da doença em pacientes com a forma indeterminada. Nesse estudo os autores também observaram que pacientes com a forma cardíaca apresentam aumento da porcentagem de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ que expressam CTLA-4, e sugeriram que a elevada expressão de CTLA-4 poderia inibir a secreção IL-10 por macrófagos levando ao desenvolvimento da forma cardíaca crônica (Araújo *et al.*, 2007). A mediana dos valores de ΔCt de *Foxp3* observada nos grupos CCC e CNI foi equivalente (Figura 8B), e sabendo que no grupo de pacientes com CNI não há infiltrado inflamatório, podemos dizer que o infiltrado presente na CCC não expressa *Foxp3*. Recentemente, nós demonstramos uma menor expressão gênica de *CD25* no mesmo grupo de pacientes com CCC aqui estudados em relação ao grupo de doadores saudáveis (Fonseca *et al.*, 2007). A expressão diminuída de *TGF- β* e *CD25* no grupo de pacientes com CCC, aliada aos valores equivalentes de ΔCt de *Foxp3* nos grupos CCC e CNI, sugere a ausência de células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+TGF-\beta^+$ no miocárdio de pacientes com CCC. Nosso grupo demonstrou que não há produção consistente de IL-10 por células mononucleares do infiltrado inflamatório cardíaco, (Abel *et al.*, 2001), o que corrobora a ausência de células Treg e seus mecanismos supressores no miocárdio de pacientes com CCC. Embora tenha sido observado um aumento da porcentagem de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no sangue periférico de pacientes com a forma cardíaca da doença, nossos resultados sugerem que tais células não migram para o tecido cardíaco de pacientes

com CCC, embora os mecanismos envolvidos na migração dessas células, também dependentes de CCR4, CCR8 e CCR5 (Huehn e Hamann, 2005) estejam aumentados no miocárdio de pacientes com CCC. Apesar de encontrarmos marcadores de células Th2 como CCR4 e CCR8 (Figura 12), os níveis de RNAm de *IL-4* e *IL-13* no miocárdio de pacientes com CCC mostraram-se semelhantes aos encontrados no miocárdio de pacientes com CNI ou doadores saudáveis (Figura 7, Tabela 4), indicando a ausência de citocinas capazes de suprimir a produção de IFN- γ por células T Th1 predominantes. A ausência de células Treg e Th2 funcionais sugere que, no miocárdio de pacientes com CCC, aparentemente não há mecanismos restritivos à inflamação de tipo Th1.

Observando a expressão de quimiocinas no tecido cardíaco de pacientes com CCC, CNI e doadores saudáveis, verificamos que a expressão gênica dos receptores *CCR5* e *CXCR3*, e dos seus fatores quimiotáticos *CCL3/MIP-1 α* , *CCL4/MIP-1 β* , *CCL5/RANTES*, *CXCL9/Mig* e *CXCL10/IP-10* está significativamente aumentada no tecido cardíaco de pacientes com CCC (Figuras 9 e 10). Corroborando esses achados, nós observamos a presença de células mononucleares CXCR3⁺ e CCR5⁺ com fenótipo Th1, e detectamos também a expressão de seus ligantes CXCL9/Mig e CCL5/RANTES no tecido cardíaco de pacientes com CCC (Figuras 20, 21, 22 e 23) com a técnica de imunofluorescência. Estes dados estão de acordo com resultados anteriores de nosso grupo que demonstraram expressão gênica aumentada dessas quimiocinas e do receptor *CXCR3* em amostras de miocárdio de outro grupo de pacientes

com CCC utilizando a técnica de qRT-PCR (Cunha-Neto *et al.*, 2005). Gomes *et al.* (2005) demonstraram que pacientes com CCC apresentam quantidades aumentadas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando os receptores CXCR3 ou CCR5 e co-expressando IFN- γ ou TNF- α no sangue periférico quando comparado a indivíduos com a forma indeterminada. É possível especular que tais células sejam precursoras das encontradas no infiltrado inflamatório da CCC. Quimiocinas como CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES foram detectadas no coração de animais infectados com *T. cruzi* (dos Santos *et al.*, 1992; Teixeira *et al.*, 2002) em associação com linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Machado *et al.*, 2005), e vale ressaltar que CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β são importantes fatores quimiotáticos no recrutamento de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Taub *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1999). Camundongos deficientes do receptor CCR5 e camundongos tratados com Met-Rantes, antagonista de CCR5, infectados com *T. cruzi* apresentam redução do infiltrado inflamatório cardíaco (Marino *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2005), e o tratamento com Met-Rantes não interfere na parasitemia, mas aumenta a sobrevivência e diminui a deposição de fibronectina (Marino *et al.*, 2004), sugerindo que a migração de células CCR5⁺ tem um importante papel na patogênese da miocardite. Na infecção experimental pelo *T. cruzi* também foi observada a produção das quimiocinas CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10 no tecido cardíaco (Aliberti *et al.*, 2001; Dos Santos *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2002), e os autores sugerem que a expressão dessas quimiocinas pode contribuir para o intenso recrutamento celular e, portanto, para o estabelecimento e manutenção da

miocardite induzida pela infecção pelo *T. cruzi*. Hardison *et al.* (2006) observaram que a expressão de CCL5/RANTES, CXCL9/Mig ou CXCL10/IP-10 permanece elevada até 120 dias após a infecção experimental pelo *T. cruzi*, esses dados sugerem que essas quimiocinas tenham um papel mantendo a inflamação crônica no miocárdio. Contudo, a neutralização de CCL5/RANTES, CXCL9/Mig ou CXCL10/IP-10 com o uso de anticorpos não diminui a inflamação cardíaca, sugerindo a participação de outros fatores no controle da inflamação em camundongos. A expressão gênica aumentada das quimiocinas *CCL3/MIP-1 α* , *CCL4/MIP-1 β* , *CCL5/RANTES*, *CXCL9/Mig* e *CXCL10/IP-10* no grupo de pacientes com CCC (Figuras 9 e 10) e as correlações positivas observadas entre expressão gênica de *CCL4/MIP-1 β* , *CCL5/RANTES*, *CXCL9/Mig* e *CXCL10/IP-10* (Figura 15) poderiam refletir a produção dessas quimiocinas por macrófagos ou células T ativadas (Cook *et al.*, 1999) presentes no miocárdio, o que torna o ambiente favorável para a migração de mais macrófagos, células T CD4⁺ e células T CD8⁺. Assim, a produção *in situ* e as interações dessas quimiocinas com os seus respectivos receptores, poderia manter a miocardite em pacientes com CCC atraindo células CCR5⁺ ou CXCR3⁺ produtores de IFN- γ presentes na periferia (Ribeirão *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2005). Uma vez no miocárdio, essas células poderiam produzir IFN- γ que ativaria ainda mais a produção de CCL5/RANTES, CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10 (Bacon *et al.* 1995; Rathanaswani *et al.*, 1995; Farber, 1997), mantendo o recrutamento celular e amplificando o processo inflamatório. A correlação positiva observada entre a expressão gênica de *CXCL9/Mig*, *CXCL10/IP-10*

e a intensidade de miocardite (Figura 16B) no grupo de pacientes com CCC reforça a importância da expressão local dessa quimiocina em atrair células T de fenótipo Th1 ativadas (Loetscher *et al.*, 1996). Adicionalmente, a correlação positiva observada entre a expressão gênica de *CXCL9/Mig* e *CCL19/ELC* sugere não somente a quimiotaxia de células T ativadas, mas a migração de células de memória $CCR7^+$ que infiltrariam o miocárdio pela expressão local de *CCL19/ELC* (Figura 15). Vale ressaltar que *CCL5/RANTES* é a quimiocina com maior expressão no miocárdio de pacientes com CCC (Tabela 10), e sua expressão correlaciona-se positivamente com a expressão de *CXCR3* (Figura 15). Foi descrito que *CCL5/RANTES* e *CXCR3* estão envolvidos com a quimiotaxia de células T ativadas e células T de memória (Schall *et al.*, 1990; Loetscher *et al.*, 1996), o que reforça nossa hipótese.

Chamou-nos a atenção a expressão gênica aumentada do receptor *CCR4* e de seu ligante *CCL17/TARC* e a presença de células $CCR4^+$ em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (Figuras 12A e 24), que apresentam um perfil nitidamente Th1, na ausência de expressão detectável de IL-4 e IL-13 (Figura 7, Tabela 4). Células de fenótipo Th2 expressam o receptor *CCR4* (Bonecchi *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998) e produzem mediadores como IL-4 e IL-13, que estão envolvidos em sua diferenciação (Coffman e von der Weid, 1997). D'Ambrosio *et al.* (1998) mostraram em ensaios *in vitro* que a expressão de *CCR4* em células Th2 é regulada positivamente mesmo na ausência de IL-4, por outro lado a expressão do RNAm de *CCR4* e a resposta ao estímulo com *CCL17/TARC* tornam-se

detectáveis em linhagens de células Th1 após estimulação do TCR e CD28. A expressão aumentada de *CCR4* e *CCL17/TARC*, aliada aos dados da literatura citados acima, permite especular a presença de células Th2 no miocárdio de pacientes com CCC, contudo a ausência de detecção de *IL-4* e *IL-13* indica que essas células, se presentes, não são funcionais (Figura 7, Tabela 4). Isto poderia ser explicado pela presença de IFN- γ produzido por células Th1, que inibiria a produção de citocinas Th2 (Teixeira *et al.*, 2005). Não podemos excluir que células de perfil Th1 presentes no miocárdio de pacientes com CCC co-expressem o receptor *CCR4* com descrito (D'Ambrosio *et al.*, 1998), e as correlações positivas observadas entre os níveis de expressão do *CCL17/TARC* e os níveis de expressão de *CCL5/RANTES*, *CXCL9/Mig*, *CXCL10/IP-10* e *CXCR3* (Figura 15), os quais estão associados ao perfil Th1, reforçam esta hipótese. Vale ressaltar que não há relatos na literatura sobre essa associação de *CCL17/TARC* e quimiocinas e receptores Th1 em doenças de perfil predominantemente Th1. A correlação positiva observada entre a expressão gênica de *CCR4* e *CCL17/TARC* e a intensidade de miocardite no grupo de pacientes com CCC (Figura 16B), permite especular que células *CCR4*⁺ poderiam ser atraídas para o tecido cardíaco de pacientes com CCC pela expressão local de *CCL17/TARC*. A produção deste mediador poderia ser induzida por algum componente tecidual no miocárdio inflamado, como descrito para linhagens de queratinócitos humanos que produzem *CCL17/TARC* após estímulo com IFN- γ e TNF- α (Vestergaard *et al.*, 2000; Saeki and Tamaki 2006). Alternativamente, a expressão gênica aumentada de *CCR4* no grupo de

pacientes com CCC poderia estar associada a presença de células T CCR7⁺ de memória central atraídas pela expressão aumentada de *CCL19/ELC* observada no grupo de pacientes com CCC (Figura 13A), como descrito anteriormente (Campbell *et al.*, 1999; Sallusto *et al.*, 1999). Experimentos de imunofluorescência dupla para os receptores CCR4 e CXCR3 permitirão identificar a existência de duas populações com fenótipos distintos (Th1 e Th2) ou uma população predominantemente Th1 co-expressando marcadores Th2 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC.

Observamos que a expressão de *CCL19/ELC*, ligante de CCR7, está aumentada em amostras de miocárdio de pacientes com CCC (Figura 13A), e apresenta correlação positiva com a intensidade de miocardite (Figura 16B). Além disso, os valores de ΔCt de *CCR7* de cada amostra (Figura 13B), sugerem que a expressão de *CCR7* estaria regulada positivamente em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, o que é consistente com um infiltrado de células T CCR7⁺. Assim, a alta expressão de *CCL19/ELC* e a mediana significativamente diferente dos valores de ΔCt de *CCR7* no grupo de pacientes com CCC (Figura 13A e B) sugerem que a produção *in situ* dessa quimiocina em vênulas do endotélio alto pós-capilares poderia atrair células CCR7⁺ de memória central provenientes da periferia, que poderiam co-expressar receptores como CXCR3, CCR5 e/ou CCR4 (Campbell *et al.*, 1999; Sallusto *et al.*, 1999; Andrew *et al.*, 2001). Essas células, uma vez no miocárdio, poderiam diferenciar-se em células efectoras contribuindo para a amplificação da resposta inflamatória na CCC. Além disso, a expressão de *CCL19/ELC* no miocárdio de pacientes com CCC poderia diminuir a

habilidade de células CCR7⁺ responderem a um segundo estímulo com CCL19/ELC por induzir a internalização do receptor CCR7 (Bardi *et al.*, 2001), mantendo as células T no local e amplificando o processo inflamatório.

A expressão de CCL21/SLC é equivalente nos grupos de pacientes com CCC e CNI (Figura 13A), o que sugere que a expressão de CCL21/SLC pode não estar associada à presença do infiltrado inflamatório na CCC, e sim a alguma alteração cardíaca compartilhada entre as cardiomiopatias aqui estudadas. Dados da literatura sugerem que o receptor CCR7 apresenta importante papel na fibrose pulmonar (Pierce *et al.*, 2007), renal (Banas *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2006) e no fígado (Bonacchi *et al.*, 2003) regulando o recrutamento de fibrócitos em humanos e camundongos. CCL21/SLC atua como um estímulo quimiotático para fibrócitos expressando CCR7 (Abe *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2006) e a sinalização da interação CCL21/CCR7 ativa membros da família MAPK (Riol-Blanco *et al.*, 2005), os quais regulam a expressão de colágeno tipo I *in vitro* (Sato *et al.*, 2002). Em conjunto, os dados sugerem que CCL21/SLC poderia induzir quimiotaxia de fibrócitos e a ativação de vias de sinalização que resultam na produção de colágeno, fibronectina e desenvolvimento de fibrose. Experimentos *in vitro* também mostraram que fibroblastos cardíacos humanos estimulados com IL-18 ativam vias de sinalização que estão envolvidas com a transcrição e a expressão do RNAm de fibronectina, sugerindo que IL-18 e fibronectina podem estar relacionadas ao processo de fibrose (Reddy *et al.*, 2008). Vale ressaltar que tanto na CCC como na CNI, observamos a presença de fibrose de grau moderado a intenso (Tabela 14) na ausência de TGF- β , portanto,

permanece a questão de quais são os mediadores que contribuem para a processo de fibrose na ausência de TGF- β . A expressão gênica aumentada de *CCL21/SLC* no grupo de pacientes com CNI e CCC (Figura 13A), a mediana significativamente diferente dos valores de Δ Ct de *CCR7* e a expressão aumentada de *IL-18* no grupo CCC (Figura 7A), aliados aos estudos mencionados sugere um papel adicional para esses mediadores atuando no processo de fibrose. A expressão aumentada de *IL-18*, *CCL21/SLC* e dos valores de Δ Ct de *CCR7* especificamente na CCC pode estar envolvida na fibrose particularmente intensa da CCC (Mady et al., 1999).

Chamou-nos a atenção o fato de quimiocinas como *CCL5/RANTES*, *CCL17/TARC*, *CCL19/ELC* e *CCL21/SLC* apresentarem regulação positiva em amostras de miocárdio de pacientes com CNI, ainda que, com exceção de *CCL21/SLC*, a expressão das demais quimiocinas seja significativamente menor que no grupo de pacientes com CCC (Figuras 9, 12 e 13). Corroborando estas observações, alguns estudos observaram a regulação positiva de quimiocinas na cardiomiopatia isquêmica (Dewald *et al.*, 2003; Frangogiannis *et al.*, 2002^b) e na cardiomiopatia dilatada (Aukrust *et al.*, 1998). A indução de quimiocinas pode ocorrer em resposta a injúria do miocárdio em várias situações. No infarto do miocárdio, a necrose celular pode desencadear vias que induzem a síntese de quimiocinas e que são reguladas através da geração de radicais livres, ativação de NF- κ B, liberação de TNF- α e ativação de complemento (revisado em Frangogiannis e Entman, 2004). Altas concentrações plasmáticas das quimiocinas *CCL2/MCP-1*, *CCL3/MIP-1 α* e *CCL5/RANTES* foram observadas em

pacientes com falência cardíaca congestiva, incluindo pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) (Aukrust *et al.*, 1998; Damas *et al.*, 2000). Nesse trabalho os níveis destas quimiocinas correlacionam com a severidade dos sintomas e com o grau de disfunção do ventrículo esquerdo (Aukrust *et al.*, 1998). Outro grupo mostrou a imuno-localização de CXCL8/IL-8 e CXCR4 em cardiomiócitos e em células vasculares do músculo liso, e a expressão gênica de mediadores como CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 α e receptores com CCR5 no miocárdio de pacientes com falência cardíaca (Damas *et al.*, 2000). Esses dados sugerem que a expressão local de quimiocinas produzidas pelo infiltrado inflamatório (CCC) ou tecido miocárdico (CNI) poderiam ter efeitos sobre os cardiomiócitos. Foi demonstrado que a angiotensina-II pode aumentar diretamente a expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas e seus receptores (Tham *et al.*, 2002), o que poderia explicar a presença de quimiocinas em doenças sem substrato inflamatório primário. Foi observado que a angiotensina-II, produzida durante a insuficiência cardíaca, induz diretamente a expressão de CCL2/MCP-1 (Chen *et al.*, 1998). Dados da literatura demonstram em ensaios *in vitro* que o pré-tratamento com angiotensina-II pode aumentar os efeitos de IL-18 sobre células vasculares do músculo liso, induzindo a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 e a expressão gênica de IL-6, CXCL8/IL-8 e CCL2/MCP-1 (Sahar *et al.*, 2005). Outro grupo demonstrou em modelo experimental que a administração intraperitoneal de angiotensina-II em ratos induz a produção de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES, o que também acontece quando células endoteliais

humanas são estimuladas com angiotensina-II (Mateo *et al.*, 2006). O sistema renina-angiotensina está presente em cardiomiócitos (Malhotra *et al.*, 1999) e foi demonstrado que CXCL10/IP-10 regula positivamente a expressão de componentes desse sistema e aumenta a liberação de angiotensina-II por células endoteliais *in vitro* (Ide *et al.*, 2008).

No miocárdio de pacientes com falência cardíaca, incluindo pacientes com CDI e cardiomiopatia isquêmica, observou-se uma inflamação crônica de baixo grau que foi confirmada pela presença abundante de macrófagos e menor número de linfócitos T CD3⁺ (Devaux *et al.*, 1997). Os autores também observaram a presença de ICAM-1 e PECAM-1 no miocárdio desses pacientes, e sugerem que independente da causa da falência cardíaca uma inflamação crônica de baixo grau está presente no miocárdio e pode contribuir para a deterioração funcional. Em conjunto, os dados acima sugerem que as quimiocinas podem contribuir para a patogênese da ICC, possivelmente atuando na inflamação crônica de baixo grau observada no miocárdio com ICC. A expressão de quimiocinas em pacientes com CNI em nosso estudo poderia refletir a secreção de mediadores inflamatórios pelas escassas células inflamatórias presentes no miocárdio ou mesmo por cardiomiócitos, angiotensina-II. A presença de algumas células CD3⁺ não descarta a possibilidade da presença de infiltrado inflamatório de baixo grau nestes pacientes (Figura 17), contudo não observamos marcação positiva para CCR5, CXCR3, CCL5/RANTES e CXCL9/Mig nestes pacientes por imunofluorescência, sugerindo que estas células podem não estar ativadas (Figuras 20, 21, 22 e 23). A análise quantitativa de células CD3⁺ e a

identificação de células CD68⁺ fornecerão a intensidade do infiltrado no miocárdio do grupo de pacientes com CNI.

Nós também avaliamos a expressão gênica de peptídeos natriuréticos, que são marcadores associados ao perfil de expressão gênica de hipertrofia de cardiomiócitos. Embora ambos estejam muito elevados no grupo de pacientes com CCC e CNI em relação ao grupo de doadores saudáveis, nossos resultados mostram que a expressão de *BNP* está aumentada significativamente em amostras de miocárdio de pacientes com CNI, enquanto a expressão de *ANF* é maior no grupo CCC (Figura 14). A hipertrofia cardíaca que acompanha a falência do miocárdio leva ao aumento da produção de ANF e BNP pelos ventrículos (Davidson *et al.*, 1996; Omland *et al.*, 1996). Pacientes com falência cardíaca crônica apresentam altas concentrações plasmáticas de ANF e BNP que correlacionam com a intensa disfunção do ventrículo (revisado em Puyó *et al.*, 2005). A expressão de ANF foi detectada por imunohistoquímica em ambos os ventrículos direito e esquerdo de pacientes com CCC (Benvenuti *et al.*, 2003), e elevadas concentrações de ANF e BNP foram encontradas na circulação de pacientes chagásicos crônicos com cardiomiopatia (Piazza *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 1997; Ribeiro e Rocha 1998). Neste sentido, a expressão gênica aumentada de *ANF* e *BNP* corrobora a significativa hipertrofia de cardiomiócitos em ambos os grupos estudados (CCC e CNI).

Observamos grandes diferenças de magnitude de expressão gênica global entre amostras de diferentes pacientes (Tabela 10), e nos questionamos se as diferenças se deviam à heterogeneidade do infiltrado

em cada região do tecido ou se representavam padrões de inflamação diferenciais, mantidos no indivíduo. A concordância e correlação positiva entre a expressão gênica medida em diferentes fragmentos de miocárdio de cada paciente com CCC mostrou que as diferenças quantitativas observadas entre amostras de diferentes pacientes representa padrões de inflamação mantidos no indivíduo (Tabelas 12 e 13). Vale ressaltar que a principal característica do tecido cardíaco na CCC é a presença de uma miocardite difusa com aspectos focais, com blocos de fibrose cicatricial, conferindo heterogeneidade significativa à lesão cardíaca, até mesmo em exame macroscópico. Portanto, as pequenas diferenças de valores de expressão gênica encontradas em amostras obtidas de sítios diferentes de cada coração são consistentes com esse infiltrado inflamatório que é heterogêneo.

Nossos resultados, aliados aos dados da literatura, permitem a elaboração da seguinte hipótese: Durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, células T CD4⁺ e T CD8⁺ são ativadas, diferenciadas em linfócitos de fenótipo Th1 e expandidas na periferia (Sun e Tarleton, 1993) por macrófagos e/ou células dendríticas apresentando antígenos de *T. cruzi*, o que induz a produção de citocinas e a expressão de moléculas co-estimulatórias. Essas células T CD8⁺ e T CD4⁺ de fenótipo Th1 co-expressam receptores como CCR7, CCR5 e CXCR3 (Gomes *et al.*, 2005) e migram para o tecido cardíaco atraídas pela expressão de CCL19/ELC (ligante de CCR7) nas vênulas pós-capilares do tecido cardíaco inflamado e também por quimiocinas como CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES (ligantes de CCR5), que são produzidas por cardiomiócitos

infectados pelo *T. cruzi* e macrófagos (Aliberti *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2000). Adicionalmente, a expressão *in situ* de CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10, ligantes de CXCR3 e produzidos sob o efeito de IFN- γ produzido pelos primeiros linfócitos T infiltrantes, também estaria envolvida na migração e acumulação de mais células T CXCR3⁺ CCR5⁺ infiltrantes, que podem participar da resposta imune contra o *T. cruzi*. Conforme o parasitismo diminui no tecido cardíaco, a inflamação persistente da fase crônica da doença de Chagas pode ser mantida por citocinas inflamatórias com IFN- γ (Reis *et al.*, 1997; Abel *et al.*, 2001) produzido por células T CD4⁺ e T CD8⁺ intralesionais, que reconhecem antígenos do parasita ou epitopos de reação cruzada com proteínas cardíacas constitutivamente apresentadas por células dendríticas intersticiais (Cunha-Neto *et al.*, 1996; Fonseca *et al.*, 2005). Em paralelo, a expressão de IFN- γ poderia induzir a produção de outras citocinas, como IL-18 (Iwai *et al.*, 2008) e IL-15, que poderiam amplificar o processo induzindo a expressão de IFN- γ e mantendo a sobrevivência de células T CD8⁺ (Fonseca *et al.*, 2007). IL-18 e IFN- γ , isoladamente ou em sinergismo com outros mediadores, poderiam potencializar a expressão de quimiocinas como CCL5/RANTES, CXCL9/Mig e CXCL10/IP-10 (Bacon *et al.* 1995; Rathanaswani *et al.*, 1995; Farber, 1997) que atuariam mantendo o recrutamento de células T para o miocárdio. Este mecanismo poderia levar a manutenção do influxo de células inflamatórias de perfil Th1 para o tecido cardíaco de pacientes com CCC. Não podemos excluir que células de perfil Th2 CCR4⁺, geradas durante o parasitismo intenso, possam ser atraídas para o miocárdio pela expressão

de CCL17/TARC, contudo a ausência de detecção de IL-4 e IL-13 sugere que essas células não são funcionais. Alternativamente, células de perfil Th1 poderiam co-expressar o receptor CCR4 (Figura 25).

A expressão gênica aumentada de IL-18 e de quimiocinas e seus receptores no miocárdio de pacientes com CCC contribuem para a migração e acúmulo de células de perfil nitidamente Th1 e as correlações positivas observadas entre esses mediadores e receptores sugerem um *feedback* positivo atuando na manutenção e amplificação do processo inflamatório, possivelmente em associação com outros mediadores expressos no miocárdio, na ausência de um controle na forma de células Treg ou células Th2 funcionais, gerando uma resposta inflamatória Th1 galopante. A expressão de IL-18 e CCL21/SLC poderia estar associada ao desenvolvimento de hipertrofia e fibrose sugerindo um papel adicional para a expressão desses mediadores no grupo de pacientes com CCC (Figura 26).

Embora a resposta inflamatória seja mais intensa no grupo de pacientes com CCC em relação ao grupo de pacientes com CNI, as amostras de miocárdio de pacientes com CCC aqui estudadas apresentam diferenças na intensidade da miocardite e também diferenças na magnitude de expressão dos genes associados ao processo inflamatório. Essas diferenças sugerem que uma menor resposta inflamatória não é suficiente para impedir que esses pacientes evoluam para a forma grave, cuja única alternativa é o transplante cardíaco. Entretanto, alguns mecanismos poderiam explicar esta observação: a) esses pacientes sejam menos dependentes de mecanismos inflamatórios; b) esses pacientes apresentaram uma resposta inflamatória

exacerbada no momento anterior a nossa coleta; ou c) esses pacientes sejam mais sensíveis, onde mesmo com a menor produção de mediadores inflamatórios eles apresentem uma resposta intensa que poderia ser justificada por algum polimorfismo. A resposta inflamatória intensa, secundária à produção de diversos mediadores inflamatórios no tecido cardíaco de pacientes com CCC na ausência de regulação, pode fornecer uma possível explicação para o pior prognóstico observado nestes pacientes quando comparados aos pacientes com CNI.

Os resultados obtidos durante esta tese, do estudo do perfil de expressão de mediadores inflamatórios e seus receptores, permitem identificar os fatores que contribuem para a composição do infiltrado inflamatório, migração e acúmulo das células inflamatórias dentro do tecido cardíaco na CCC. A identificação de alguns mediadores inflamatórios diferencialmente expressos entre os grupos estudados abre novas questões sobre os efeitos biológicos desses mediadores na patologia da CCC e também em cardiomiopatias de etiologia não inflamatória. Diferenças genéticas combinadas com fatores ambientais e fatores relacionados ao parasita podem ser a razão para as diferenças encontradas nestes pacientes com CCC, e uma possível explicação para os mecanismos envolvidos na evolução da doença. O desenvolvimento de novas terapias que inibam o dano cardíaco em pacientes com CCC ou CNI, em especial mecanismos dependentes de migração de células inflamatórias, pode ser favorecido com a identificação desses alvos específicos e o estudo dos seus efeitos biológicos.

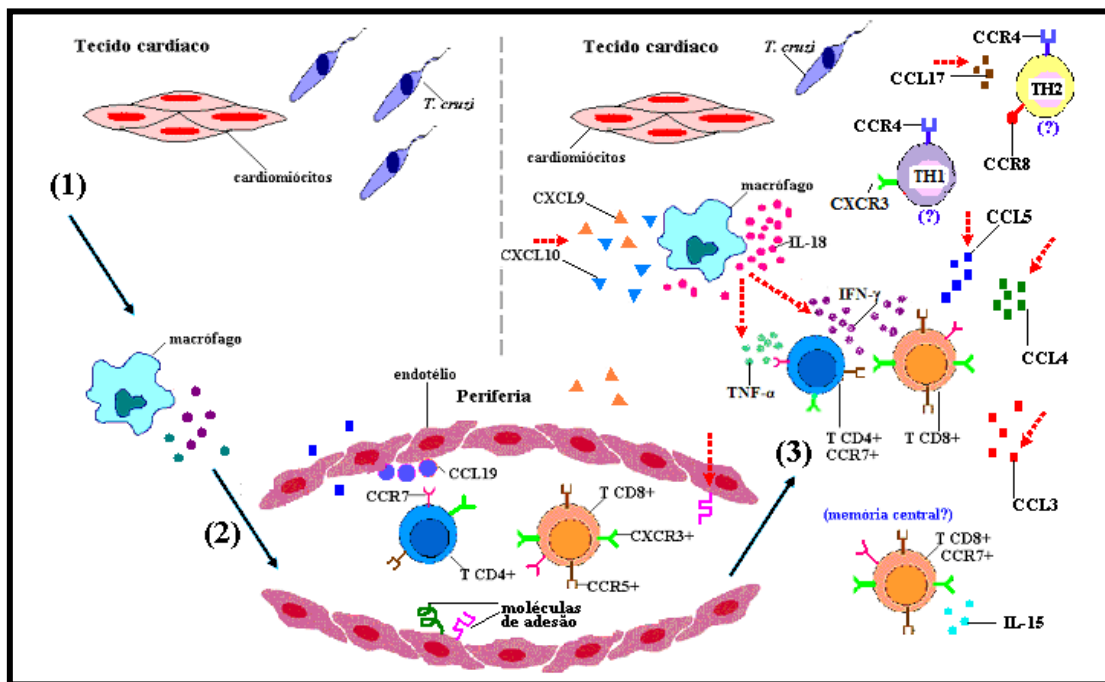


Figura 25. Processo inflamatório no tecido cardíaco de pacientes com CCC. (1) O estabelecimento de uma resposta inflamatória é importante para o controle do parasitismo intenso característico da fase aguda. (2) Células efetoras da imunidade celular são ativadas e expandidas na periferia durante a fase aguda. (3) A resposta inflamatória pode acarretar o desenvolvimento de uma cardiomiopatia de natureza inflamatória na fase crônica (CCC) com baixo parasitismo. A persistência da inflamação pode ser mantida por mediadores inflamatórios, tais como, citocinas e quimiocinas que atraem células efetoras e de memória para o tecido cardíaco. A presença de um infiltrado inflamatório poderia ser desencadeada pelos 'raros' reaparecimentos do *T. cruzi*. Setas vermelhas indicam aumento da expressão/produção de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão.

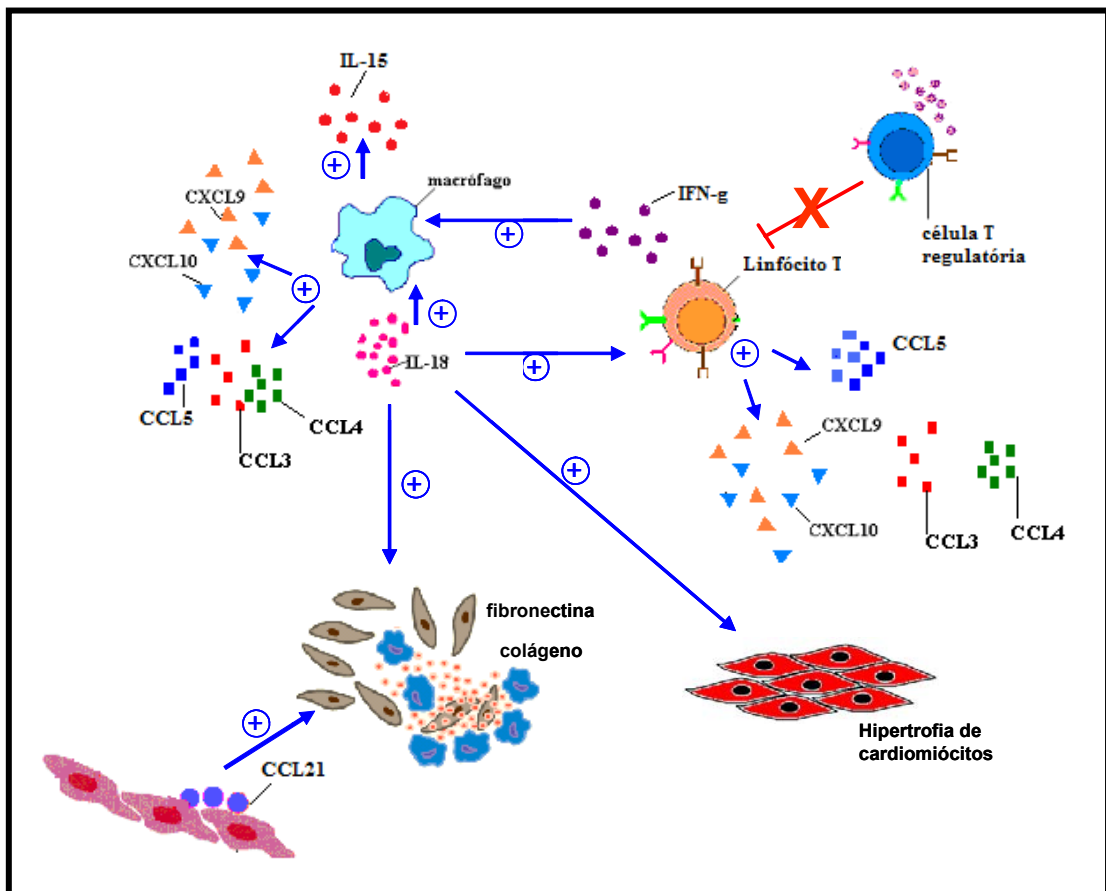


Figura 26. Processos envolvidos na migração células e manutenção do processo inflamatório no tecido cardíaco de pacientes com CCC, que ocorrem na ausência de regulação e os mediadores expressos *in situ* poderiam estar envolvidos no desenvolvimento de fibrose e hipertrofia.

6. CONCLUSÕES

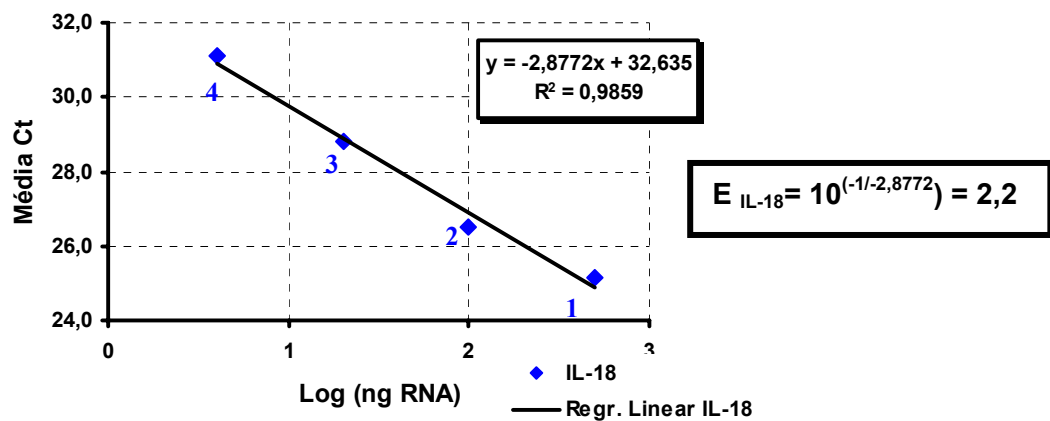
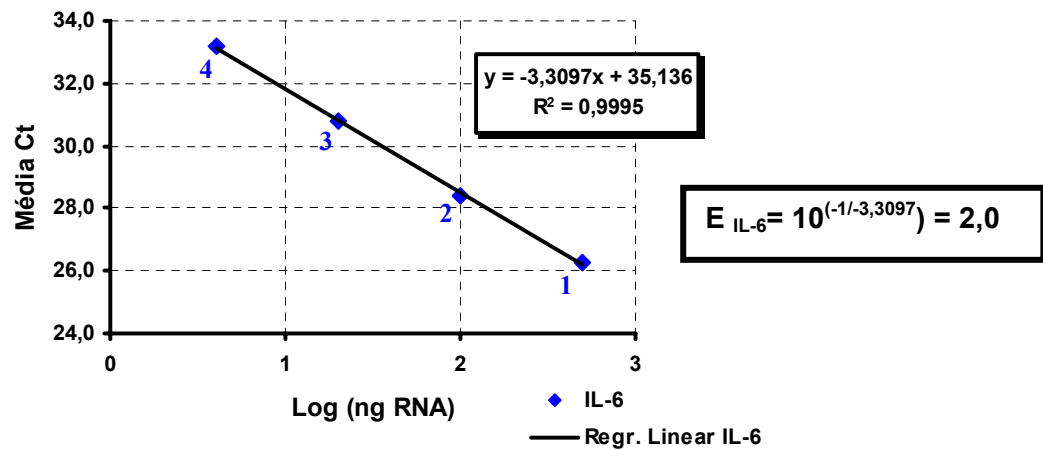
1. Neste trabalho, a investigação da expressão gênica local de 28 genes permitiu identificar a expressão diferencial de citocinas do padrão pró-inflamatório, Th1, Th2 e regulatório, e de quimiocinas envolvidas com a migração diferencial de linfócitos T de memória e do fenótipo Th1/Th2, bem como dos receptores de tais quimiocinas em amostras de miocárdio de pacientes com CCC em relação a amostras de pacientes com CNI.
2. A expressão diferencial dos genes aqui estudados sugere que o processo inflamatório no tecido cardíaco de pacientes com CCC poderia ser amplificado pela expressão de mediadores como IL-18, que poderia apresentar um papel adicional na indução de hipertrofia de cardiomiócitos e processo de fibrose.
3. A expressão gênica aumentada das quimiocinas *CCL3/MIP-1 α* , *CCL4/MIP-1 β* , *CCL5/RANTES*, *CXCL9/Mig* e *CXCL10/IP-10* sugere que essas quimiocinas poderiam atrair células CCR5⁺ e células T CXCR3⁺ para o tecido cardíaco inflamado, onde observamos a presença de células mononucleares CCR5⁺ e CXCR3⁺.

4. O perfil Th1 é predominante no grupo de pacientes com CCC, contudo, a expressão aumentada de *CCR4* sugere que células de perfil Th2 – ou células do perfil Th1 expressando *CCR4* – também poderiam ser atraídas pela expressão de *CCL17/TARC* (ligante de *CCR4*) para o tecido cardíaco de pacientes com CCC.
5. A expressão aumentada de *CCL19/ELC* e sua correlação positiva com a intensidade de miocardite no grupo de pacientes com CCC sugerem que a presença de *CCL19/ELC* é importante para a migração de células *CCR7*⁺, possivelmente de fenótipo de memória, para o tecido cardíaco de pacientes com CCC.
6. A expressão diminuída de *TGF-β* no grupo de pacientes com CCC e a expressão equivalente dos valores de ΔCt de *Foxp3* nos grupos CCC e CNI, sugerem a ausência de regulação por células T regulatórias no miocárdio de pacientes com CCC.
7. A expressão aumentada de *CCL21/SLC* e a mediana significativamente diferente dos valores de ΔCt de *CCR7* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC, sugere um papel adicional para esses mediadores atuando no processo de fibrose.
8. A regulação positiva de *IL-18* e *CCL21/SLC* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC sugere um papel adicional para a expressão desses mediadores, possivelmente associado aos processos de hipertrofia e fibrose.

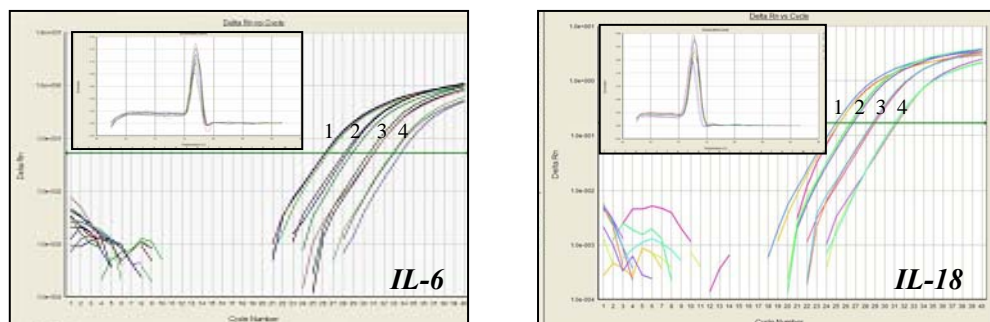
7. ANEXOS

ANEXO A

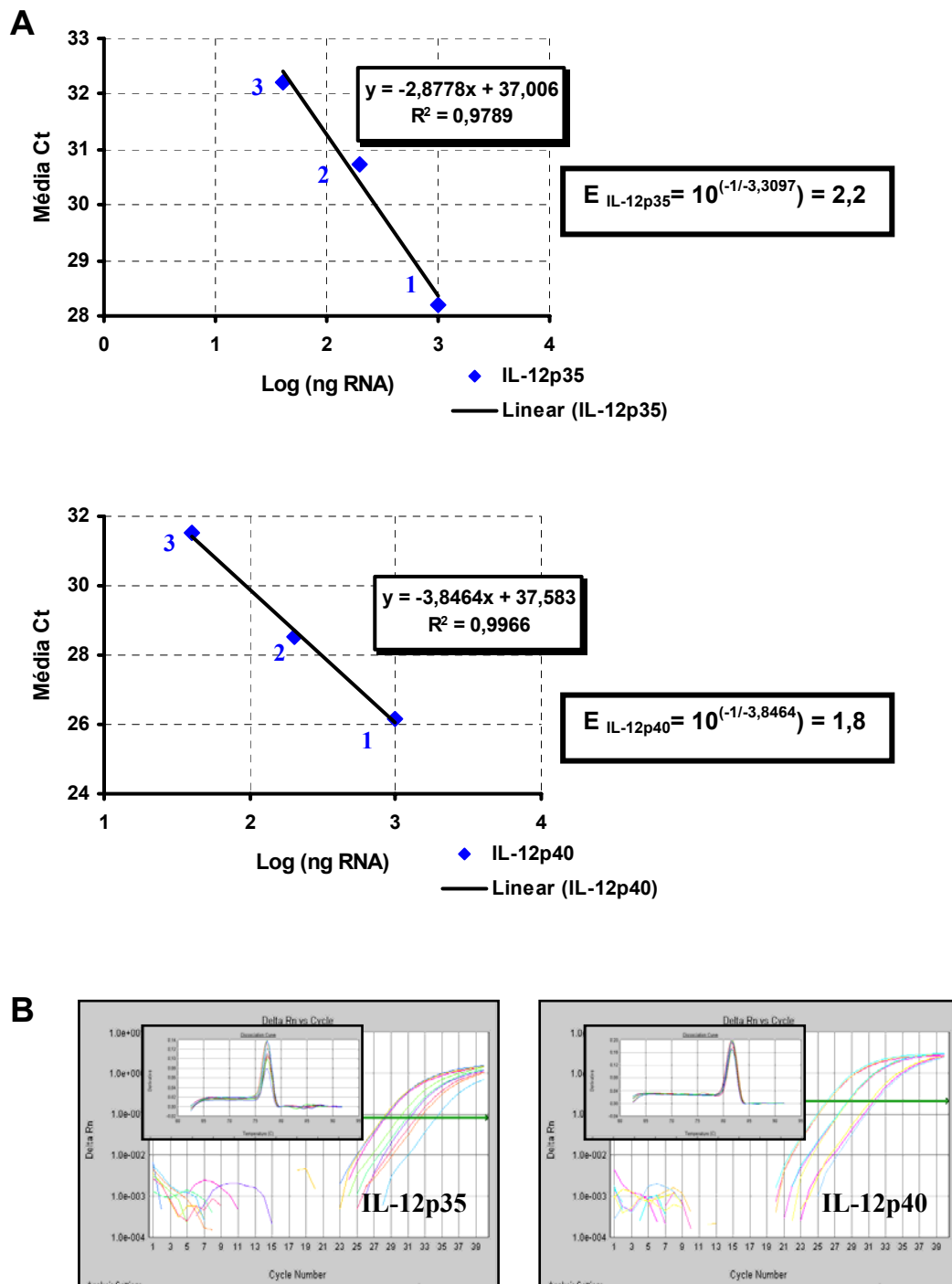
A



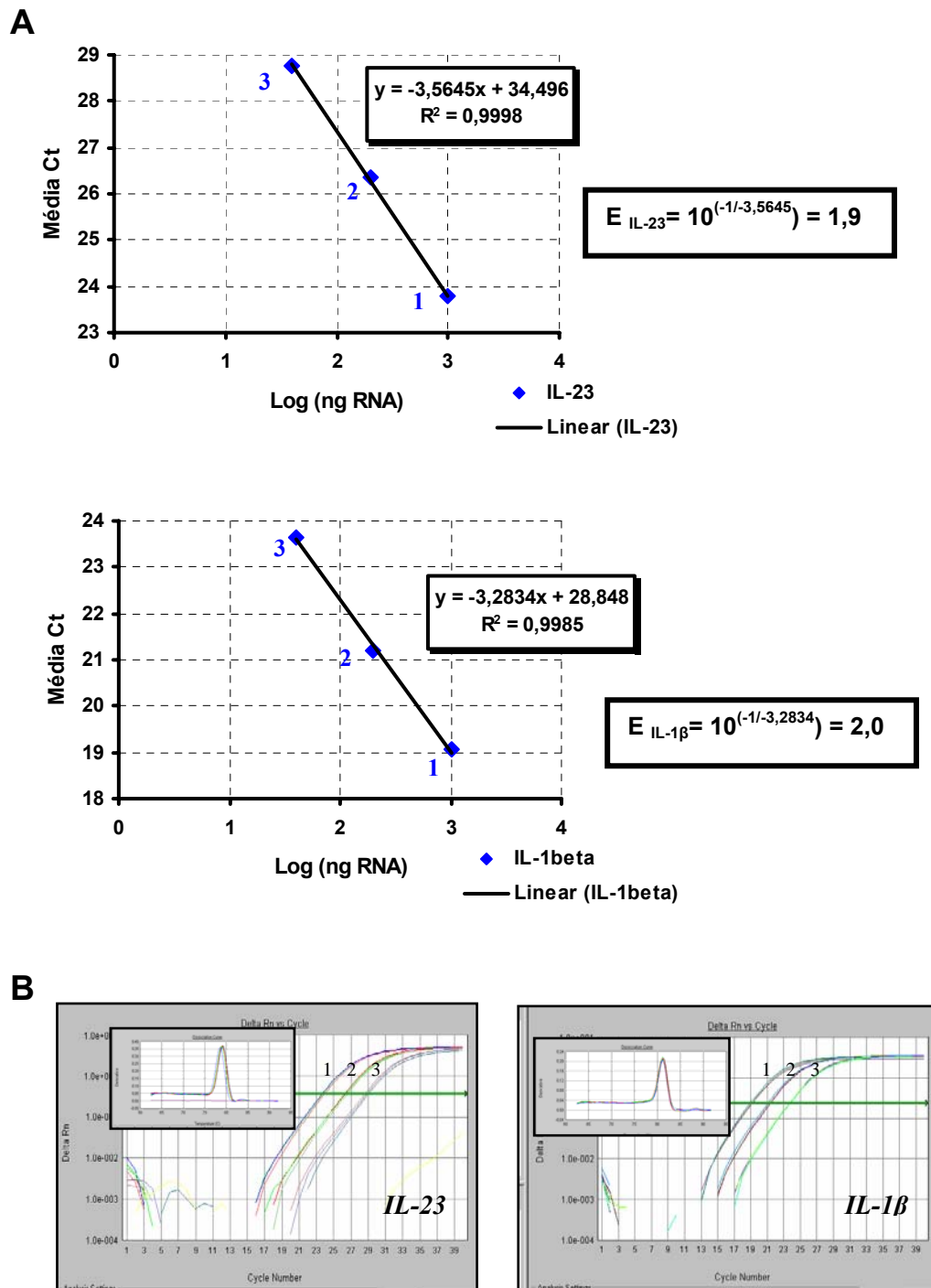
B



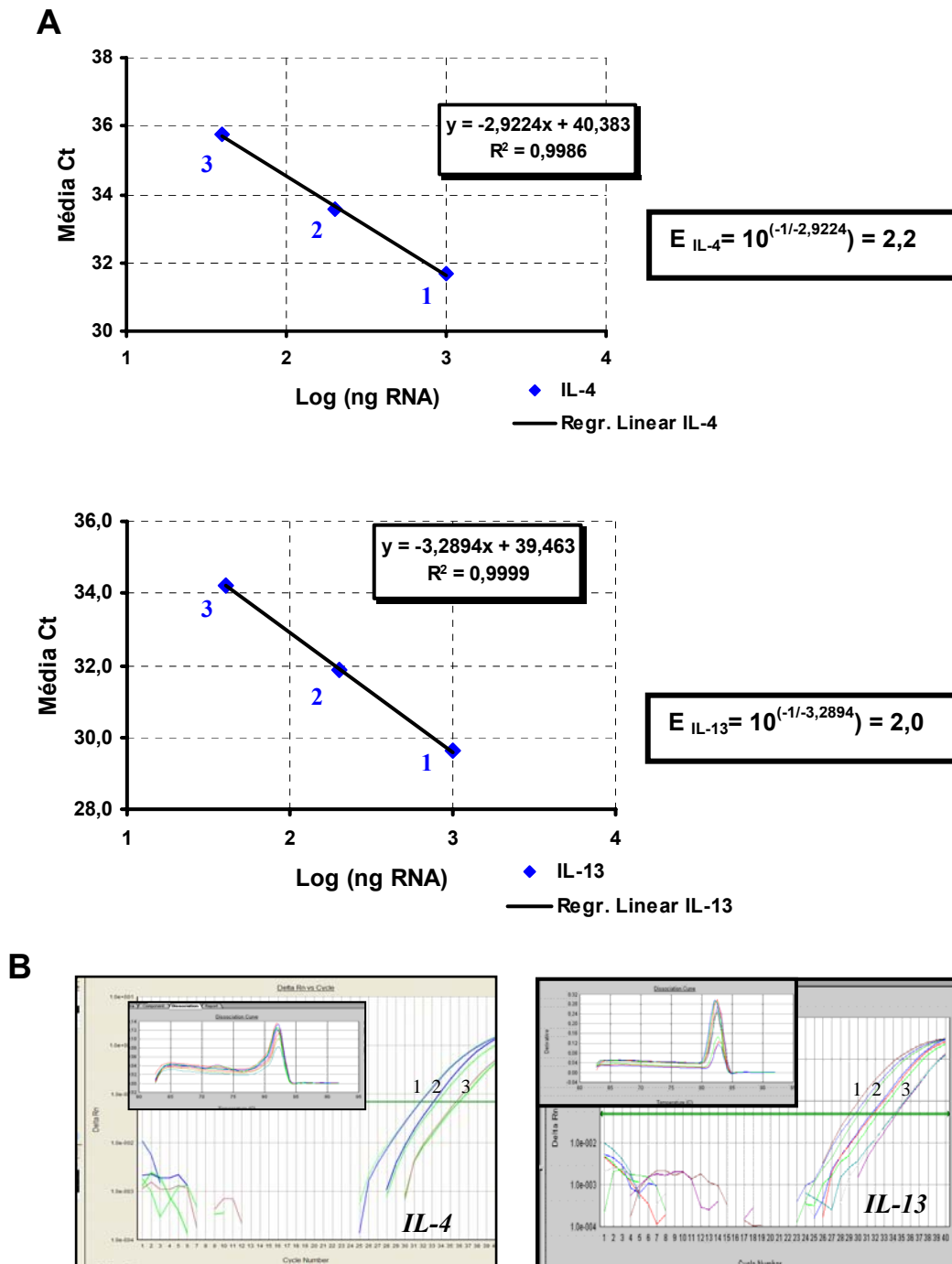
Cálculo da eficiência para os genes de IL-6 e IL-18. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4 cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA), como descrito no Material e Métodos.



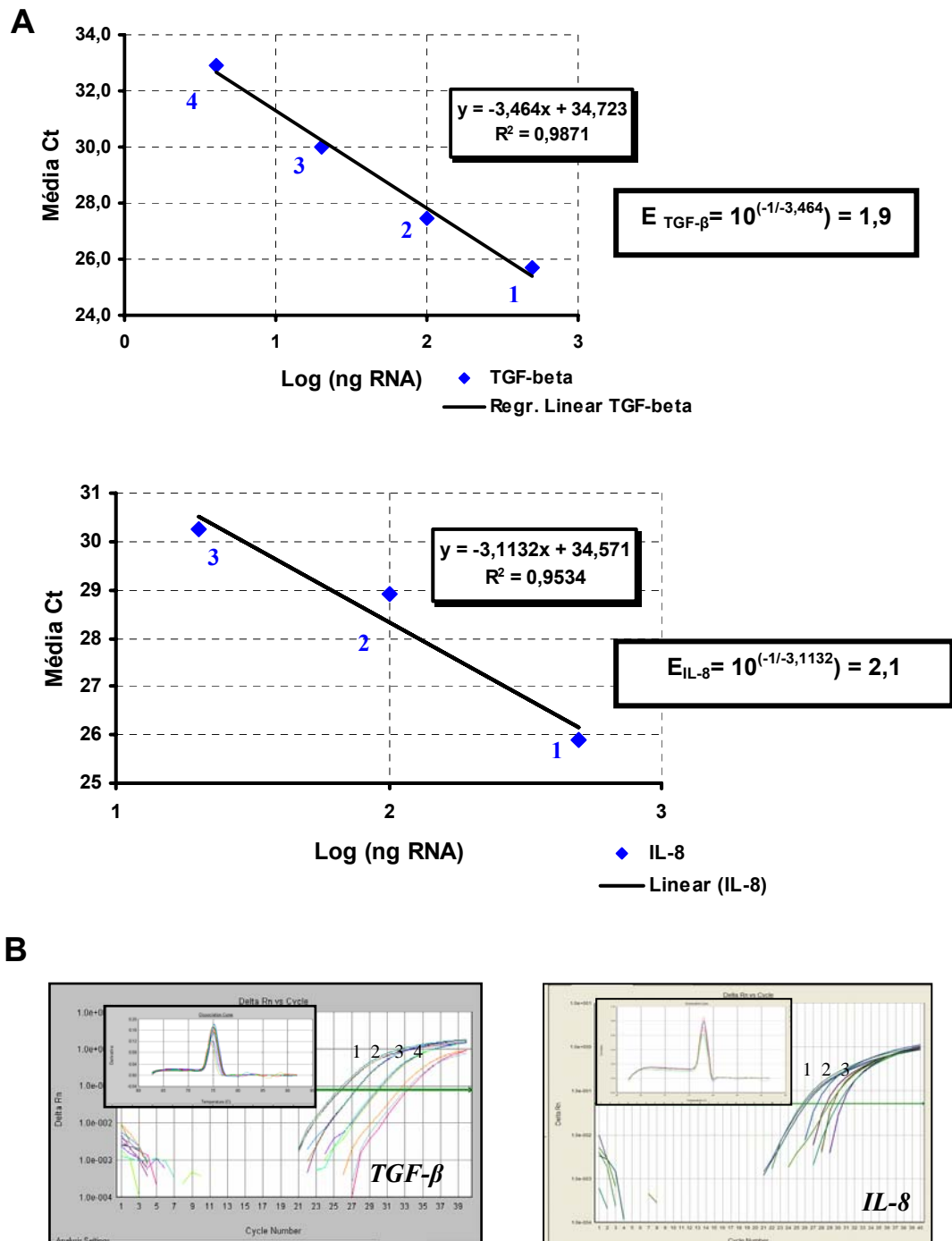
Cálculo da eficiência para os genes de *IL-12p35* e *IL-12p40*. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/5 (1000ng RNA); 2 cDNA diluído 1/25 (200ng RNA); 3 cDNA diluído 1/125 (40ng RNA), como descrito no Material e Métodos.



Cálculo da eficiência para os genes de *IL-1β* e *IL-23*. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/5 (1000ng RNA); 2 cDNA diluído 1/25 (200ng RNA); 3 cDNA diluído 1/125 (40ng RNA), como descrito no Material e Métodos.

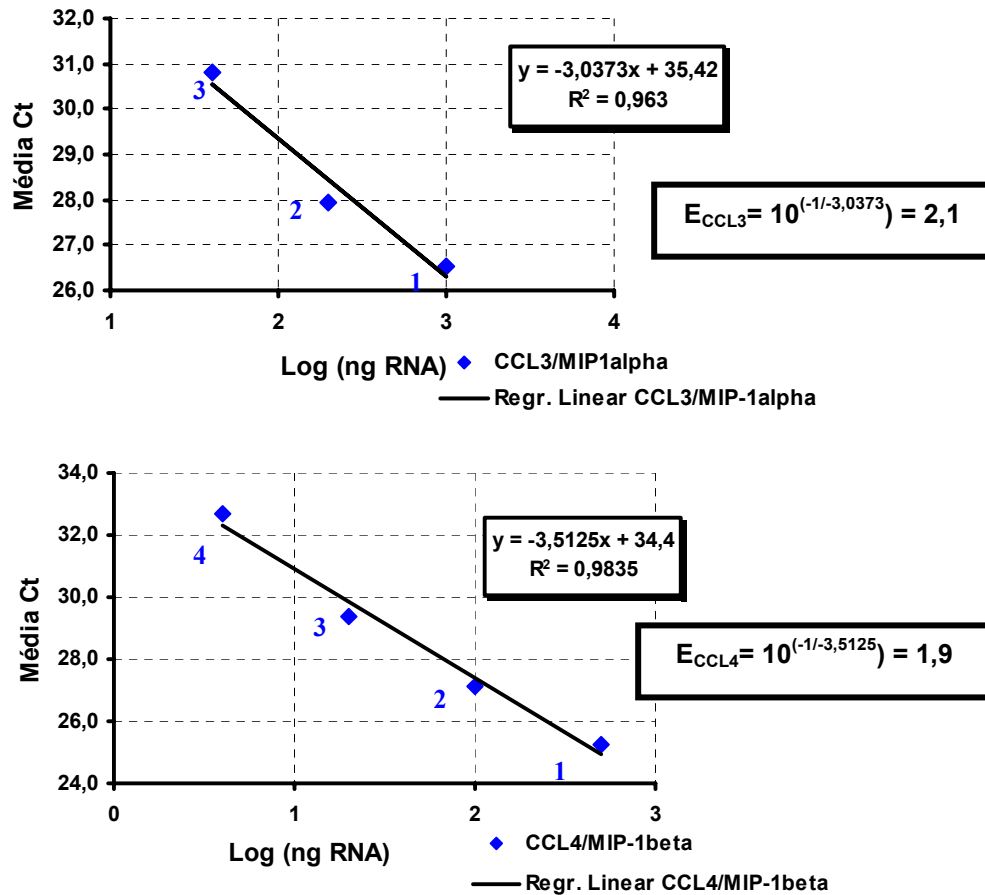


Cálculo da eficiência para os genes de IL-4 e IL-13. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/5 (1000ng RNA); 2 cDNA diluído 1/25 (200ng RNA); 3 cDNA diluído 1/125 (40ng RNA), como descrito no Material e Métodos.

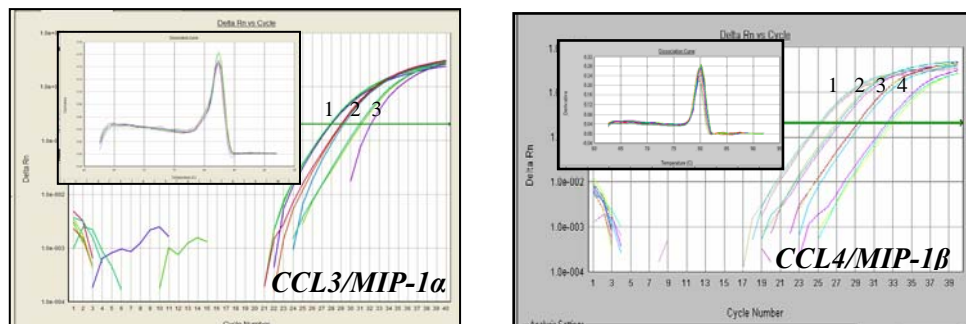


Cálculo da eficiência para os genes de *TGF-β* e *IL-8*. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4 cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA), como descrito no Material e Métodos.

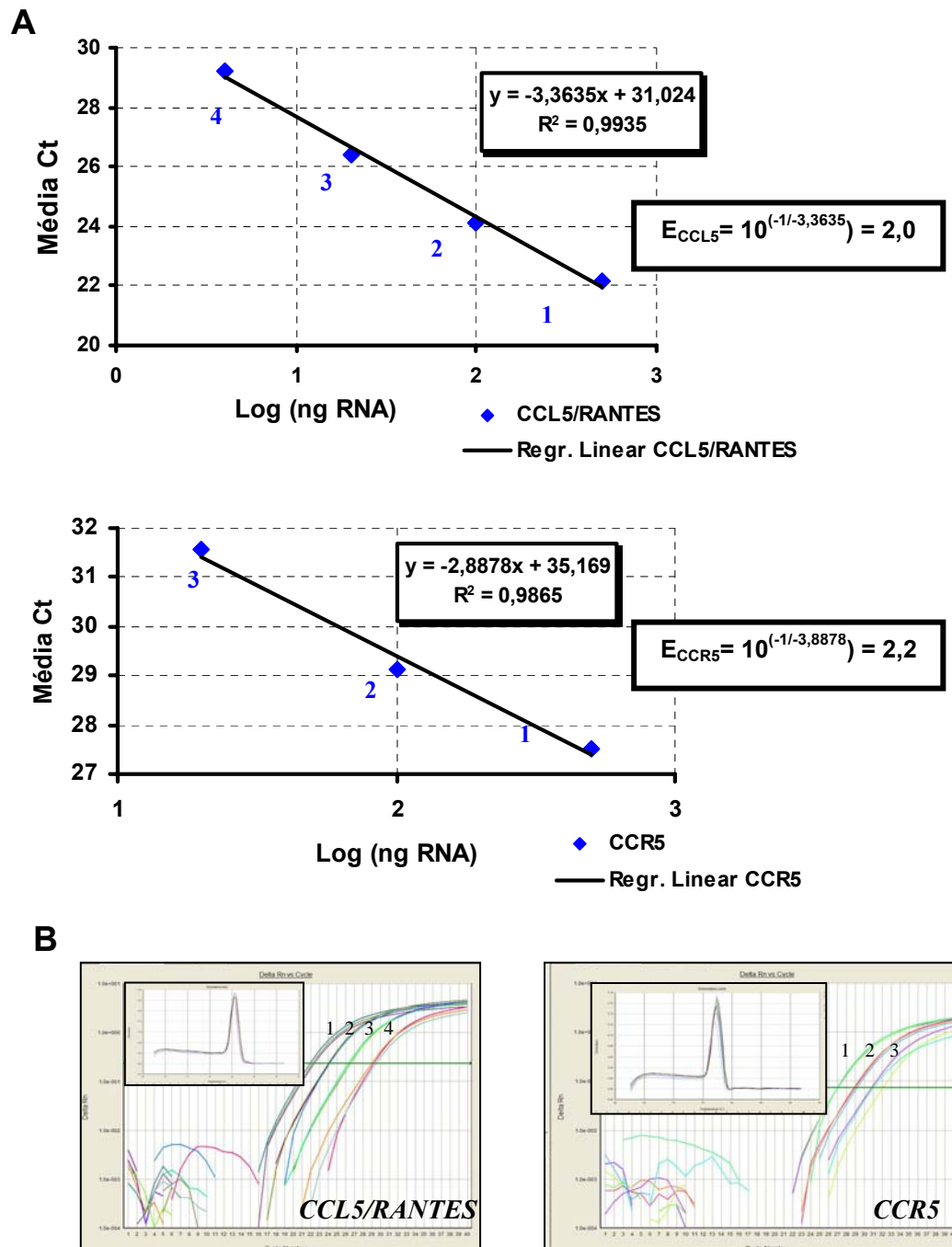
A



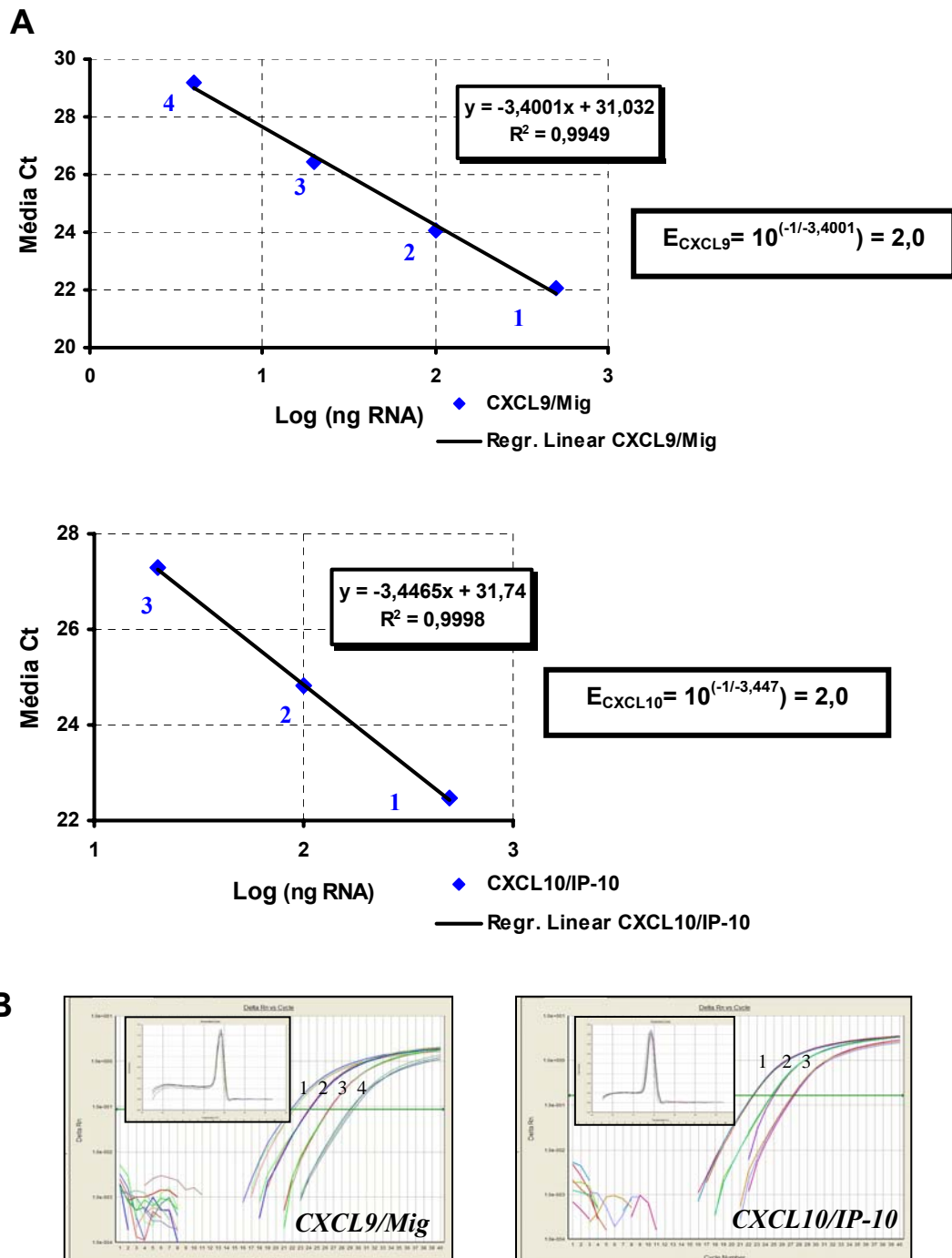
B



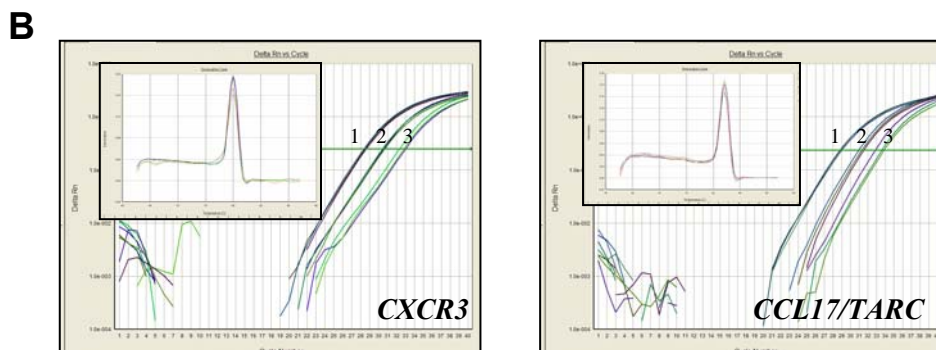
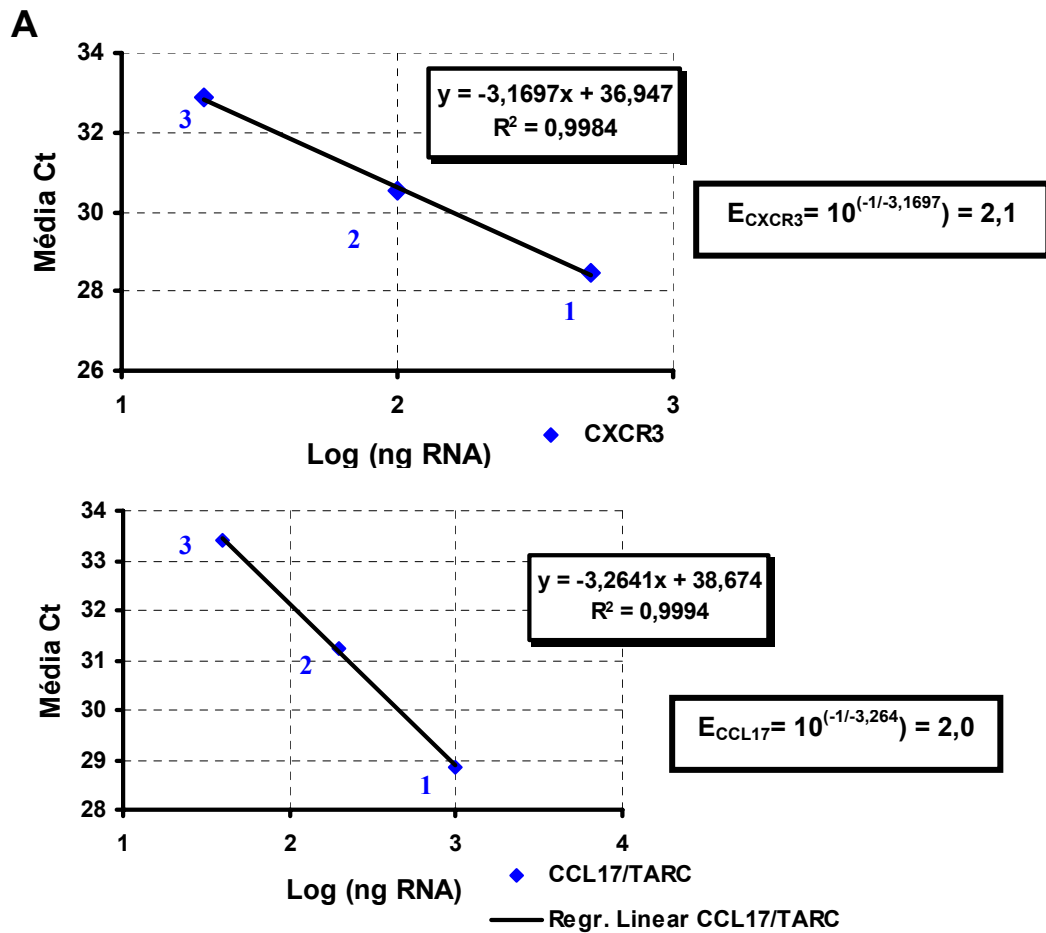
Cálculo da eficiência para os genes de *CCL3/MIP-1α* e *CCL4/MIP-1β*. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição para *CCL3/MIP-1α*: 1 cDNA diluído 1/5 (1000ng RNA); 2 cDNA diluído 1/25 (200ng RNA); 3 cDNA diluído 1/125. Quantidade de RNA presente em cada diluição para *CCL4/MIP-1β*: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4 cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA), como descrito no Material e Métodos.



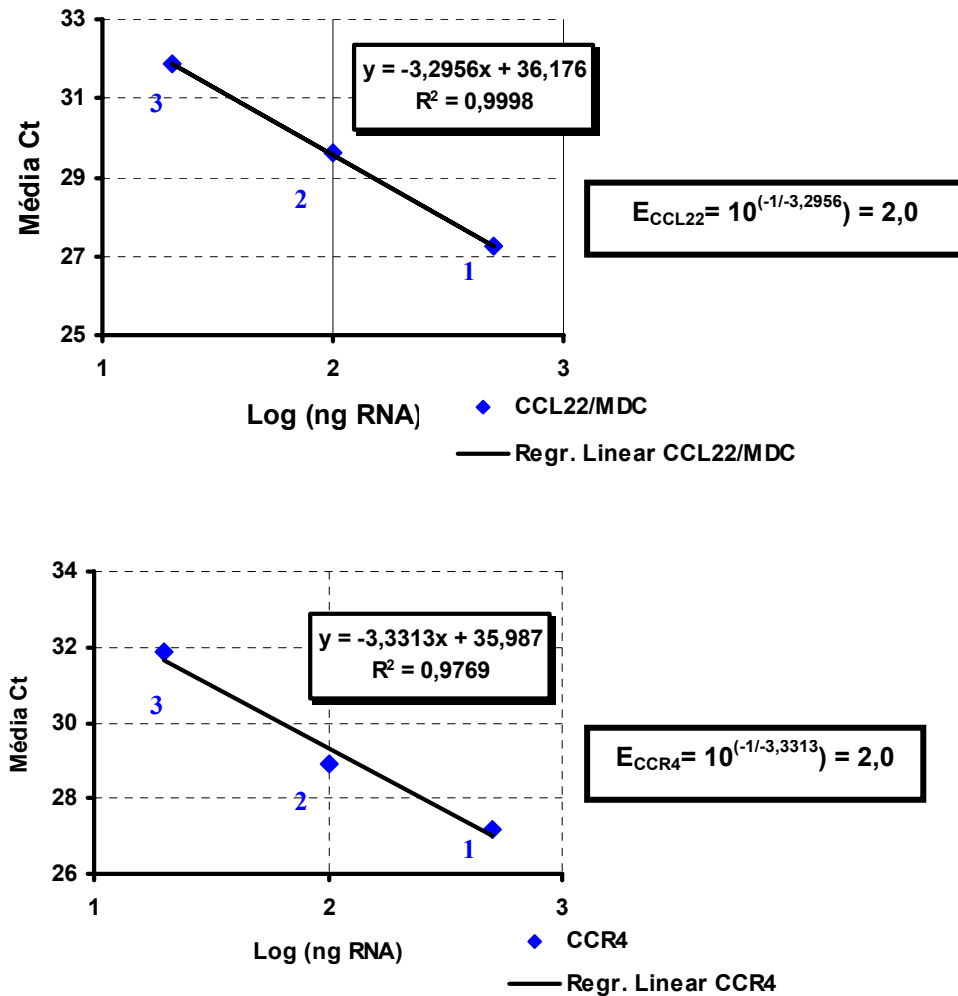
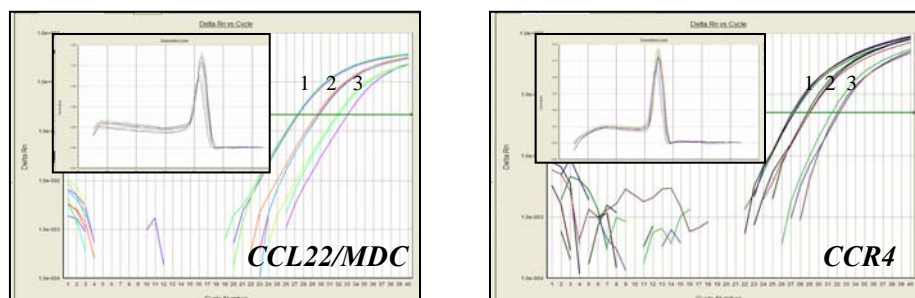
Cálculo da eficiência para os genes de *CCL5/RANTES* e *CCR5*. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4 cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA), como descrito no Material e Métodos.



Cálculo da eficiência para os genes de CXCL9/Mig e CXCLC10/IP-10. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4 cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA), como descrito no Material e Métodos.

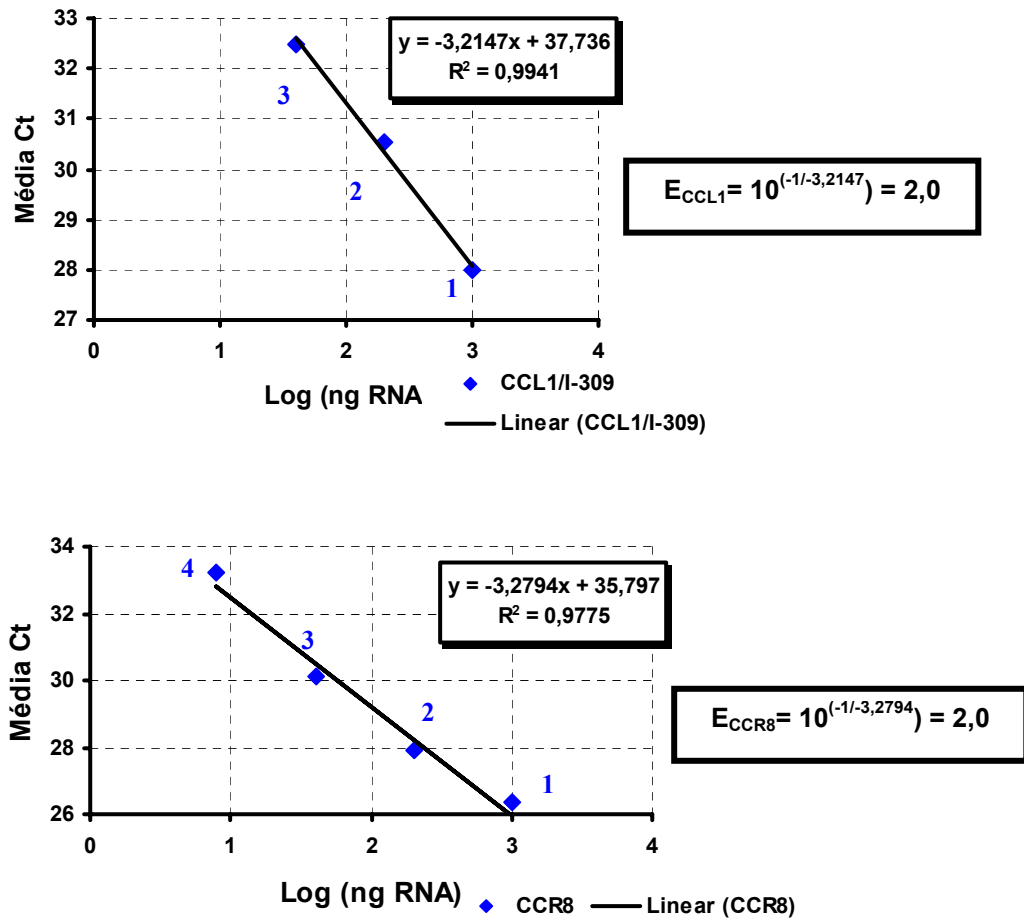


Cálculo da eficiência para os genes de CXCR3 e CCL17/TARC. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição para CXCR3: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA). Quantidade de RNA presente em cada diluição para CCL17/TARC: 1 cDNA diluído 1/5 (1000ng RNA); 2 cDNA diluído 1/25 (200ng RNA); 3 cDNA diluído 1/125, como descrito no Material e Métodos.

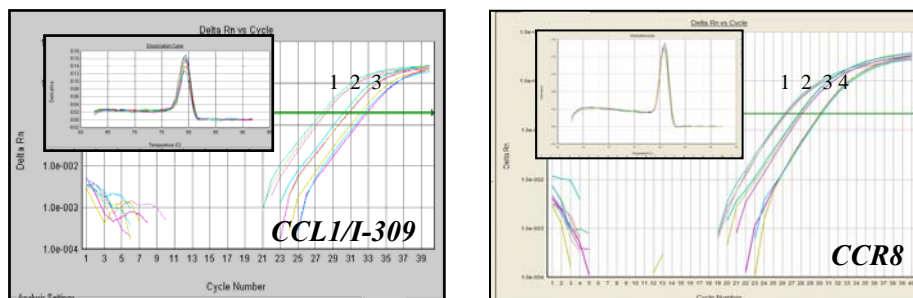
A**B**

Cálculo da eficiência para os genes de *CCL22/MDC* e *CCR4*. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA), como descrito no Material e Métodos.

A

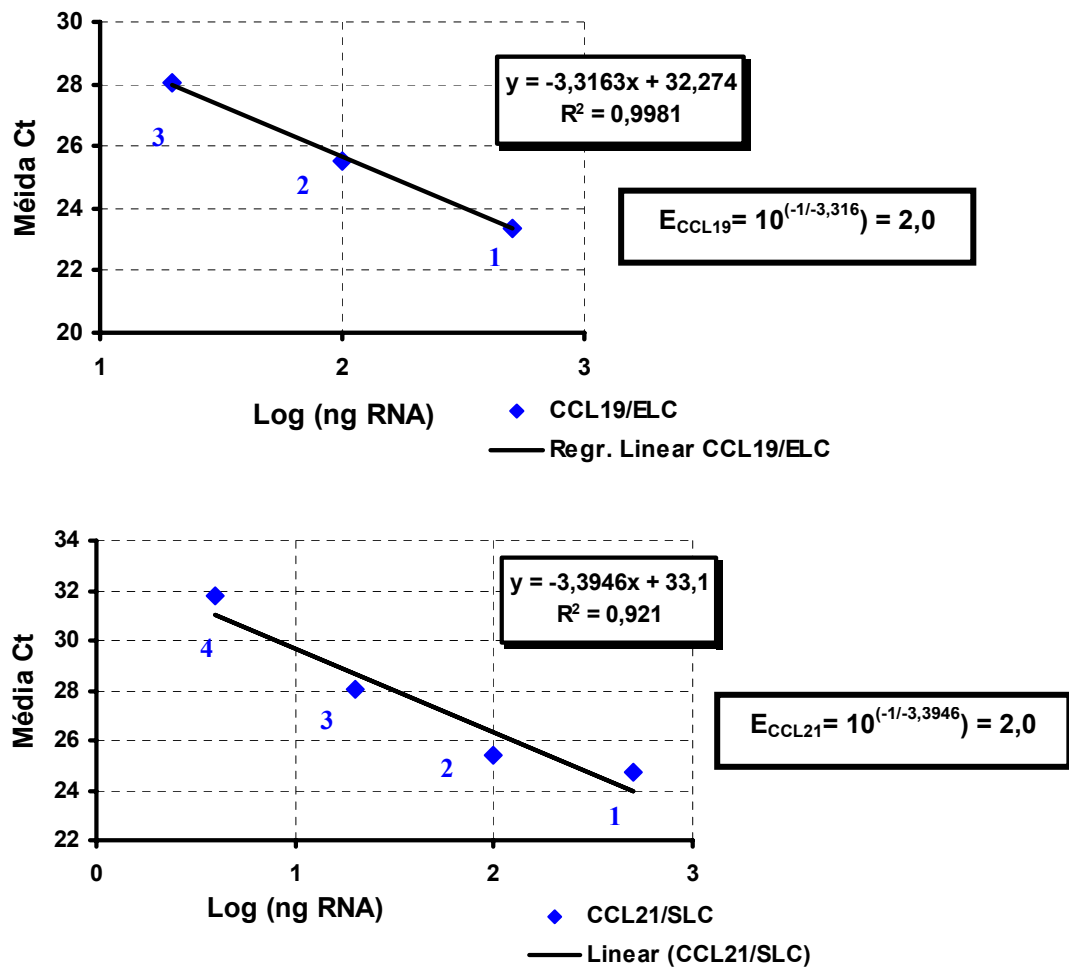


B

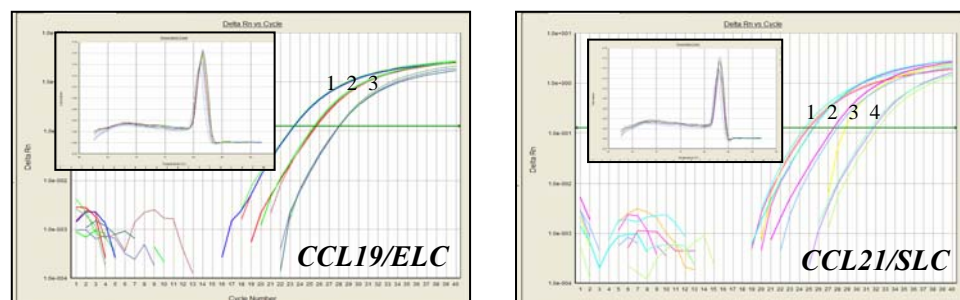


Cálculo da eficiência para os genes de *CCL1/I-309* e *CCR8*. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/5 (1000ng RNA); 2 cDNA diluído 1/25 (200ng RNA); 3 cDNA diluído 1/125; 4 cDNA diluído 1/625 (8ng RNA), como descrito no Material e Métodos.

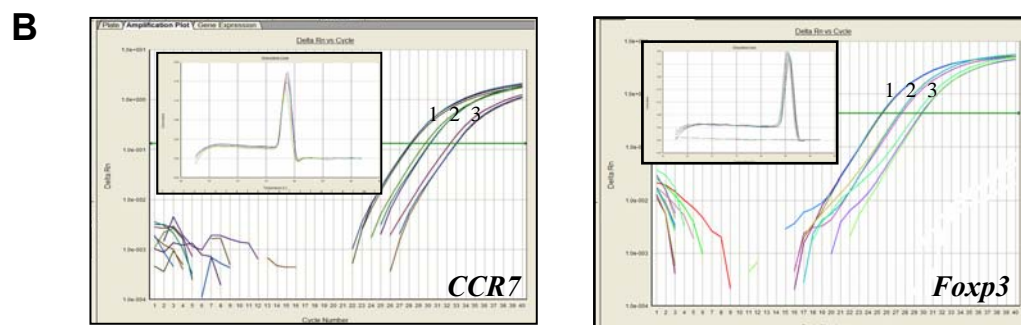
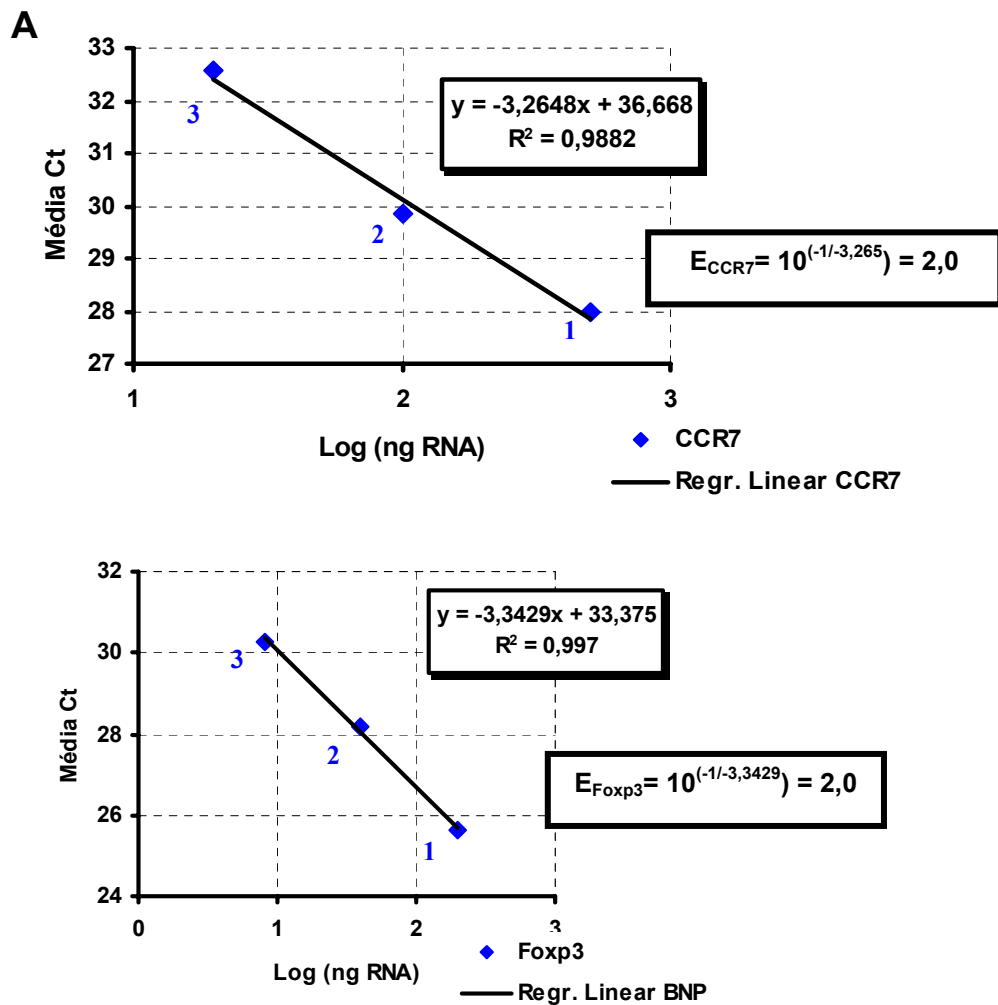
A



B

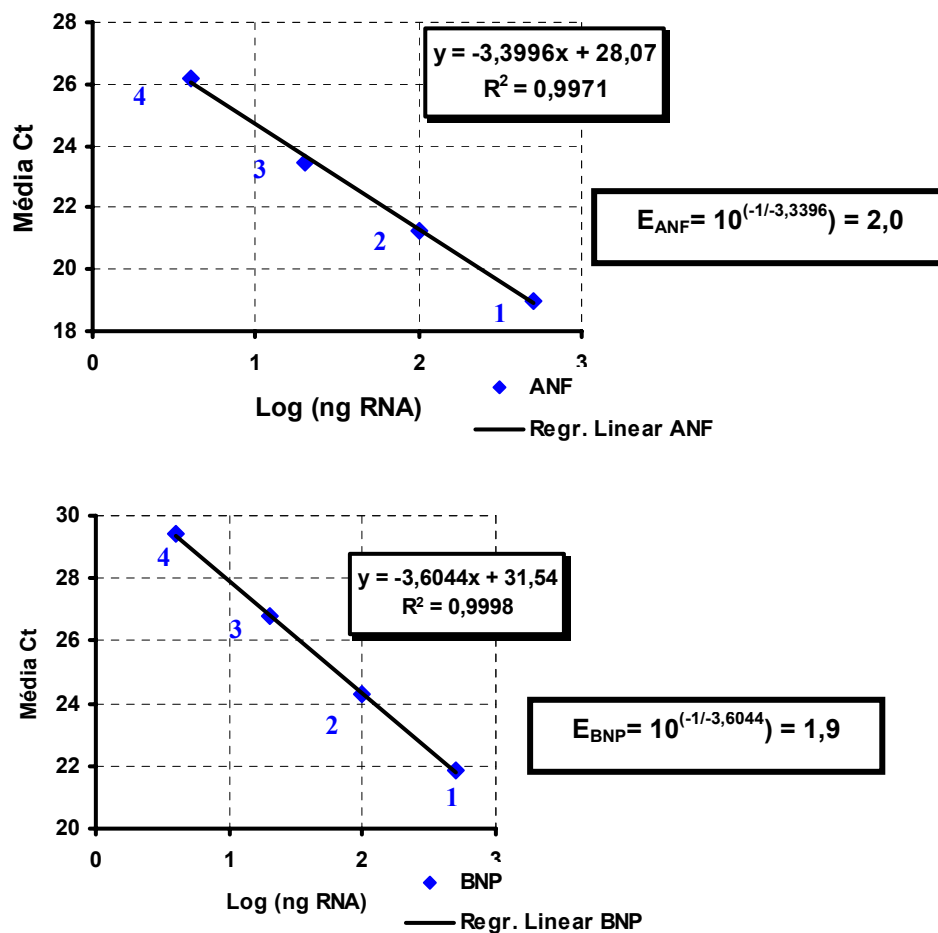


Cálculo da eficiência para os genes de *CCL19/ELC* e *CCL21/SLC*. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4 cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA), como descrito no Material e Métodos

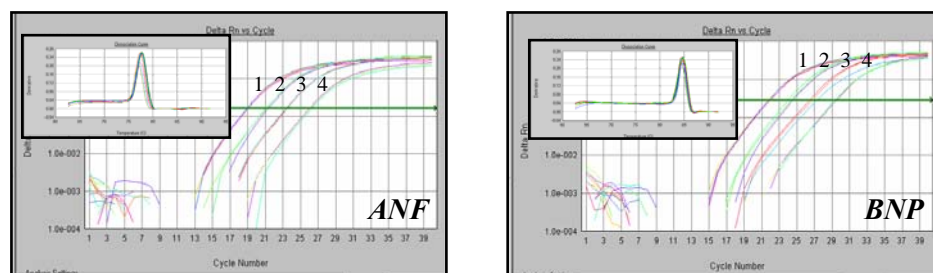


Cálculo da eficiência para os genes de *CCR7* e *Foxp3*. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição para *CCR7*: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA). Quantidade de RNA presente em cada diluição para *Foxp3*: 1 cDNA diluído 1/5 (1000ng RNA); 2 cDNA diluído 1/25 (200ng RNA); 3 cDNA diluído 1/125, como descrito no Material e Métodos.

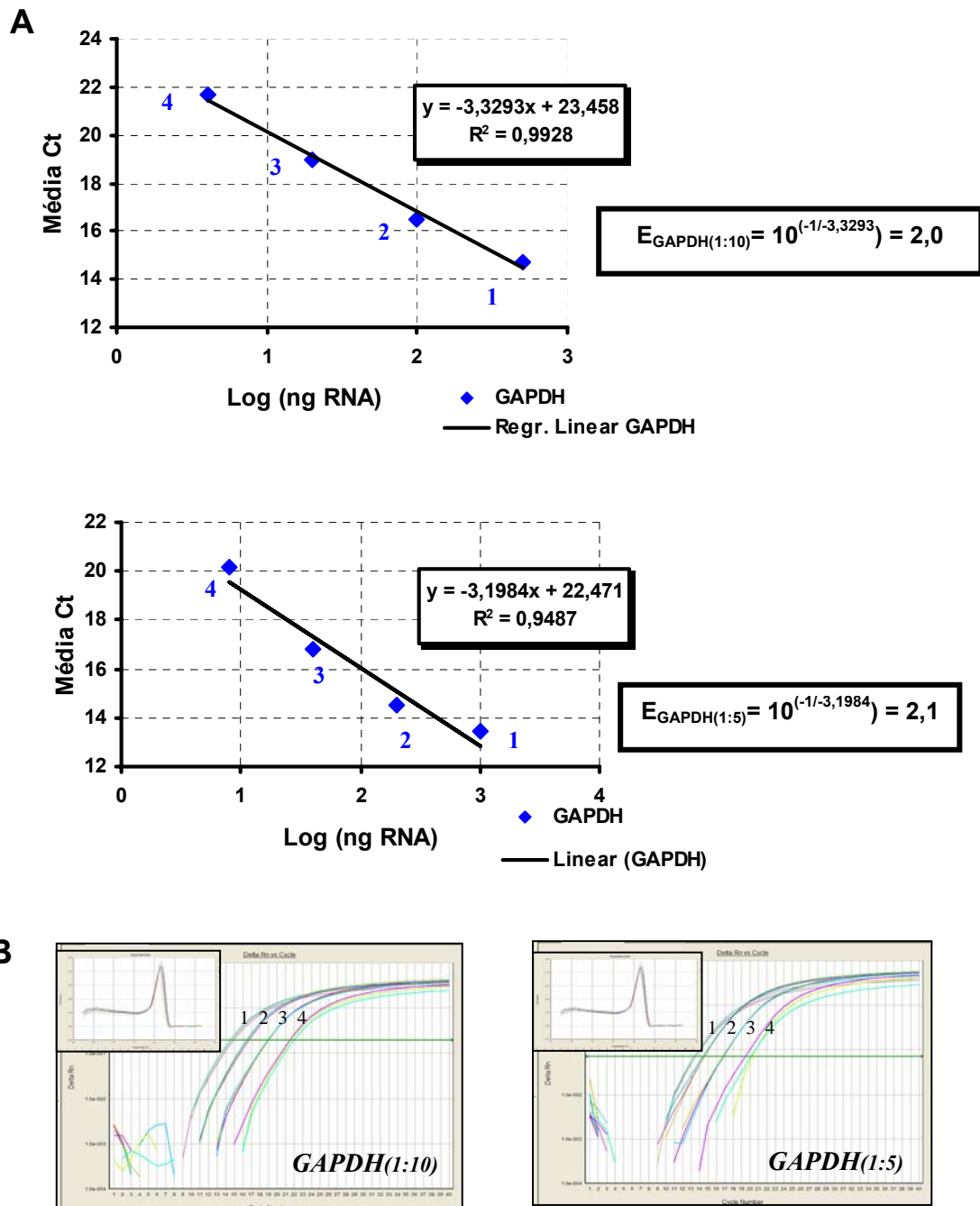
A



B



Cálculo da eficiência para os genes de ANF e BNP. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4 cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA), como descrito no Material e Métodos.



Cálculo da eficiência para o gene de *GAPDH*. A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência. B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição para GAPDH(1:10): 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4 cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA). Quantidade de RNA presente em cada diluição para GAPDH(1:5): 1 cDNA diluído 1/5 (1000ng RNA); 2 cDNA diluído 1/25 (200ng RNA); 3 cDNA diluído 1/125; 4 cDNA diluído 1/625 (8ng RNA), como descrito no Material e Métodos.

ANEXO B

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | IL-6 | 29,042 29,054 28,611 | 28,902 | 13,809 | 2,526 | 0,17 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | IL-6 | 31 30,952 30,938 | 30,963 | 13,813 | 2,530 | 0,17 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | IL-6 | 29,501 29,609 30,206 | 29,772 | 15,318 | 4,035 | 0,06 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | IL-6 | 28,24 29 29,357 | 28,866 | 13,415 | 2,132 | 0,23 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | IL-6 | 27,115 26,776 26,255 | 26,715 | 8,285 | -2,998 | 7,99 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | IL-6 | 25,785 26,728 25,929 | 26,147 | 9,601 | -1,682 | 3,21 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | IL-6 | 26,341 26,712 26,331 | 26,461 | 13,403 | 2,12 | 0,23 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | IL-6 | 28,696 28,934 28,64 | 28,757 | 15,187 | 3,90 | 0,07 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | IL-6 | 32,518 33,039 32,311 | 32,623 | 16,635 | 5,35 | 0,02 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | IL-6 | 29,617 29,449 30,266 | 29,777 | 13,184 | 1,90 | 0,27 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | IL-6 | 27 26,313 26,425 | 26,579 | 11,028 | -0,25 | 1,19 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | IL-6 | 34,871 34 | 34,436 | 13,519 | 2,24 | 0,21 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | IL-6 | 29,512 29,521 29,114 | 29,382 | 13,866 | 2,58 | 0,17 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | IL-6 | 29,736 30,05 30,418 | 30,068 | 13,594 | 2,31 | 0,20 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | IL-6 | 29,509 29,446 29,526 | 29,494 | 13,577 | 11,283 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | IL-6 | 23,724 23,606 23,537 | 23,622 | 7,962 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | IL-6 | 23,997 24 24,069 | 24,022 | 8,786 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | IL-6 | 35 34,193 34,715 | 34,636 | 16,741 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | IL-6 | 33,792 33,922 | 33,857 | 12,163 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | IL-6 | 24,278 24,47 24,96 | 24,569 | 8,469 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *IL-6* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | IL-6 | 29,569 28,812 28,053 | 28,433 | 13,957 | 2,673 | 0,16 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | IL-6 | 28,843 29,051 30,027 | 29,307 | 12,346 | 1,063 | 0,48 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | IL-6 | 27 26,951 26,843 | 26,931 | 9,440 | -1,843 | 3,59 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | IL-6 | 28,221 28,271 28,4 | 28,297 | 13,814 | 2,531 | 0,17 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | IL-6 | 28,906 28,866 28,318 | 28,697 | 13,984 | 2,701 | 0,15 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | IL-6 | 27,652 27,892 27,55 | 27,698 | 13,500 | 2,217 | 0,22 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | IL-6 | 26,675 27,003 26,492 | 26,723 | 13,556 | 2,273 | 0,21 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | IL-6 | 26,99 27,161 26,933 | 27,028 | 11,729 | 0,446 | 0,73 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | IL-6 | 29,509 29,446 29,526 | 29,494 | 13,577 | 11,283 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | IL-6 | 23,724 23,606 23,537 | 23,622 | 7,962 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | IL-6 | 23,997 24 24,069 | 24,022 | 8,786 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | IL-6 | 35 34,193 34,715 | 34,636 | 16,741 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | IL-6 | 33,792 33,922 | 33,857 | 12,163 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | IL-6 | 24,278 24,47 24,96 | 24,569 | 8,469 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *IL-6* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|----------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 14,033 14,519 14,999 | 14,516 | IL-12p35 | 28,266 28,449 28,497 | 28,404 | 13,888 | 2,346 | 0,20 |
| CCC-2 | GAPDH | 17,241 18,016 17,166 | 17,204 | IL-12p35 | 28,645 28,756 | 28,701 | 11,497 | -0,045 | 1,03 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,152 13,366 13,469 | 13,662 | IL-12p35 | 27,111 27,222 27,178 | 27,170 | 13,508 | 1,966 | 0,26 |
| CCC-4 | GAPDH | 13,995 14,076 14,212 | 14,094 | IL-12p35 | 27,827 27,651 28,098 | 27,859 | 13,764 | 2,222 | 0,21 |
| CCC-5 | GAPDH | 20,404 21,335 21,464 | 21,400 | IL-12p35 | 29,565 29,731 | 29,648 | 8,249 | -3,294 | 9,81 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,285 16,359 16,861 | 16,573 | IL-12p35 | 28,761 28,772 28,774 | 28,769 | 12,196 | 0,654 | 0,64 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,427 12,277 12,262 | 12,270 | IL-12p35 | 25,672 25,827 25,948 | 25,816 | 13,546 | 2,004 | 0,25 |
| CCC-8 | GAPDH | 12,269 12,313 12,398 | 12,327 | IL-12p35 | 28,031 27,624 27,674 | 27,776 | 15,450 | 3,907 | 0,07 |
| CCC-9 | GAPDH | 15,047 15,093 15,115 | 15,085 | IL-12p35 | 26,265 26,138 26,252 | 26,218 | 11,133 | -0,409 | 1,33 |
| CCC-10 | GAPDH | 15,827 15,791 15,768 | 15,795 | IL-12p35 | 27,531 27,581 27,578 | 27,563 | 11,768 | 0,226 | 0,86 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,295 15,473 15,236 | 15,335 | IL-12p35 | 26,205 25,837 26,028 | 26,023 | 10,689 | -0,854 | 1,81 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,036 21,095 20,817 | 20,983 | IL-12p35 | 32,534 32,149 33 | 32,561 | 11,578 | 0,04 | 0,98 |
| CCC-13 | GAPDH | 15 14,84 14,693 | 14,844 | IL-12p35 | 28,134 28,079 28,433 | 28,215 | 13,371 | 1,83 | 0,28 |
| CCC-14 | GAPDH | 15,275 15,527 15,8 | 15,534 | IL-12p35 | 26,787 27,087 26,895 | 26,923 | 11,389 | -0,15 | 1,11 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | IL-12p35 | 28 27,443 27,725 | 27,723 | 12,228 | 11,542 | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | IL-12p35 | 26,186 26,092 26,152 | 26,143 | 10,727 | | |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | IL-12p35 | 25,616 25,427 26 | 25,681 | 10,836 | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | IL-12p35 | 30,766 31,432 | 31,099 | 11,951 | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | IL-12p35 | 31,13 31,009 | 31,070 | 11,410 | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | IL-12p35 | 26,043 26,13 26,238 | 26,137 | 12,101 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *IL-12p35* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|----------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | IL-12p35 | 27,202 26,989 27,079 | 27,090 | 12,614 | 1,072 | 0,48 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | IL-12p35 | 27,093 26,851 27,391 | 27,112 | 10,151 | -1,392 | 2,62 |
| CNI-3 | GAPDH | 17 16,992 17,124 | 17,04 | IL-12p35 | 28,645 28,756 | 28,701 | 11,662 | 0,120 | 0,92 |
| CNI-4 | GAPDH | 15,725 15,956 16,094 | 16,025 | IL-12p35 | 27,294 27,604 28,197 | 27,698 | 11,673 | 0,131 | 0,91 |
| CNI-5 | GAPDH | 13,692 13,399 13,322 | 13,47 | IL-12p35 | 25,1 25,055 24,901 | 25,019 | 11,548 | 0,005 | 1,00 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | IL-12p35 | 26,624 26,961 27,15 | 26,912 | 12,714 | 1,171 | 0,44 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | IL-12p35 | 27,994 28,188 28 | 28,061 | 14,893 | 3,351 | 0,10 |
| CNI-8 | GAPDH | 13,573 13,502 13,439 | 13,50 | IL-12p35 | 27,886 28,366 28 | 28,084 | 14,579 | 3,037 | 0,12 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | IL-12p35 | 28 27,443 27,725 | 27,723 | 12,228 | 11,542 | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | IL-12p35 | 26,186 26,092 26,152 | 26,143 | 10,727 | | |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | IL-12p35 | 25,616 25,427 26 | 25,681 | 10,836 | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | IL-12p35 | 30,766 31,432 | 31,099 | 11,951 | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | IL-12p35 | 31,13 31,009 | 31,070 | 11,410 | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | IL-12p35 | 26,043 26,13 26,238 | 26,137 | 12,101 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *IL-12p35* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | IL-18 | 29,451 29,283 29,456 | 29,397 | 14,303 | -0,805 | 1,75 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | IL-18 | 34,76 35,028 35,619 | 35,136 | 17,986 | 2,878 | 0,14 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | IL-18 | 27,938 28,066 28,484 | 28,163 | 13,709 | -1,399 | 2,64 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | IL-18 | 29,075 29,585 | 29,330 | 13,879 | -1,229 | 2,34 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | IL-18 | 27,163 26,787 26,56 | 26,837 | 8,406 | -6,702 | 104,10 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | IL-18 | 32,598 32,476 | 32,537 | 15,991 | 0,883 | 0,54 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | IL-18 | 24,541 24,5 24,604 | 24,548 | 11,490 | -3,62 | 12,28 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | IL-18 | 24,625 24,511 24,652 | 24,596 | 11,026 | -4,08 | 16,93 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | IL-18 | 32,078 32,308 32,233 | 32,206 | 16,219 | 1,11 | 0,46 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | IL-18 | 28,246 28,144 28,202 | 28,197 | 11,604 | -3,50 | 11,35 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | IL-18 | 30,094 30,107 30,141 | 30,114 | 14,563 | -0,55 | 1,46 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | IL-18 | 30,31 30,308 30,549 | 30,389 | 9,473 | -5,64 | 49,71 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | IL-18 | 28,9 29 28,558 | 28,819 | 13,303 | -1,81 | 3,50 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | IL-18 | 30,069 30,439 30,151 | 30,220 | 13,746 | -1,36 | 2,57 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | IL-18 | 33 33,285 33,224 | 33,170 | 17,253 | 15,108 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | IL-18 | 30,374 29,857 30,77 | 30,334 | 14,673 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | IL-18 | 30,857 30,411 30 | 30,423 | 15,187 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | IL-18 | | | | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | IL-18 | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | IL-18 | 29,511 29,355 29,392 | 29,419 | 13,319 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *IL-18* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=4).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | IL-18 | 28,661 28,326 28,62 | 28,536 | 14,060 | -1,049 | 2,07 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | IL-18 | 34,788 35 | 34,894 | 17,933 | 2,825 | 0,14 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | IL-18 | 33,677 34 | 33,839 | 16,347 | 1,239 | 0,42 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | IL-18 | 30,128 29,938 30,242 | 30,103 | 15,620 | 0,512 | 0,70 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | IL-18 | 29,526 29,903 30,128 | 29,852 | 15,140 | 0,031 | 0,98 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | IL-18 | 30,571 30,663 | 30,617 | 16,419 | 1,311 | 0,40 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | IL-18 | 30,265 29,908 29,399 | 29,857 | 16,690 | 1,582 | 0,33 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | IL-18 | 29,709 29,247 29,572 | 29,509 | 14,210 | -0,898 | 1,86 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | IL-18 | 33 33,285 33,224 | 33,170 | 17,253 | 15,108 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | IL-18 | 30,374 29,857 30,77 | 30,334 | 14,673 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | IL-18 | 30,857 30,411 30 | 30,423 | 15,187 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | IL-18 | | | | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | IL-18 | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | IL-18 | 29,511 29,355 29,392 | 29,419 | 13,319 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *IL-18* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=4).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CXCL8/IL-8 | 29,581 30 29,604 | 29,728 | 14,635 | 2,683 | 0,16 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CXCL8/IL-8 | 31 30,816 30,832 | 30,883 | 13,733 | 1,781 | 0,29 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CXCL8/IL-8 | 30,456 30,744 30,656 | 30,619 | 16,165 | 4,213 | 0,05 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CXCL8/IL-8 | 29,74 29,922 30,291 | 29,831 | 14,380 | 2,428 | 0,19 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CXCL8/IL-8 | 27,66 27,178 | 27,419 | 8,989 | -2,963 | 7,80 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CXCL8/IL-8 | 26,349 26,832 26,896 | 26,591 | 10,045 | -1,907 | 3,75 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CXCL8/IL-8 | 25,213 25,115 25,06 | 25,129 | 12,071 | 0,12 | 0,92 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CXCL8/IL-8 | 27,444 27,591 27,478 | 27,504 | 13,935 | 1,98 | 0,25 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CXCL8/IL-8 | 29,663 29,87 30,468 | 30,000 | 14,013 | 2,06 | 0,24 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CXCL8/IL-8 | 29,382 30,175 30,056 | 29,871 | 13,278 | 1,33 | 0,40 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CXCL8/IL-8 | 28,511 28,944 28,852 | 28,769 | 13,218 | 1,27 | 0,42 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CXCL8/IL-8 | 34,953 34,933 35 | 34,962 | 14,046 | 2,09 | 0,23 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CXCL8/IL-8 | 32,377 32,28 32,705 | 32,454 | 16,937 | 4,99 | 0,03 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CXCL8/IL-8 | 31,172 31,169 | 31,171 | 14,697 | 2,74 | 0,15 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CXCL8/IL-8 | 29,817 30,624 | 30,221 | 14,304 | 11,952 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CXCL8/IL-8 | 27,43 27,396 27,652 | 27,493 | 11,832 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CXCL8/IL-8 | 24 23,891 23,855 | 23,915 | 8,679 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CXCL8/IL-8 | 35,203 35 | 35,102 | 17,207 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CXCL8/IL-8 | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CXCL8/IL-8 | 23,851 23,958 23,702 | 23,837 | 7,737 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CXCL8/IL-8 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CXCL8/IL-8 | 28,133 28,263 28,387 | 28,261 | 13,785 | 1,833 | 0,28 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | CXCL8/IL-8 | 31,801 30,848 | 31,325 | 14,364 | 2,412 | 0,19 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CXCL8/IL-8 | 28,277 28,292 28 | 28,190 | 10,698 | -1,254 | 2,38 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CXCL8/IL-8 | 33,101 33,034 | 33,068 | 18,585 | 6,633 | 0,01 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CXCL8/IL-8 | 32,315 32,894 | 32,605 | 17,892 | 5,940 | 0,02 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CXCL8/IL-8 | 30,448 30,723 30,906 | 30,692 | 16,494 | 4,542 | 0,04 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CXCL8/IL-8 | 30,356 30,277 29,937 | 30,190 | 17,022 | 5,070 | 0,03 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CXCL8/IL-8 | 30,206 29,593 30,06 | 29,953 | 14,654 | 2,702 | 0,15 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DcT grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CXCL8/IL-8 | 29,817 30,624 | 30,221 | 14,304 | 11,952 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CXCL8/IL-8 | 27,43 27,396 27,652 | 27,493 | 11,832 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CXCL8/IL-8 | 24 23,891 23,855 | 23,915 | 8,679 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CXCL8/IL-8 | 35,203 35 | 35,102 | 17,207 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CXCL8/IL-8 | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CXCL8/IL-8 | 23,851 23,958 23,702 | 23,837 | 7,737 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CXCL8/IL-8 em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 14,033 14,519 14,999 | 14,516 | IL-13 | | | | | |
| CCC-2 | GAPDH | 17,241 18,016 17,166 | 17,204 | IL-13 | | | | | |
| CCC-3 | GAPDH | 14,152 13,366 13,469 | 13,662 | IL-13 | 32,26 33,048 | 32,654 | 18,992 | 2,364 | 0,19 |
| CCC-4 | GAPDH | 13,995 14,076 14,212 | 14,094 | IL-13 | | | | | |
| CCC-5 | GAPDH | 20,404 21,335 21,464 | 21,400 | IL-13 | | | | | |
| CCC-6 | GAPDH | 16,285 16,359 16,861 | 16,573 | IL-13 | 33,333 33,966 | 33,650 | 17,077 | 0,449 | 0,73 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,427 12,277 12,262 | 12,270 | IL-13 | 31,907 32,08 32,645 | 31,994 | 19,724 | 3,10 | 0,12 |
| CCC-8 | GAPDH | 12,269 12,313 12,398 | 12,327 | IL-13 | | | | | |
| CCC-9 | GAPDH | 15,047 15,093 15,115 | 15,085 | IL-13 | 32,671 32,943 | 32,807 | 17,722 | 1,09 | 0,47 |
| CCC-10 | GAPDH | 15,827 15,791 15,768 | 15,795 | IL-13 | | | | | |
| CCC-11 | GAPDH | 15,295 15,473 15,236 | 15,335 | IL-13 | 31,093 30,96 30,892 | 30,982 | 15,647 | -0,98 | 1,97 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,036 21,095 20,817 | 20,983 | IL-13 | | | | | |
| CCC-13 | GAPDH | 15 14,84 14,693 | 14,844 | IL-13 | | | | | |
| CCC-14 | GAPDH | 15,275 15,527 15,8 | 15,534 | IL-13 | | | | | |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | IL-13 | 32,047 32,175 31,236 | 31,819 | 16,325 | 16,628 | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | IL-13 | 31,961 32,038 | 32,000 | 16,584 | | |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | IL-13 | 31,689 31,401 32,373 | 31,821 | 16,976 | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | IL-13 | | | | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | IL-13 | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | IL-13 | | | | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *IL-13* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=3). A expressão de IL-13 não foi detectada em algumas amostras de miocárdio de pacientes com CCC, dessa forma não foi possível calcular a quantificação relativa.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | IL-13 | 33,215 33,283 | 33,249 | 18,773 | 2,145 | 0,23 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | IL-13 | 34,062 34,78 | 34,421 | 17,460 | 0,832 | 0,56 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | IL-13 | | | | | |
| CNI-4 | GAPDH | 15,725 15,956 16,094 | 16,025 | IL-13 | | | | | |
| CNI-5 | GAPDH | 13,692 13,399 13,322 | 13,47 | IL-13 | | | | | |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | IL-13 | | | | | |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | IL-13 | 34,995 34,601 | 34,798 | 21,630 | 5,002 | 0,03 |
| CNI-8 | GAPDH | 13,573 13,502 13,439 | 13,50 | IL-13 | | | | | |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | IL-13 | 32,047 32,175 31,236 | 31,819 | 16,325 | 16,628 | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | IL-13 | 31,961 32,038 | 32,000 | 16,584 | | |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | IL-13 | 31,689 31,401 32,373 | 31,821 | 16,976 | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | IL-13 | | | | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | IL-13 | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | IL-13 | | | | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *IL-13* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=3). A expressão de IL-13 não foi detectada em algumas amostras de miocárdio de pacientes com CNI, dessa forma não foi possível calcular a quantificação relativa.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|--------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | TGF- β | 30,242 29,948 | 30,095 | 15,002 | 7,242 | 0,01 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | TGF- β | 26,259 26,106 26,045 | 26,137 | 8,987 | 1,227 | 0,43 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | TGF- β | 26,145 26,373 26,056 | 26,191 | 11,738 | 3,978 | 0,06 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | TGF- β | 26,269 26,253 26,198 | 26,240 | 10,789 | 3,029 | 0,12 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | TGF- β | 27,406 27,506 27,448 | 27,453 | 9,023 | 1,263 | 0,42 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | TGF- β | 26,429 26,304 26,303 | 26,345 | 9,799 | 2,039 | 0,24 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | TGF- β | 23,808 23,627 | 23,718 | 10,660 | 2,90 | 0,13 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | TGF- β | 28 27,971 27,977 | 27,983 | 14,413 | 6,65 | 0,01 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | TGF- β | 24,871 24,864 25,008 | 24,914 | 8,927 | 1,17 | 0,45 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | TGF- β | 24,105 24,226 23,851 | 24,061 | 7,467 | -0,29 | 1,22 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | TGF- β | 23,383 23,159 22,813 | 23,118 | 7,567 | -0,19 | 1,14 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | TGF- β | 27,945 28,721 29,166 | 28,611 | 7,694 | -0,07 | 1,05 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | TGF- β | 24,635 24,249 24,421 | 24,435 | 8,918 | 1,16 | 0,45 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | TGF- β | 25,044 25,578 25,738 | 25,453 | 8,980 | 1,22 | 0,43 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | TGF- β | 24,235 24,218 24,178 | 24,210 | 8,294 | 7,760 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | TGF- β | 23,465 23,426 23,36 | 23,417 | 7,757 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | TGF- β | 23,025 23,043 23,08 | 23,049 | 7,813 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | TGF- β | 34,426 36 32,623 | | | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | TGF- β | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | TGF- β | 23,31 23,2 23,317 | 23,276 | 7,176 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *TGF- β* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=4).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|--------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | TGF- β | 25,526 25,589 25,55 | 25,555 | 11,079 | 3,319 | 0,11 |
| CNI-2 | GAPDH | 18 17,065 16,857 | 16,961 | TGF- β | 26,485 26,686 26,739 | 26,637 | 9,676 | 1,916 | 0,30 |
| CNI-3 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,20 | TGF- β | 26,073 26,106 26,074 | 26,084 | 11,886 | 4,126 | 0,07 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | TGF- β | 30,732 30,99 31,109 | 30,944 | 16,461 | 8,701 | 0,00 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | TGF- β | 27,508 27,718 27,841 | 27,689 | 12,976 | 5,216 | 0,03 |
| CNI-6 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,170 | TGF- β | 26,098 26,173 26,168 | 26,146 | 12,979 | 5,219 | 0,03 |
| CNI-7 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | TGF- β | 26,532 26,649 27,069 | 26,750 | 9,258 | 1,498 | 0,41 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | TGF- β | 23,832 23,595 | 23,714 | 8,414 | 0,654 | 0,64 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | TGF- β | 24,235 24,218 24,178 | 24,210 | 8,294 | 7,760 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | TGF- β | 23,465 23,426 23,36 | 23,417 | 7,757 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | TGF- β | 23,025 23,043 23,08 | 23,049 | 7,813 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | TGF- β | 34,426 36 32,623 | | | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | TGF- β | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | TGF- β | 23,31 23,2 23,317 | 23,276 | 7,176 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *TGF- β* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=4).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
|---------|----------|----------------------------|--------|-------|----------------------------|--------|--------|
| CCC-1 | GAPDH | 14,033 14,519 14,999 | 14,516 | Foxp3 | | | |
| CCC-2 | GAPDH | 17,241 18,016 17,166 | 17,204 | Foxp3 | 35,183 35,126 33,445 | 34,585 | 17,381 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,152 13,366 13,469 | 13,662 | Foxp3 | 32,762 31,868 31,33 | 31,987 | 18,324 |
| CCC-4 | GAPDH | 13,995 14,076 14,212 | 14,094 | Foxp3 | 32,135 32,305 33,313 | 32,584 | 18,490 |
| CCC-5 | GAPDH | 20,404 21,335 21,464 | 21,400 | Foxp3 | 33,228 33,002 | 33,115 | 11,716 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,285 16,359 16,861 | 16,573 | Foxp3 | 32,667 32,334 33,467 | 32,823 | 16,250 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,427 12,277 12,262 | 12,270 | Foxp3 | 29,155 28,948 29,568 | 29,052 | 16,782 |
| CCC-8 | GAPDH | 12,269 12,313 12,398 | 12,327 | Foxp3 | 25,641 25,048 25,193 | 25,294 | 12,967 |
| CCC-9 | GAPDH | 15,047 15,093 15,115 | 15,085 | Foxp3 | 33,362 33,484 33,974 | 33,607 | 18,522 |
| CCC-10 | GAPDH | 15,827 15,791 15,768 | 15,795 | Foxp3 | 30,087 30,409 29,997 | 30,164 | 14,369 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,295 15,473 15,236 | 15,335 | Foxp3 | 29,254 29,322 29,364 | 29,313 | 13,979 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,036 21,095 20,817 | 20,983 | Foxp3 | 34,289 34,992 | 34,641 | 13,658 |
| CCC-13 | GAPDH | 15 14,84 14,693 | 14,844 | Foxp3 | | | |
| CCC-14 | GAPDH | 15,275 15,527 15,8 | 15,534 | Foxp3 | | | |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | Foxp3 | | | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | Foxp3 | 32,859 32,8 | 32,830 | 17,414 |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | Foxp3 | | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | Foxp3 | | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | Foxp3 | | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | Foxp3 | | | |

Valores de DCt para o gene *Foxp3* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. A expressão de *Foxp3* não foi detectada em amostras de miocárdio de doadores saudáveis (controles normais; n=6), dessa forma a expressão relativa dessa quimiocina não pôde ter seu QR calculado. O valor de DCt para cada amostra foi normalizado pelo gene de referência, GAPDH. A expressão de *Foxp3* não foi detectada em três amostras de miocárdio de pacientes com CCC.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
|---------|----------|----------------------------|--------|-------|----------------------------|--------|--------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | Foxp3 | 31,201 31,037 31,229 | 31,156 | 16,680 |
| CNI-2 | GAPDH | 18 17,065 16,857 | 16,961 | Foxp3 | 32,423 32,918 32,859 | 32,641 | 15,680 |
| CNI-3 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | Foxp3 | 35,869 35 35,612 | 35,435 | 21,237 |
| CNI-4 | GAPDH | 15,725 15,956 16,094 | 16,025 | Foxp3 | | | |
| CNI-5 | GAPDH | 13,692 13,399 13,322 | 13,47 | Foxp3 | | | |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | Foxp3 | | | |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | Foxp3 | | | |
| CNI-8 | GAPDH | 13,573 13,502 13,439 | 13,50 | Foxp3 | | | |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | Foxp3 | | | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | Foxp3 | | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | Foxp3 | | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | Foxp3 | | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | Foxp3 | | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | Foxp3 | | | |

Valores de DCt para o gene *Foxp3* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. A expressão de *Foxp3* não foi detectada em amostras de miocárdio de doadores saudáveis (controles normais; n=6), dessa forma a expressão relativa dessa quimiocina não pôde ter seu QR calculado. O valor de DCt para cada amostra foi normalizado pelo gene de referência, GAPDH. A expressão de *Foxp3* não foi detectada em cinco amostras de miocárdio de pacientes com CNI.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|---------------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 14,033 14,519 14,999 | 14,516 | CCL3/MIP-1 α | 32,967 33,131 | 33,049 | 18,533 | 4,099 | 0,06 |
| CCC-2 | GAPDH | 17,241 18,016 17,166 | 17,204 | CCL3/MIP-1 α | 34,616 34,098 | 34,357 | 17,154 | 2,720 | 0,15 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,152 13,366 13,469 | 13,662 | CCL3/MIP-1 α | 28,274 28,735 28,798 | 28,602 | 14,940 | 0,506 | 0,70 |
| CCC-4 | GAPDH | 13,995 14,076 14,212 | 14,094 | CCL3/MIP-1 α | 30,119 30,255 30,686 | 30,353 | 16,259 | 1,825 | 0,28 |
| CCC-5 | GAPDH | 17,911 18 18,213 | 18,041 | CCL3/MIP-1 α | 27,749 28,245 28,855 | 28,283 | 10,242 | -4,192 | 18,28 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,285 16,359 16,861 | 16,573 | CCL3/MIP-1 α | 30,812 30,828 | 30,820 | 14,247 | -0,187 | 1,14 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,427 12,277 12,262 | 12,270 | CCL3/MIP-1 α | 26,539 26,736 26,737 | 26,671 | 14,401 | -0,03 | 1,02 |
| CCC-8 | GAPDH | 12,269 12,313 12,398 | 12,327 | CCL3/MIP-1 α | 27,23 27,201 27,67 | 27,367 | 15,040 | 0,61 | 0,66 |
| CCC-9 | GAPDH | 15,047 15,093 15,115 | 15,085 | CCL3/MIP-1 α | 30,849 31,062 | 30,956 | 15,871 | 1,44 | 0,37 |
| CCC-10 | GAPDH | 15,827 15,791 15,768 | 15,795 | CCL3/MIP-1 α | 28,589 28,754 28,607 | 28,650 | 12,855 | -1,58 | 2,99 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,295 15,473 15,236 | 15,335 | CCL3/MIP-1 α | 27,376 27,238 27,647 | 27,420 | 12,086 | -2,35 | 5,09 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,036 21,095 20,817 | 20,983 | CCL3/MIP-1 α | 34,322 33,98 | 34,151 | 13,168 | -1,27 | 2,40 |
| CCC-13 | GAPDH | 15 14,84 14,693 | 14,844 | CCL3/MIP-1 α | 28,995 29,654 29,032 | 29,227 | 14,383 | -0,05 | 1,04 |
| CCC-14 | GAPDH | 15,275 15,527 15,8 | 15,534 | CCL3/MIP-1 α | 29,972 28,565 29,118 | 29,218 | 13,684 | -0,75 | 1,68 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | CCL3/MIP-1 α | 31,709 32,084 | 31,897 | 16,402 | 14,434 | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | CCL3/MIP-1 α | 28,99 29,028 29,499 | 29,172 | 13,756 | | |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | CCL3/MIP-1 α | 29 28,865 28,947 | 28,937 | 14,092 | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | CCL3/MIP-1 α | 33 32,834 32,951 | 32,928 | 13,780 | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | CCL3/MIP-1 α | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | CCL3/MIP-1 α | 28,06 28,273 28,193 | 28,175 | 14,139 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CCL3/MIP-1 α em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-----------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 12,718 12,773 15 | 12,746 | CCL3/MIP-1alpha | 31,003 30,796 30,699 | 30,833 | 18,087 | 3,653 | 0,08 |
| CNI-2 | GAPDH | 17,958 16,896 16,517 | 16,707 | CCL3/MIP-1alpha | 33,894 33,513 | 33,704 | 16,997 | 2,563 | 0,17 |
| CNI-3 | GAPDH | 17 16,992 17,124 | 17,04 | CCL3/MIP-1alpha | 35 34,616 34,098 | 34,571 | 17,533 | 3,099 | 0,12 |
| CNI-4 | GAPDH | 15,725 15,956 16,094 | 16,025 | CCL3/MIP-1alpha | 31,739 31,351 | 31,545 | 15,520 | 1,086 | 0,47 |
| CNI-5 | GAPDH | 13,692 13,399 13,322 | 13,47 | CCL3/MIP-1alpha | 26,495 26,21 26,118 | 26,274 | 12,803 | -1,631 | 3,10 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,195 14,633 13,636 | 14,414 | CCL3/MIP-1alpha | 31,108 31,824 31,954 | 31,629 | 17,215 | 2,781 | 0,15 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,111 13,206 13,198 | 13,17 | CCL3/MIP-1alpha | 32,577 32,819 | 32,698 | 19,526 | 5,092 | 0,03 |
| CNI-8 | GAPDH | 13,573 13,502 13,439 | 13,50 | CCL3/MIP-1alpha | 31,763 32,555 | 32,159 | 18,654 | 4,220 | 0,05 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | CCL3/MIP-1α | 31,709 32,084 | 31,897 | 16,402 | 14,434 | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | CCL3/MIP-1α | 28,99 29,028 29,499 | 29,172 | 13,756 | | |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | CCL3/MIP-1α | 29 28,865 28,947 | 28,937 | 14,092 | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | CCL3/MIP-1α | 33 32,834 32,951 | 32,928 | 13,780 | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | CCL3/MIP-1α | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | CCL3/MIP-1α | 28,06 28,273 28,193 | 28,175 | 14,139 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CCL3/MIP-1α* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|--------------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 17,087 17,062 17,628 | 17,259 | CCL4/MIP-1 β | 31,21 31,641 | 31,426 | 14,167 | 1,214 | 0,43 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CCL4/MIP-1 β | 30,838 31 30,775 | 30,871 | 13,721 | 0,769 | 0,59 |
| CCC-3 | GAPDH | 17,213 17,135 17,083 | 17,144 | CCL4/MIP-1 β | 26,055 25,972 25,93 | 25,986 | 8,842 | -4,110 | 17,27 |
| CCC-4 | GAPDH | 17,563 17,496 17,39 | 17,483 | CCL4/MIP-1 β | 27,572 27,567 27,441 | 27,527 | 10,044 | -2,909 | 7,51 |
| CCC-5 | GAPDH | 19,604 19,642 19,5 | 19,582 | CCL4/MIP-1 β | 28,193 28,229 28,207 | 28,210 | 8,628 | -4,325 | 20,04 |
| CCC-6 | GAPDH | 18,342 18,317 18,261 | 18,302 | CCL4/MIP-1 β | 28,07 27,737 27,922 | 27,910 | 9,608 | -3,344 | 10,15 |
| CCC-7 | GAPDH | 16,661 16,655 16,666 | 16,661 | CCL4/MIP-1 β | 25,06 25,108 25,17 | 25,113 | 8,452 | -4,50 | 22,63 |
| CCC-8 | GAPDH | 18,205 18,553 18,131 | 18,296 | CCL4/MIP-1 β | 28,041 27,722 27,651 | 27,805 | 9,508 | -3,44 | 10,88 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,896 16,767 16,733 | 16,799 | CCL4/MIP-1 β | 26,321 26,166 26,181 | 26,223 | 9,424 | -3,53 | 11,54 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CCL4/MIP-1 β | 25,613 25,521 25,232 | 25,455 | 8,862 | -4,09 | 17,03 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CCL4/MIP-1 β | 25,36 25,332 25,145 | 25,279 | 9,728 | -3,22 | 9,34 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CCL4/MIP-1 β | 32,315 32,36 32,503 | 32,393 | 11,476 | -1,48 | 2,78 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CCL4/MIP-1 β | 29 28,978 28,878 | 28,952 | 13,435 | 0,48 | 0,72 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CCL4/MIP-1 β | 26,075 25,753 25,264 | 25,697 | 9,224 | -3,73 | 13,26 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCL4/MIP-1 β | 30,362 30,258 | 30,310 | 14,394 | 12,952 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCL4/MIP-1 β | 29,168 29,043 28,831 | 29,014 | 13,354 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCL4/MIP-1 β | 28 27,965 27,554 | 27,840 | 12,604 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCL4/MIP-1 β | 29,508 29,421 29,646 | 29,525 | 11,630 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCL4/MIP-1 β | 35,899 35,808 | 35,854 | 14,159 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCL4/MIP-1 β | 27,38 28 27,639 | 27,673 | 11,573 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CCL4/MIP-1 β* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|----------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 16,672 16,684 16,496 | 16,617 | CCL4/MIP-1beta | 31 30,495 30,881 | 30,792 | 14,175 | 1,222 | 0,43 |
| CNI-2 | GAPDH | 18,345 18,267 18,119 | 18,244 | CCL4/MIP-1beta | 29,644 29,338 29,668 | 29,550 | 11,306 | -1,646 | 3,13 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CCL4/MIP-1beta | 30 29,696 29,602 | 29,766 | 12,274 | -0,678 | 1,60 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CCL4/MIP-1beta | 28,359 28,146 28,181 | 28,229 | 13,746 | 0,793 | 0,58 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CCL4/MIP-1beta | 29,778 29,63 30,121 | 29,843 | 15,130 | 2,178 | 0,22 |
| CNI-6 | GAPDH | 16,35 16,409 16,349 | 16,369 | CCL4/MIP-1beta | 30,401 30,39 30,328 | 30,373 | 14,004 | 1,051 | 0,48 |
| CNI-7 | GAPDH | 17 16,96 16,694 | 16,88 | CCL4/MIP-1beta | 31,495 31,697 31,88 | 31,691 | 14,806 | 1,854 | 0,28 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CCL4/MIP-1beta | 26,303 26,13 26,051 | 26,161 | 10,862 | -2,090 | 4,26 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCL4/MIP-1beta | 30,362 30,258 | 30,310 | 14,394 | 12,952 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCL4/MIP-1beta | 29,168 29,043 28,831 | 29,014 | 13,354 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCL4/MIP-1beta | 28 27,965 27,554 | 27,840 | 12,604 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCL4/MIP-1beta | 29,508 29,421 29,646 | 29,525 | 11,630 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCL4/MIP-1beta | 35,899 35,808 | 35,854 | 14,159 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCL4/MIP-1beta | 27,38 28 27,639 | 27,673 | 11,573 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CCL4/MIP-1β* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CCL5/RANTES | 24,274 24,276 24,09 | 24,213 | 9,120 | -4,507 | 22,74 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CCL5/RANTES | 24,806 24,421 24,761 | 24,663 | 7,513 | -6,114 | 69,28 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CCL5/RANTES | 19,736 19,673 19,711 | 19,707 | 5,253 | -8,374 | 331,79 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CCL5/RANTES | 22,649 22,719 22,488 | 22,619 | 7,168 | -6,459 | 87,98 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CCL5/RANTES | 23,046 22,911 22,128 | 22,695 | 4,265 | -9,362 | 658,24 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CCL5/RANTES | 23,098 23,158 23,096 | 23,117 | 6,571 | -7,056 | 133,05 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CCL5/RANTES | 19,07 19,069 18,988 | 19,042 | 5,984 | -7,64 | 199,85 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CCL5/RANTES | 19,185 19,283 19,216 | 19,228 | 5,658 | -7,97 | 250,52 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CCL5/RANTES | 24 23,621 23,483 | 23,701 | 7,714 | -5,91 | 60,27 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CCL5/RANTES | 20,659 20,61 20,416 | 20,562 | 3,968 | -9,66 | 808,33 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CCL5/RANTES | 25 24,935 24,864 | 24,933 | 9,382 | -4,25 | 18,96 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CCL5/RANTES | 25,236 25,281 25,136 | 25,218 | 4,301 | -9,33 | 641,72 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CCL5/RANTES | 26 25,839 25,737 | 25,859 | 10,342 | -3,29 | 9,75 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CCL5/RANTES | 21,095 21,13 21,415 | 21,213 | 4,740 | -8,89 | 473,58 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCL5/RANTES | 33,231 32,314 32,472 | 32,672 | 16,756 | 13,627 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCL5/RANTES | 30,502 30,338 | 30,420 | 14,760 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCL5/RANTES | 30 29,96 29,74 | 29,900 | 14,664 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCL5/RANTES | 30,846 31,06 30,419 | 30,775 | 12,880 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCL5/RANTES | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCL5/RANTES | 25,054 25,11 25,364 | 25,176 | 9,076 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CCL5/RANTES* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CCL5/RANTES | 25,366 25 24,679 | 25,015 | 10,539 | -3,088 | 8,50 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | CCL5/RANTES | 27,557 27,091 27,429 | 27,359 | 10,398 | -3,229 | 9,38 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CCL5/RANTES | 29 28,633 28,36 | 28,664 | 11,173 | -2,454 | 5,48 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CCL5/RANTES | 28,118 27,831 27,674 | 27,874 | 13,391 | -0,236 | 1,18 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CCL5/RANTES | 27,677 27,623 27,794 | 27,698 | 12,985 | -0,642 | 1,56 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CCL5/RANTES | 26,625 26,576 26,456 | 26,552 | 12,354 | -1,273 | 2,42 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CCL5/RANTES | 26,712 26,678 26,722 | 26,704 | 13,536 | -0,091 | 1,06 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CCL5/RANTES | 22,213 22,093 22,015 | 22,107 | 6,808 | -6,819 | 112,94 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCL5/RANTES | 33,231 32,314 32,472 | 32,672 | 16,756 | 13,627 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCL5/RANTES | 30,502 29,689 30,338 | 30,420 | 14,760 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCL5/RANTES | 30 29,96 29,74 | 29,900 | 14,664 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCL5/RANTES | 30,846 31,06 30,419 | 30,775 | 12,880 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCL5/RANTES | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCL5/RANTES | 25,054 25,11 25,364 | 25,176 | 9,076 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CCL5/RANTES* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CCR5 | 26,634 26,228 26,115 | 26,326 | 11,232 | -3,998 | 15,98 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CCR5 | 30,697 30,416 30,295 | 30,469 | 13,319 | -1,911 | 3,76 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CCR5 | 25,385 25,403 25,314 | 25,367 | 10,914 | -4,317 | 19,93 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CCR5 | 27,304 27,51 27,201 | 27,407 | 11,956 | -3,274 | 9,68 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CCR5 | 25,22 25,254 25,231 | 25,235 | 6,805 | -8,426 | 343,96 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CCR5 | 34,3 34,293 34,942 | 34,297 | 17,751 | 2,520 | 0,17 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CCR5 | 22,504 22,611 22,629 | 22,581 | 9,523 | -5,71 | 52,25 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CCR5 | 22,951 22,639 22,586 | 22,725 | 9,156 | -6,08 | 67,42 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CCR5 | 26,661 26,922 27,183 | 26,922 | 10,934 | -4,30 | 19,65 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CCR5 | 30,971 31,29 30,919 | 31,060 | 14,467 | -0,76 | 1,70 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CCR5 | 32,628 33,01 33,195 | 32,944 | 17,393 | 2,16 | 0,22 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CCR5 | 26,773 26,846 26,752 | 26,790 | 5,874 | -9,36 | 655,65 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CCR5 | 28,683 29 28,484 | 28,722 | 13,206 | -2,03 | 4,07 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CCR5 | 29,11 29,522 29,286 | 29,306 | 12,832 | -2,40 | 5,27 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCR5 | 34,095 35 34,327 | 34,474 | 18,558 | 15,231 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCR5 | 31,789 31,718 31,86 | 31,789 | 16,129 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCR5 | 30,887 30,795 31,085 | 30,922 | 15,686 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCR5 | 31,742 32,727 32 | 32,156 | 14,261 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCR5 | 33,292 32,564 32,474 | 32,883 | 11,189 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCR5 | 31,813 31,511 | 31,662 | 15,562 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CCR5 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CCR5 | 26,115 25,794 25,138 | 25,682 | 11,206 | -4,024 | 16,27 |
| CNI-2 | GAPDH | 18 17,065 16,857 | 16,961 | CCR5 | 29 29,407 29,099 | 29,169 | 12,208 | -3,023 | 8,13 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CCR5 | 34 33,671 33,972 | 33,881 | 16,389 | 1,159 | 0,45 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CCR5 | 35,165 34,512 | 34,839 | 20,356 | 5,125 | 0,03 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CCR5 | 34,661 35 | 34,831 | 20,118 | 4,887 | 0,03 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CCR5 | 29,331 29,523 29,412 | 29,422 | 15,224 | -0,007 | 1,00 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CCR5 | 26,831 27,115 27,17 | 27,039 | 13,871 | -1,360 | 2,57 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CCR5 | 31,742 32,727 32 | 32,156 | 16,857 | 1,626 | 0,32 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCR5 | 34,095 35 34,327 | 34,474 | 18,558 | 15,231 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCR5 | 31,789 31,718 31,86 | 31,789 | 16,129 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCR5 | 30,887 30,795 31,085 | 30,922 | 15,686 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCR5 | 31,742 32,727 32 | 32,156 | 14,261 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCR5 | 33,292 32,564 32,474 | 32,883 | 11,189 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCR5 | 31,813 31,511 | 31,662 | 15,562 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CCR5 em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-----------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CXCL9/Mig | 26,779 27,093 26,924 | 26,932 | 11,839 | -2,512 | 5,70 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CXCL9/Mig | 29,251 29,274 29,506 | 29,344 | 12,194 | -2,157 | 4,46 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CXCL9/Mig | 23,814 23,77 23,744 | 23,776 | 9,322 | -5,028 | 32,64 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CXCL9/Mig | 24,998 25,192 25,42 | 25,203 | 9,753 | -4,598 | 24,22 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CXCL9/Mig | 22,818 23,084 22,597 | 22,833 | 4,403 | -9,948 | 987,79 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CXCL9/Mig | 25,785 26,718 26 | 26,168 | 9,622 | -4,729 | 26,52 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CXCL9/Mig | 18,798 18,756 18,915 | 18,823 | 5,765 | -8,59 | 384,21 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CXCL9/Mig | 18,601 18,249 18,348 | 18,399 | 4,830 | -9,52 | 734,73 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CXCL9/Mig | 27,742 27,13 27,076 | 27,316 | 11,328 | -3,022 | 8,13 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CXCL9/Mig | 24 23,89 23,854 | 23,915 | 7,321 | -7,029 | 130,64 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CXCL9/Mig | 27,656 27,385 27,332 | 27,458 | 11,907 | -2,444 | 5,44 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CXCL9/Mig | 25,194 25 24,956 | 25,050 | 4,134 | -10,22 | 1190,26 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CXCL9/Mig | 29,558 29,558 29,346 | 29,487 | 13,971 | -0,38 | 1,30 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CXCL9/Mig | 23,457 23,618 23,569 | 23,548 | 7,074 | -7,28 | 155,03 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CXCL9/Mig | 34,479 33,514 34,206 | 34,066 | 18,150 | 14,351 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CXCL9/Mig | 30 29,763 29,799 | 29,854 | 14,194 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CXCL9/Mig | 31 30,743 30,962 | 30,902 | 15,666 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CXCL9/Mig | | | | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CXCL9/Mig | 35 35,78 | 35,390 | 13,696 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CXCL9/Mig | 26,2 26,074 26,172 | 26,149 | 10,049 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CXCL9/Mig* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-----------|----------------------------|--------|--------|------------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CXCL9/Mig | 27,27 27,502 27,431 | 27,401 | 12,925 | -1,426 | 2,69 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | CXCL9/Mig | 31,64 31,614 31,193 | 31,482 | 14,521 | 0,171 | 0,89 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CXCL9/Mig | 31 30,88 30,739 | 30,873 | 13,381 | -0,969 | 1,96 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CXCL9/Mig | 30,243 29,294 30,18 | 29,906 | 15,423 | 1,072 | 0,48 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CXCL9/Mig | 31,547 30,758 30,997 | 31,101 | 16,388 | 2,037 | 0,24 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CXCL9/Mig | 29,277 29,216 29,177 | 29,223 | 15,025 | 0,675 | 0,63 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CXCL9/Mig | 29,192 29,107 29 | 29,100 | 15,932 | 1,581 | 0,33 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CXCL9/Mig | 26,542 26,318 26,286 | 26,382 | 11,083 | -3,268 | 9,63 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DDCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CXCL9/Mig | 34,479 33,514 34,206 | 34,066 | 18,150 | 14,351 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CXCL9/Mig | 30 29,763 29,799 | 29,854 | 14,194 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CXCL9/Mig | 31 30,743 30,962 | 30,902 | 15,666 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CXCL9/Mig | | | | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CXCL9/Mig | 35 35,78 | 35,390 | 13,696 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CXCL9/Mig | 26,2 26,074 26,172 | 26,149 | 10,049 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CXCL9/Mig* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DDCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|--------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CXCL10/IP-10 | 27,693 27,062 27,175 | 27,310 | 12,217 | -0,190 | 1,14 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CXCL10/IP-10 | 28,809 28,535 28,511 | 28,618 | 11,468 | -0,938 | 1,92 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CXCL10/IP-10 | 24,451 24,326 24,275 | 24,351 | 9,897 | -2,509 | 5,69 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CXCL10/IP-10 | 26,234 26,39 26,479 | 26,368 | 10,917 | -1,489 | 2,81 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CXCL10/IP-10 | 25,499 25,626 25,399 | 25,508 | 7,078 | -5,329 | 40,19 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CXCL10/IP-10 | 24,62 24,686 24,695 | 24,667 | 8,121 | -4,285 | 19,50 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CXCL10/IP-10 | 19,88 19,515 19,208 | 19,534 | 6,476 | -5,93 | 60,97 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CXCL10/IP-10 | 20,81 20,792 20,736 | 20,779 | 7,210 | -5,20 | 36,67 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CXCL10/IP-10 | 26,227 26,401 26,232 | 26,287 | 10,299 | -2,11 | 4,31 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CXCL10/IP-10 | 24,129 24,218 24,28 | 24,209 | 7,616 | -4,79 | 27,68 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CXCL10/IP-10 | 23,391 23,526 23,651 | 23,523 | 7,972 | -4,43 | 21,62 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CXCL10/IP-10 | 29,491 29,541 30,18 | 29,737 | 8,821 | -3,59 | 12,00 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CXCL10/IP-10 | 29 28,79 28,147 | 28,646 | 13,129 | 0,72 | 0,61 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CXCL10/IP-10 | 26 25,764 25,696 | 25,820 | 9,346 | -3,06 | 8,34 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CXCL10/IP-10 | 31 30,582 | 30,582 | 14,666 | 12,406 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CXCL10/IP-10 | 27,384 27,467 27,56 | 27,470 | 11,810 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CXCL10/IP-10 | 25 24,828 24,685 | 24,838 | 9,602 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CXCL10/IP-10 | 35,075 34,483 | 34,779 | 16,884 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CXCL10/IP-10 | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CXCL10/IP-10 | 25,129 25,129 25,252 | 25,170 | 9,070 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CXCL10/IP-10 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|--------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CXCL10/IP-10 | 27,657 27,578 27,652 | 27,629 | 13,153 | 0,747 | 0,60 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | CXCL10/IP-10 | 30,124 30 30,21 | 30,111 | 13,150 | 0,744 | 0,60 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CXCL10/IP-10 | 32 32,211 32,096 | 32,102 | 14,611 | 2,204 | 0,22 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CXCL10/IP-10 | 26,844 26,789 26,521 | 26,718 | 12,235 | -0,171 | 1,13 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CXCL10/IP-10 | 29,975 29,772 29,743 | 29,830 | 15,117 | 2,711 | 0,15 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CXCL10/IP-10 | 29,496 29,078 29,139 | 29,238 | 15,040 | 2,633 | 0,16 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CXCL10/IP-10 | 28,414 28,325 28,725 | 28,488 | 15,320 | 2,914 | 0,13 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CXCL10/IP-10 | 28,457 28,105 28,128 | 28,230 | 12,931 | 0,524 | 0,70 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CXCL10/IP-10 | 31 30,582 | 30,582 | 14,666 | 12,406 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CXCL10/IP-10 | 27,384 27,467 27,56 | 27,470 | 11,810 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CXCL10/IP-10 | 25 24,828 24,685 | 24,838 | 9,602 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CXCL10/IP-10 | 35,075 34,483 | 34,779 | 16,884 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CXCL10/IP-10 | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CXCL10/IP-10 | 25,129 25,129 25,252 | 25,170 | 9,070 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CXCL10/IP-10* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CXCR3 | 30,395 30,609 30,05 | 30,351 | 15,258 | -1,455 | 2,74 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CXCR3 | 34,286 34,531 | 34,409 | 17,259 | 0,545 | 0,69 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CXCR3 | 26,006 26,095 26,135 | 26,079 | 11,625 | -5,088 | 34,02 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CXCR3 | 30,2 30,604 31,044 | 30,616 | 15,165 | -1,548 | 2,92 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CXCR3 | 28,45 28,311 28,082 | 28,281 | 9,851 | -6,863 | 116,38 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CXCR3 | 31,327 32,162 31,559 | 31,683 | 15,137 | -1,577 | 2,98 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CXCR3 | 23,891 23,972 23,88 | 23,914 | 10,856 | -5,86 | 57,96 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CXCR3 | 24,708 24,464 24,583 | 24,585 | 11,015 | -5,70 | 51,91 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CXCR3 | 32,388 32,45 32,339 | 32,392 | 16,405 | -0,31 | 1,24 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CXCR3 | 30,474 30,116 30,64 | 30,410 | 13,817 | -2,90 | 7,45 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CXCR3 | 33,183 33,64 33,669 | 33,497 | 17,946 | 1,23 | 0,43 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CXCR3 | 29,095 29,119 29,34 | 29,185 | 8,268 | -8,44 | 348,49 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CXCR3 | 30 30,125 30,085 | 30,070 | 14,553 | -2,16 | 4,47 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CXCR3 | 30,276 29,786 30 | 30,021 | 13,547 | -3,17 | 8,98 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CXCR3 | 35 35,867 | 35,434 | 19,517 | 16,713 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CXCR3 | 34,204 34,365 34,298 | 34,289 | 18,629 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CXCR3 | 33,138 33,33 33,004 | 33,157 | 17,921 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CXCR3 | 33,389 33,551 | 33,470 | 15,575 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CXCR3 | 32,816 33,324 33,178 | 33,106 | 11,412 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CXCR3 | 33,034 33,238 33,706 | 33,326 | 17,226 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CXCR3 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CXCR3 | 29,882 29,847 29,722 | 29,817 | 15,341 | -1,372 | 2,59 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | CXCR3 | 34,527 34,88 | 34,704 | 17,743 | 1,029 | 0,49 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CXCR3 | | | | | |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CXCR3 | | | | | |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CXCR3 | | | | | |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CXCR3 | 35,135 34,42 | 34,778 | 20,580 | 3,866 | 0,07 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CXCR3 | 31,272 31,706 31,047 | 31,342 | 18,174 | 1,461 | 0,36 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CXCR3 | 30,819 30,425 30,538 | 30,594 | 15,295 | -1,419 | 2,67 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CXCR3 | 35 35,867 | 35,434 | 19,517 | 16,713 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CXCR3 | 34,204 34,365 34,298 | 34,289 | 18,629 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CXCR3 | 33,138 33,33 33,004 | 33,157 | 17,921 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CXCR3 | 33,389 33,551 | 33,470 | 15,575 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CXCR3 | 32,816 33,324 33,178 | 33,106 | 11,412 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CXCR3 | 33,034 33,238 33,706 | 33,326 | 17,226 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CXCR3 em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6). A expressão de CXCR3 não foi detectada em uma amostra de miocárdio de pacientes com CNI, dessa forma não foi possível calcular a quantificação relativa.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 14,033 14,519 14,999 | 14,516 | CCL17/TARC | 29,212 29,649 30,109 | 29,657 | 15,141 | -4,659 | 25,27 |
| CCC-2 | GAPDH | 17,241 18,016 17,166 | 17,204 | CCL17/TARC | 34,077 34,003 34,606 | 34,229 | 17,025 | -2,775 | 6,84 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,152 13,366 13,469 | 13,662 | CCL17/TARC | 29,567 29,883 30,225 | 29,892 | 16,229 | -3,571 | 11,88 |
| CCC-4 | GAPDH | 13,995 14,076 14,212 | 14,094 | CCL17/TARC | 29,861 29,732 29,915 | 29,836 | 15,742 | -4,058 | 16,66 |
| CCC-5 | GAPDH | 17,911 18 18,213 | 18,041 | CCL17/TARC | 29,03 28,986 28,817 | 28,944 | 10,903 | -8,897 | 476,73 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,285 16,359 16,861 | 16,573 | CCL17/TARC | 32,019 31,733 31,938 | 31,897 | 15,324 | -4,476 | 22,26 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,427 12,277 12,262 | 12,270 | CCL17/TARC | 24,45 24,523 24,966 | 24,646 | 12,377 | -7,42 | 171,64 |
| CCC-8 | GAPDH | 12,269 12,313 12,398 | 12,327 | CCL17/TARC | 24,363 24,499 24,589 | 24,484 | 12,157 | -7,64 | 199,89 |
| CCC-9 | GAPDH | 15,047 15,093 15,115 | 15,085 | CCL17/TARC | 31,068 31,378 | 31,223 | 16,138 | -3,66 | 12,66 |
| CCC-10 | GAPDH | 15,827 15,791 15,768 | 15,795 | CCL17/TARC | 29,9 30 30,184 | 30,028 | 14,233 | -5,57 | 47,42 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,295 15,473 15,236 | 15,335 | CCL17/TARC | 29,614 29,603 30,019 | 29,745 | 14,411 | -5,39 | 41,91 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,036 21,095 20,817 | 20,983 | CCL17/TARC | 33,841 33,374 | 33,608 | 12,625 | -7,18 | 144,53 |
| CCC-13 | GAPDH | 15 14,84 14,693 | 14,844 | CCL17/TARC | 33 32,799 33,944 | 33,248 | 18,403 | -1,40 | 2,63 |
| CCC-14 | GAPDH | 15,275 15,527 15,8 | 15,534 | CCL17/TARC | 30,455 29,564 30,077 | 30,032 | 14,498 | -5,30 | 39,45 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | CCL17/TARC | 35,855 35,464 | 35,660 | 20,165 | 19,800 | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | CCL17/TARC | 35,466 35,552 | 35,509 | 20,093 | | |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | CCL17/TARC | 34,953 35 35,801 | 35,251 | 20,406 | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | CCL17/TARC | | | | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | CCL17/TARC | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | CCL17/TARC | 32,343 32,545 32,829 | 32,572 | 18,536 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CCL17/TARC em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=4).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 12,718 12,773 15 | 12,746 | CCL17/TARC | 27,543 27,612 27,489 | 27,548 | 14,803 | -4,998 | 31,95 |
| CNI-2 | GAPDH | 17,958 16,896 16,517 | 16,707 | CCL17/TARC | 32,661 33,076 | 32,869 | 16,162 | -3,638 | 12,45 |
| CNI-3 | GAPDH | 17 16,992 17,124 | 17,04 | CCL17/TARC | | | | | |
| CNI-4 | GAPDH | 15,725 15,956 16,094 | 16,025 | CCL17/TARC | | | | | |
| CNI-5 | GAPDH | 13,692 13,399 13,322 | 13,47 | CCL17/TARC | 31,279 31,457 31,211 | 31,316 | 17,845 | -1,955 | 3,88 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,195 14,633 13,636 | 14,414 | CCL17/TARC | 32,298 32,17 32,558 | 32,342 | 17,928 | -1,872 | 3,66 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,111 13,206 13,198 | 13,17 | CCL17/TARC | 31,377 31,39 | 31,384 | 18,212 | -1,588 | 3,01 |
| CNI-8 | GAPDH | 13,573 13,502 13,439 | 13,50 | CCL17/TARC | 31,718 31,086 31,095 | 31,300 | 17,795 | -2,005 | 4,01 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | CCL17/TARC | 35,855 35,464 | 35,660 | 20,165 | 19,800 | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | CCL17/TARC | 35,466 35,552 | 35,509 | 20,093 | | |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | CCL17/TARC | 34,953 35 35,801 | 35,251 | 20,406 | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | CCL17/TARC | | | | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | CCL17/TARC | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | CCL17/TARC | 32,343 32,545 32,829 | 32,572 | 18,536 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CCL17/TARC em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=4). A expressão de CCL17/TARC não foi detectada em uma amostra de miocárdio de paciente com CNI, dessa forma não foi possível calcular a quantificação relativa.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média Ct | DCt |
|---------|----------|----------------------------|--------|-----------|----------------------------|----------|--------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CCL22/MDC | 29,925 30,302 29,346 | 29,858 | 14,764 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CCL22/MDC | 33,035 33,452 33,177 | 33,221 | 16,071 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CCL22/MDC | 28,954 29,26 29,066 | 29,093 | 14,640 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CCL22/MDC | 30,924 31,431 | 31,178 | 15,727 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CCL22/MDC | 30,436 30,439 | 30,438 | 12,007 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CCL22/MDC | 32,889 32,552 | 32,721 | 16,175 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CCL22/MDC | 25,647 25,594 25,25 | 25,497 | 12,439 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CCL22/MDC | 25,161 25,117 25,044 | 25,107 | 11,538 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CCL22/MDC | 32,555 32,388 | 32,472 | 16,484 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CCL22/MDC | 31,31 31,218 31,384 | 31,304 | 14,711 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CCL22/MDC | 33,3 34,251 | 33,776 | 18,225 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CCL22/MDC | 31,377 31,208 31,708 | 31,431 | 10,515 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CCL22/MDC | 33,16 33 | 33,080 | 17,563 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CCL22/MDC | 32,849 32,804 33 | 32,884 | 16,411 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCL22/MDC | | | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCL22/MDC | | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCL22/MDC | | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCL22/MDC | | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCL22/MDC | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCL22/MDC | | | |

Valores de DCt para o gene CCL22/MDC em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. A expressão de CCL22/MDC não foi detectada em amostras de miocárdio de doadores saudáveis (controles normais; n=6), dessa forma a expressão relativa dessa quimiocina não pôde ter seu QR calculado. O valor de DCt para cada amostra foi normalizado pelo gene de referência, GAPDH.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
|---------|----------|----------------------------|--------|-----------|----------------------------|--------|--------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CCL22/MDC | 28,095 28,304 28,806 | 28,402 | 13,926 |
| CNI-2 | GAPDH | 18 17,065 16,857 | 16,961 | CCL22/MDC | 27,76 27,694 | 27,727 | 10,766 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CCL22/MDC | | | |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CCL22/MDC | 34,242 35,957 | 35,100 | 20,617 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CCL22/MDC | 34,853 34,483 | 34,668 | 19,955 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CCL22/MDC | 32,039 31,931 31,355 | 31,775 | 17,577 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CCL22/MDC | 32,727 32,331 | 32,529 | 19,361 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CCL22/MDC | 32,294 31,962 31,591 | 31,949 | 16,650 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCL22/MDC | | | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCL22/MDC | | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCL22/MDC | | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCL22/MDC | | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCL22/MDC | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCL22/MDC | | | |

Valores de DCt para o gene CCL22/MDC em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. A expressão de CCL22/MDC não foi detectada em amostras de miocárdio de doadores saudáveis (controles normais; n=6), dessa forma a expressão relativa dessa quimiocina não pôde ter seu QR calculado. O valor de DCt para cada amostra foi normalizado pelo gene de referência, GAPDH. A expressão de CCL22/MDC não foi detectada em uma amostra de miocárdio de paciente com CNI.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CCR4 | 27,921 27,918 27,487 | 27,775 | 12,682 | -1,721 | 3,30 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CCR4 | 30 29,277 29,543 | 29,607 | 12,457 | -1,946 | 3,85 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CCR4 | 26,744 26,918 26,476 | 26,713 | 12,259 | -2,144 | 4,42 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CCR4 | 26,7 26,552 26,919 | 26,626 | 11,175 | -3,227 | 9,37 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CCR4 | 27,588 27,286 27,054 | 27,309 | 8,879 | -5,524 | 46,01 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CCR4 | 27,06 27,912 27,359 | 27,486 | 10,940 | -3,463 | 11,03 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CCR4 | 26 25,649 25,534 | 25,728 | 12,670 | -1,73 | 3,32 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CCR4 | 25,662 25,472 | 25,567 | 11,997 | -2,41 | 5,30 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CCR4 | 26,214 26,299 26,373 | 26,295 | 10,308 | -4,10 | 17,09 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CCR4 | 29,007 29,002 28,429 | 28,813 | 12,219 | -2,18 | 4,54 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CCR4 | 31,925 30,276 | 31,101 | 15,550 | 1,15 | 0,45 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CCR4 | 27,206 27,349 26,799 | 27,118 | 6,202 | -8,20 | 294,30 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CCR4 | 28,192 28,575 28 | 28,256 | 12,739 | -1,66 | 3,17 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CCR4 | 26,327 26,459 27,298 | 26,695 | 10,221 | -4,18 | 18,15 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCR4 | 33 33,394 | 33,197 | 17,281 | 14,403 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCR4 | 30,502 30,338 | 30,420 | 14,760 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCR4 | 30 29,799 29,616 | 29,805 | 14,569 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCR4 | 31 30,438 30,416 | 30,618 | 12,723 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCR4 | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCR4 | 29,103 28,175 29,067 | 28,782 | 12,682 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CCR4 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CCR4 | 27,707 27,689 27,057 | 27,484 | 13,008 | -1,394 | 2,63 |
| CNI-2 | GAPDH | 18 17,065 16,857 | 16,961 | CCR4 | 28,155 27,797 27,544 | 27,832 | 10,871 | -3,532 | 11,57 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CCR4 | 34 33,839 33,555 | 33,798 | 16,306 | 1,904 | 0,27 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CCR4 | 31,921 32,908 | 32,415 | 17,932 | 3,529 | 0,09 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CCR4 | 32,489 32,669 32,173 | 32,444 | 17,731 | 3,328 | 0,10 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CCR4 | 29,799 29,784 29,15 | 29,578 | 15,380 | 0,977 | 0,51 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CCR4 | 27,796 28,331 28,102 | 28,076 | 14,909 | 0,506 | 0,70 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CCR4 | 27,312 27,696 27,486 | 27,498 | 12,199 | -2,204 | 4,61 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCR4 | 33 33,394 | 33,197 | 17,281 | 14,403 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCR4 | 30,502 30,338 | 30,420 | 14,760 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCR4 | 30 29,799 29,616 | 29,805 | 14,569 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCR4 | 31 30,438 30,416 | 30,618 | 12,723 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCR4 | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCR4 | 29,103 28,175 29,067 | 28,782 | 12,682 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CCR4 em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=5).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 14,033 14,519 14,999 | 14,516 | CCR8 | 27,358 27,529 | 27,444 | 12,928 | -1,251 | 2,38 |
| CCC-2 | GAPDH | 17,241 18,016 17,166 | 17,204 | CCR8 | 29,458 29,279 29,665 | 29,467 | 12,264 | -1,914 | 3,77 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,152 13,366 13,469 | 13,662 | CCR8 | 26,582 26,74 27,088 | 26,803 | 13,141 | -1,037 | 2,05 |
| CCC-4 | GAPDH | 13,995 14,076 14,212 | 14,094 | CCR8 | 26,965 27,106 27,567 | 27,213 | 13,118 | -1,060 | 2,08 |
| CCC-5 | GAPDH | 17,911 18 18,213 | 18,041 | CCR8 | 28,273 28,808 28,904 | 28,662 | 10,620 | -3,558 | 11,78 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,285 16,359 16,861 | 16,573 | CCR8 | 28,176 28,452 28,356 | 28,328 | 11,755 | -2,423 | 5,36 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,427 12,277 12,262 | 12,270 | CCR8 | 27,393 27,364 27,595 | 27,451 | 15,181 | 1,00 | 0,50 |
| CCC-8 | GAPDH | 12,269 12,313 12,398 | 12,327 | CCR8 | 26,87 26,883 26,59 | 26,781 | 14,454 | 0,28 | 0,83 |
| CCC-9 | GAPDH | 15,047 15,093 15,115 | 15,085 | CCR8 | 25,13 25,216 25,355 | 25,234 | 10,149 | -4,03 | 16,33 |
| CCC-10 | GAPDH | 15,827 15,791 15,768 | 15,795 | CCR8 | 31,11 31,29 31,182 | 31,194 | 15,399 | 1,22 | 0,43 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,295 15,473 15,236 | 15,335 | CCR8 | 30,387 30,278 | 30,333 | 14,998 | 0,82 | 0,57 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,036 21,095 20,817 | 20,983 | CCR8 | 27,113 26,992 27,101 | 27,069 | 6,086 | -8,09 | 272,91 |
| CCC-13 | GAPDH | 15 14,84 14,693 | 14,844 | CCR8 | 27,618 27,577 28 | 27,732 | 12,887 | -1,29 | 2,45 |
| CCC-14 | GAPDH | 15,275 15,527 15,8 | 15,534 | CCR8 | 29,477 29,782 30 | 29,753 | 14,219 | 0,04 | 0,97 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | CCR8 | 31,475 31,294 31,826 | 31,532 | 16,037 | 14,178 | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | CCR8 | 29,159 29,107 29,241 | 29,169 | 13,753 | | |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | CCR8 | 30 29,668 29,978 | 29,882 | 15,037 | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | CCR8 | 30,973 31,576 | 31,275 | 12,127 | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | CCR8 | 30,928 30,34 30,81 | 30,693 | 11,033 | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | CCR8 | 31,309 30,939 31,11 | 31,119 | 17,083 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CCR8 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 12,718 12,773 15 | 12,746 | CCR8 | 28,812 28,053 | 28,433 | 15,687 | 1,509 | 0,35 |
| CNI-2 | GAPDH | 17,958 16,896 16,517 | 16,707 | CCR8 | 28,843 29,051 | 28,947 | 12,241 | -1,938 | 3,83 |
| CNI-3 | GAPDH | 17 16,992 17,124 | 17,04 | CCR8 | | | | | |
| CNI-4 | GAPDH | 15,725 15,956 16,094 | 16,025 | CCR8 | 32,404 32,191 33,102 | | | | |
| CNI-5 | GAPDH | 13,692 13,399 13,322 | 13,47 | CCR8 | 29,562 29,36 29,699 | 29,540 | 16,069 | 1,891 | 0,27 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,195 14,633 13,636 | 14,414 | CCR8 | 27,652 27,892 27,55 | 27,698 | 13,284 | -0,894 | 1,86 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,111 13,206 13,198 | 13,17 | CCR8 | 26,675 26,492 | 26,584 | 13,412 | -0,766 | 1,70 |
| CNI-8 | GAPDH | 13,573 13,502 13,439 | 13,50 | CCR8 | 33,71 33,119 34,014 | 33,614 | 20,110 | 5,931 | 0,02 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,563 15,51 15,411 | 15,495 | CCR8 | 31,475 31,294 31,826 | 31,532 | 16,037 | 14,178 | |
| N-2 | GAPDH | 15,627 15,362 15,259 | 15,416 | CCR8 | 29,159 29,107 29,241 | 29,169 | 13,753 | | |
| N-3 | GAPDH | 15 14,861 14,675 | 14,845 | CCR8 | 30 29,668 29,978 | 29,882 | 15,037 | | |
| N-4 | GAPDH | 19,816 18,628 19 | 19,148 | CCR8 | 30,973 31,576 | 31,275 | 12,127 | | |
| N-5 | GAPDH | 19,617 19,608 19,753 | 19,659 | CCR8 | 30,928 30,34 30,81 | 30,693 | 11,033 | | |
| N-6 | GAPDH | 14,112 14,141 13,855 | 14,036 | CCR8 | 31,309 30,939 31,11 | 31,119 | 17,083 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CCR8 em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6). A expressão de CCR4 não foi detectada em uma amostra de miocárdio de paciente com CNI, dessa forma não foi possível calcular a quantificação relativa.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-----------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CCL19/ELC | 24,564 24,608 24,576 | 24,583 | 9,489 | -4,408 | 21,23 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CCL19/ELC | 30 29,799 29,802 | 29,867 | 12,717 | -1,181 | 2,27 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CCL19/ELC | 22,16 22,272 22,394 | 22,275 | 7,822 | -6,076 | 67,46 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CCL19/ELC | 23,005 22,711 23,063 | 22,926 | 7,476 | -6,422 | 85,75 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CCL19/ELC | 29,918 30 29,382 | 29,767 | 11,336 | -2,561 | 5,90 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CCL19/ELC | 26,201 26,03 | 26,116 | 9,570 | -4,328 | 20,09 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CCL19/ELC | 17,565 17,721 17,906 | 17,731 | 4,673 | -9,23 | 598,41 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CCL19/ELC | 18,615 18,746 18,842 | 18,734 | 5,165 | -8,73 | 425,50 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CCL19/ELC | 27,218 27,149 26,463 | 26,943 | 10,956 | -2,94 | 7,68 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CCL19/ELC | 25,807 25,782 25,938 | 25,842 | 9,249 | -4,65 | 25,08 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CCL19/ELC | 25,578 25,461 25,474 | 25,504 | 9,953 | -3,94 | 15,39 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CCL19/ELC | 28,893 28,991 29,021 | 28,968 | 8,052 | -5,85 | 57,51 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CCL19/ELC | 30,904 31,015 31 | 30,973 | 15,456 | 1,56 | 0,34 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CCL19/ELC | 22,986 23,091 23,19 | 23,089 | 6,615 | -7,28 | 155,67 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCL19/ELC | 31,669 31,556 31,793 | 31,673 | 15,756 | 13,898 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCL19/ELC | 26,9 26,838 27 | 26,913 | 11,252 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCL19/ELC | 27,616 27,851 28 | 27,822 | 12,586 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCL19/ELC | 33,814 34 33,858 | 33,891 | 15,996 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCL19/ELC | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCL19/ELC | | | | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CCL19/ELC* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=4).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-----------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CCL19/ELC | 23,608 23,704 23,611 | 23,641 | 9,165 | -4,733 | 26,59 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | CCL19/ELC | 29,869 29,18 | 29,525 | 12,564 | -1,334 | 2,52 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CCL19/ELC | 31,197 30,71 | 30,954 | 13,462 | -0,436 | 1,35 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CCL19/ELC | 29,033 28,817 29,121 | 28,990 | 14,507 | 0,610 | 0,66 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CCL19/ELC | 26,437 26,41 26,75 | 26,532 | 11,820 | -2,078 | 4,22 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CCL19/ELC | 27,478 27,594 27,512 | 27,528 | 13,330 | -0,568 | 1,48 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CCL19/ELC | 28,953 28,441 28,905 | 28,766 | 15,599 | 1,701 | 0,31 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CCL19/ELC | 25,21 25,075 24,915 | 25,067 | 9,767 | -4,130 | 17,51 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCL19/ELC | 31,669 31,556 31,793 | 31,673 | 15,756 | 13,898 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCL19/ELC | 26,9 26,838 27 | 26,913 | 11,252 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCL19/ELC | 27,616 27,851 28 | 27,822 | 12,586 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCL19/ELC | 33,814 34 33,858 | 33,891 | 15,996 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCL19/ELC | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCL19/ELC | | | | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CCL19/ELC* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=4).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-----------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CCL21/SLC | 24,437 24,238 24,171 | 24,282 | 9,189 | -3,248 | 9,50 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CCL21/SLC | 27,484 27,49 27,911 | 27,628 | 10,478 | -1,958 | 3,89 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CCL21/SLC | 24,512 24,628 24,589 | 24,576 | 10,123 | -2,314 | 4,97 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CCL21/SLC | 27,013 27,202 28 | 27,405 | 11,954 | -0,482 | 1,40 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CCL21/SLC | 25,345 24,681 24,523 | 24,850 | 6,419 | -6,017 | 64,76 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CCL21/SLC | 24,133 24,58 24,494 | 24,402 | 7,856 | -4,580 | 23,92 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CCL21/SLC | 23,3 23,363 23,461 | 23,375 | 10,317 | -2,12 | 4,35 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CCL21/SLC | 23,642 23,515 23,831 | 23,663 | 10,093 | -2,34 | 5,07 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CCL21/SLC | 27,92 27,928 28 | 27,949 | 11,962 | -0,47 | 1,39 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CCL21/SLC | 26,636 26,642 26,603 | 26,627 | 10,034 | -2,40 | 5,29 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CCL21/SLC | 25,4 25,347 25,546 | 25,431 | 9,880 | -2,56 | 5,88 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CCL21/SLC | 28,559 28,147 28,756 | 28,487 | 7,571 | -4,87 | 29,15 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CCL21/SLC | 26,837 26,848 27 | 26,895 | 11,378 | -1,06 | 2,08 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CCL21/SLC | 22,988 23,112 23,696 | 23,265 | 6,792 | -5,64 | 50,03 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCL21/SLC | 29,495 29,367 29,638 | 29,500 | 13,584 | 12,436 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCL21/SLC | 27 26,967 26,877 | 26,948 | 11,288 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCL21/SLC | 24,793 24,796 25 | 24,863 | 9,627 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCL21/SLC | 33,36 33 33,066 | 33,142 | 15,247 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCL21/SLC | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCL21/SLC | | | | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene CCL21/SLC em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=4).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|-----------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CCL21/SLC | 23,941 23,392 23,383 | 23,639 | 9,163 | -3,274 | 9,67 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | CCL21/SLC | 29,722 30,108 29,525 | 29,785 | 12,824 | 0,388 | 0,76 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CCL21/SLC | 26,168 26,528 27 | 26,565 | 9,074 | -3,363 | 10,29 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CCL21/SLC | 24,563 24,321 25,042 | 24,642 | 10,159 | -2,277 | 4,85 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CCL21/SLC | 26,128 26,273 26,229 | 26,210 | 11,497 | -0,939 | 1,92 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CCL21/SLC | 23,86 23,871 | 23,866 | 9,668 | -2,769 | 6,82 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CCL21/SLC | 22,537 22,948 23,005 | 22,830 | 9,662 | -2,774 | 6,84 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CCL21/SLC | 20,822 20,548 20,589 | 20,653 | 5,354 | -7,083 | 135,55 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCL21/SLC | 29,495 29,367 29,638 | 29,500 | 13,584 | 12,436 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCL21/SLC | 27 26,967 26,877 | 26,948 | 11,288 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCL21/SLC | 24,793 24,796 25 | 24,863 | 9,627 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCL21/SLC | 33,36 33 33,066 | 33,142 | 15,247 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCL21/SLC | | | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCL21/SLC | | | | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *CCL21/SLC* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=4).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | CCR7 | 29,223 29,7 29,695 | 29,539 | 14,446 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | CCR7 | 33,792 34,614 34,853 | 34,734 | 17,584 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | CCR7 | 29,114 29,076 29,114 | 29,101 | 14,648 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | CCR7 | 31,66 30,906 31,836 | 31,283 | 15,832 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | CCR7 | 28,56 28,38 28,108 | 28,349 | 9,919 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | CCR7 | 33,727 34,502 34,426 | 34,115 | 17,569 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | CCR7 | 24,058 24,082 24,031 | 24,057 | 10,999 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | CCR7 | 24,396 24,272 24,313 | 24,327 | 10,757 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | CCR7 | 33,573 33,784 32,854 | 33,404 | 17,416 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | CCR7 | 28,089 28,582 28,378 | 28,350 | 11,756 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | CCR7 | 34,24 34,417 | 34,329 | 18,778 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | CCR7 | 33,284 32,778 32,503 | 32,855 | 11,939 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | CCR7 | 32 31,909 32,029 | 31,979 | 16,463 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | CCR7 | 32 31,203 31,719 | 31,641 | 15,167 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCR7 | | | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCR7 | | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCR7 | | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCR7 | | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCR7 | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCR7 | | | |

Valores de DCt para o gene CCR7 em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. A expressão de CCR7 não foi detectada em amostras de miocárdio de doadores saudáveis (controles normais; n=6), dessa forma a expressão relativa desse receptor não pôde ter seu QR calculado. O valor de DCt para cada amostra foi normalizado pelo gene de referência, GAPDH.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | CCR7 | 29,065 28,923 28,645 | 28,878 | 14,402 |
| CNI-2 | GAPDH | 18 17,065 16,857 | 16,961 | CCR7 | 35,261 35,221 | 35,241 | 18,280 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | CCR7 | 34,24 34,417 | 34,329 | 16,837 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | CCR7 | 35,808 35,466 | 35,637 | 21,154 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | CCR7 | 35,307 36 | 35,654 | 20,941 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | CCR7 | | | |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | CCR7 | 32,755 32,114 32,332 | 32,400 | 19,233 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | CCR7 | 30,753 31,31 30,666 | 30,910 | 15,610 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | CCR7 | | | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | CCR7 | | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | CCR7 | | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | CCR7 | | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | CCR7 | | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | CCR7 | | | |

Valores de DCt para o gene CCR7 em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. A expressão de CCR7 não foi detectada em amostras de miocárdio de doadores saudáveis (controles normais; n=6), dessa forma a expressão relativa dessa quimiocina não pôde ter seu QR calculado. O valor de DCt para cada amostra foi normalizado pelo gene de referência, GAPDH.

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | ANF | 19,22 19,069 19,305 | 19,198 | 4,105 | -2,595 | 6,04 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | ANF | 16,077 16,038 16,021 | 16,045 | -1,105 | -7,805 | 223,59 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | ANF | 18,45 18,653 22,869 | 19,991 | 5,537 | -1,163 | 2,24 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | ANF | 16,387 16,39 16,272 | 16,350 | 0,899 | -5,801 | 55,76 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | ANF | 19,111 19,17 19,319 | 19,200 | 0,770 | -5,930 | 60,99 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | ANF | 17,608 17,376 17,249 | 17,411 | 0,865 | -5,835 | 57,09 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | ANF | 15,756 16 15,784 | 15,847 | 2,789 | -3,91 | 15,05 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | ANF | 18,841 18,858 18,92 | 18,873 | 5,303 | -1,40 | 2,63 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | ANF | 15,508 15,338 15,381 | 15,409 | -0,579 | -7,28 | 155,28 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | ANF | 16,882 16,811 16,8 | 16,831 | 0,238 | -6,46 | 88,18 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | ANF | 18,804 18,673 18,589 | 18,689 | 3,138 | -3,56 | 11,81 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | ANF | 24,649 24,693 24,829 | 24,724 | 3,807 | -2,89 | 7,43 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | ANF | 15 14,917 14,846 | 14,921 | -0,596 | -7,30 | 157,12 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | ANF | 15,582 15,524 15,515 | 15,540 | -0,933 | -7,63 | 198,55 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | ANF | 24,118 24,038 24,053 | 24,070 | 8,153 | 6,700 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | ANF | 21,221 21,05 21,017 | 21,096 | 5,436 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | ANF | 23,079 23,07 23,078 | 23,076 | 7,840 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | ANF | 28,358 28,546 28,34 | 28,415 | 10,520 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | ANF | 25,922 26 25,621 | 25,848 | 4,153 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | ANF | 20,227 20,159 20,21 | 20,199 | 4,099 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene ANF em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | ANF | 15,526 15,45 15,368 | 15,448 | 0,972 | -5,728 | 53,00 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | ANF | 14,74 14,672 14,588 | 14,667 | -2,294 | -8,994 | 510,01 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | ANF | 23,979 24,025 23,742 | 23,915 | 6,424 | -0,276 | 1,21 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | ANF | 19,078 18,952 19,071 | 19,034 | 4,551 | -2,149 | 4,44 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | ANF | 16,17 16,123 16,164 | 16,152 | 1,440 | -5,260 | 38,33 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | ANF | 18,957 18,89 18,926 | 18,924 | 4,726 | -1,974 | 3,93 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | ANF | 22,969 23,036 23,039 | 23,015 | 9,847 | 3,147 | 0,11 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | ANF | 18,881 18,836 18,823 | 18,847 | 3,547 | -3,153 | 8,89 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | ANF | 24,118 24,038 24,053 | 24,070 | 8,153 | 6,700 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | ANF | 21,221 21,05 21,017 | 21,096 | 5,436 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | ANF | 23,079 23,07 23,078 | 23,076 | 7,840 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | ANF | 28,358 28,546 28,34 | 28,415 | 10,520 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | ANF | 25,922 26 25,621 | 25,848 | 4,153 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | ANF | 20,227 20,159 20,21 | 20,199 | 4,099 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene ANF em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CCC-1 | GAPDH | 15,155 15,072 15,053 | 15,093 | BNP | 19,589 19,297 19,623 | 19,503 | 4,410 | -7,792 | 221,55 |
| CCC-2 | GAPDH | 16,818 17,151 17,481 | 17,150 | BNP | 19,707 19,779 19,742 | 19,743 | 2,593 | -9,609 | 780,63 |
| CCC-3 | GAPDH | 14,384 14,408 14,569 | 14,454 | BNP | 20,986 21 20,945 | 20,977 | 6,523 | -5,678 | 51,19 |
| CCC-4 | GAPDH | 15,387 15,542 15,423 | 15,451 | BNP | 19,025 19,036 18,934 | 18,998 | 3,548 | -8,654 | 402,68 |
| CCC-5 | GAPDH | 18,141 18,803 18,347 | 18,430 | BNP | 21,707 21,727 21,842 | 21,759 | 3,328 | -8,873 | 468,80 |
| CCC-6 | GAPDH | 16,28 16,812 | 16,546 | BNP | 20,696 20,624 20,709 | 20,676 | 4,130 | -8,071 | 268,88 |
| CCC-7 | GAPDH | 13,034 13,054 13,086 | 13,058 | BNP | 18,74 18,835 18,685 | 18,753 | 5,695 | -6,51 | 90,88 |
| CCC-8 | GAPDH | 13,424 13,584 13,701 | 13,570 | BNP | 22,579 22,763 22,901 | 22,748 | 9,178 | -3,02 | 8,13 |
| CCC-9 | GAPDH | 16,141 16,069 15,753 | 15,988 | BNP | 18,538 18,555 18,392 | 18,495 | 2,507 | -9,69 | 828,20 |
| CCC-10 | GAPDH | 16,551 16,539 16,69 | 16,593 | BNP | 19,203 19,087 18,989 | 19,093 | 2,500 | -9,70 | 832,61 |
| CCC-11 | GAPDH | 15,493 15,466 15,694 | 15,551 | BNP | 21,699 21,805 21,687 | 21,730 | 6,179 | -6,02 | 64,98 |
| CCC-12 | GAPDH | 21,067 21 20,682 | 20,916 | BNP | 25,094 25,062 25,053 | 25,070 | 4,153 | -8,05 | 264,63 |
| CCC-13 | GAPDH | 15,541 15,527 15,482 | 15,517 | BNP | 16,887 17 16,999 | 16,962 | 1,445 | -10,76 | 1729,13 |
| CCC-14 | GAPDH | 16,593 16,533 16,295 | 16,474 | BNP | 17,579 17,899 18 | 17,826 | 1,352 | -10,85 | 1844,27 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | BNP | 33 33,285 33,224 | 33,170 | 17,253 | 12,201 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | BNP | 30,374 29,857 30,77 | 30,334 | 14,673 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | BNP | 30,857 30,411 24,153 | 28,474 | 13,238 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | BNP | 25,712 25,941 25,869 | 25,841 | 7,946 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | BNP | 27,82 27,373 27,536 | 27,576 | 5,882 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | BNP | 30,09 30,104 30,751 | 30,315 | 14,215 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *BNP* em amostras de miocárdio de pacientes com CCC. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | DDCt individual | QR individual |
|---------|----------|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|--------|-----------------|---------------|
| CNI-1 | GAPDH | 13,778 14,007 14,945 | 14,476 | BNP | 19,499 19,309 19,254 | 19,354 | 4,878 | -7,323 | 160,14 |
| CNI-2 | GAPDH | 17 17,065 16,857 | 16,961 | BNP | 20,631 20,248 20,411 | 20,430 | 3,469 | -8,732 | 425,25 |
| CNI-3 | GAPDH | 17,222 17,641 17,612 | 17,49 | BNP | 25,925 25,928 25,9 | 25,918 | 8,426 | -3,775 | 13,69 |
| CNI-4 | GAPDH | 14,37 14,424 14,542 | 14,483 | BNP | 21,826 21,924 21,604 | 21,785 | 7,302 | -4,900 | 29,85 |
| CNI-5 | GAPDH | 14,634 14,722 14,782 | 14,71 | BNP | 19,465 19,524 19,284 | 19,424 | 4,712 | -7,490 | 179,71 |
| CNI-6 | GAPDH | 14,03 14,36 14,204 | 14,198 | BNP | 21,545 21,532 21,678 | 21,585 | 7,387 | -4,814 | 28,13 |
| CNI-7 | GAPDH | 13,073 13,253 13,177 | 13,17 | BNP | 27,634 27,758 27,3 | 27,564 | 14,396 | 2,195 | 0,22 |
| CNI-8 | GAPDH | 15,191 15,319 15,388 | 15,30 | BNP | 18,465 18,327 18,429 | 18,407 | 3,108 | -9,094 | 546,28 |
| Amostra | Endógeno | Ct | média | Alvo | Ct | média | DCt | média DCt grupo | |
| N-1 | GAPDH | 15,863 15,886 16 | 15,916 | BNP | 33 33,285 33,224 | 33,170 | 17,253 | 12,201 | |
| N-2 | GAPDH | 15,569 15,814 15,598 | 15,660 | BNP | 30,374 29,857 30,77 | 30,334 | 14,673 | | |
| N-3 | GAPDH | 15,261 15,237 15,21 | 15,236 | BNP | 30,857 30,411 24,153 | 28,474 | 13,238 | | |
| N-4 | GAPDH | 17,797 17,888 18 | 17,895 | BNP | 25,712 25,941 25,869 | 25,841 | 7,946 | | |
| N-5 | GAPDH | 21,773 21,656 21,654 | 21,694 | BNP | 27,82 27,373 27,536 | 27,576 | 5,882 | | |
| N-6 | GAPDH | 15,932 16 16,368 | 16,100 | BNP | 30,09 30,104 30,751 | 30,315 | 14,215 | | |

Análise da quantificação relativa (QR) por qRT-PCR para o gene *BNP* em amostras de miocárdio de pacientes com CNI. O valor de QR para cada amostra (QR individual) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado pelo gene de referência, GAPDH, e expresso em relação à média das amostras de miocárdio de doadores saudáveis (média DCt grupo) (controles normais; n=6).

8. REFERÊNCIAS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383(6603):787-93.

Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol*. 2001;166(12):7556-62.

Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun*. 2001;17(1):99-107.

Abrahamsohn IA. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(1):117-21.

Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2001;158(4):1433-40.

Allison RS, Mumy ML, Wakefield LM. Translational control elements in the major human transforming growth factor-beta 1 mRNA. *Growth Factors*. 1998;16(2):89-100.

Andrew DP, Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y, Murphy K, Campbell JJ, Butcher EC, Wu L. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J Immunol*. 2001;166(1):103-11.

Antunez MI, Cardoni RL. Early IFN-gamma production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett*. 2001;79(3):189-96.

Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, Correa-Oliveira R. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci*. 2007;1(12):2797-806.

Araujo-Jorge TC, Waghbi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi Mde L, Keramidas M, et al. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardioathy. *J Infect Dis*. 2002;186(12):1823-8.

Aukrust P, Ueland T, Muller F, Andreassen AK, Nordoy I, Aas H, et al. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1998;97(12):1136-43.

Aukrust P, Damas JK, Gullestad L, Froland SS. Chemokines in myocardial failure -- pathogenic importance and potential therapeutic targets. *Clin Exp Immunol*. 2001;124(3):343-5.

Bacon KB, Premack BA, Gardner P, Schall TJ. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science*. 1995;269(5231):1727-30.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*. 1994;55:97-179. Review.

Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998;392(6676):565-8. Review.

Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*. 2001;250(2):91-104. Review.

Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1999;96(12):6873-8.

Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, et al. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem*. 1994;269(44):27580-8.

Banas B, Wörnle M, Berger T, Nelson PJ, Cohen CD, Kretzler M, Pfirstinger J, Mack M, Lipp M, Gröne HJ, Schlöndorff D. Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis. *J Immunol*. 2002;168(9):4301-7.

Barbosa J, Massensini AR, Santos MS, Meireles SI, Gomez RS, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado VF, Prado MA. Expression of the vesicular acetylcholine transporter, proteins involved in exocytosis, and functional calcium signaling in varicosities and soma of a murine septal cell line. *J Neurochem*. 1999;73(5):1881-93.

Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath MF. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1998;160(8):3642-7.

Bardi G, Lipp M, Baggiolini M, Loetscher P. The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *Eur J Immunol.* 2001;31(11):3291-7.

Benvenuti LA, Aiello VD, Palomino SA, Higuchi Mde L. Ventricular expression of atrial natriuretic peptide in chronic chagasic cardiomyopathy is not induced by myocarditis. *Int J Cardiol.* 2003;88(1):57-61.

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

Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Silva AM, Umezawa ES, et al. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2003;5(12):1116-24.

Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Russo M, Fonseca SG, Fae KC, Martins DG, Silva AM, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes Infect.* 2007;9(9):1104-13.

Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(5):1925-30.

Bonacchi A, Petrai I, Defranco RM, Lazzeri E, Annunziato F, Efsen E, et al. The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2003;125(4):1060-76.

Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *The Journal of experimental medicine.* 1998;187(1):129-34.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual review of microbiology.* 1973;27:347-82.

Caforio AL, Goldman JH, Haven AJ, et al. Evidence for autoimmunity to myosin and other heart-specific autoantigens in patients with dilated cardiomyopathy and their relatives. *Int. J. Cardiol.* 1996;54:157-63.

Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, et al. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature.* 1999;400(6746):776-80.

Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(3):336-41.

Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(4):305-10. Review.

Carvajal, K. E Moreno-Sanchez, R. Heart Metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch. Med. Res.* 2003; 34: 89-99.

Chagas C. Nova tripanosomíase humana. *Mem. Inst. Oswald Cruz.* 1909;1:159-218.

Chandrasekar B, Mummidi S, Claycomb WC, Mestril R, Nemer M. Interleukin-18 is a pro-hypertrophic cytokine that acts through a phosphatidylinositol 3-kinase-phosphoinositide-dependent kinase-1-Akt-GATA4 signaling pathway in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4553-67.

Chandrasekar B, Vemula K, Surabhi RM, Li-Weber M, Owen-Schaub LB, Jensen LE, et al. Activation of intrinsic and extrinsic proapoptotic signaling pathways in interleukin-18-mediated human cardiac endothelial cell death. *J Biol Chem.* 2004;279(19):20221-33.

Chang JT, Segal BM, Nakanishi K, Okamura H, Shevach EM. The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit. *Eur J Immunol.* 2000;30(4):1113-9.

Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998;83(9):952-9.

Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van-Bilsen M, O'Brien TX, et al. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:77-95.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.

Coffman RL, von der Weid T. Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *The Journal of experimental medicine*. 1997;185(3):373-5.

Cook DN, Smithies O, Strieter RM, Frelinger JA, Serody JS. CD8+ T cells are a biologically relevant source of macrophage inflammatory protein-1 alpha in vivo. *J Immunol*. 1999;162(9):5423-8.

Cosman D. Control of messenger RNA stability. *Immunol. Today*. 1987;8:16.

Cossio PM, Laguens RP, Diez C, Szarfman A, Segal A, Arana RM. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*. 1974;50(6):1252-9.

Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*. 1974;49(1):13-21.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(8):3541-5.

Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(8):1709-12.

Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Abel L, Guilherme L, Bocchi E, et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(1):133-7.

Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuto L, Higuchi ML, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 2005;167(2):305-13.

Cunha-Neto E, Teixeira PC, Nogueira LG, Mady C, Lanni B, Stolf N, Fiorelli A, Honorato R, Kalil J. New concepts on the pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: myocardial gene and protein expression profiles. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(3):59-62. Review. Portuguese.

Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*. 1999;286(5447):2098-102.

D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A, et al. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol*. 1998;161(10):5111-5.

D'Ambrosio D, Sinigaglia F. Chemokines and their receptors: trafficking cues for Th1 and Th2 cells. *Eur Cytokine Netw*. 2000;11(3):495-6.

Damas JK, Gullestad L, Ueland T, Solum NO, Simonsen S, Froland SS, et al. CXC-chemokines, a new group of cytokines in congestive heart failure--possible role of platelets and monocytes. *Cardiovasc Res*. 2000^a;45(2):428-36.

Damas JK, Eiken HG, Oie E, Bjerkeli V, Yndestad A, Ueland T, et al. Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. *Cardiovasc Res*. 2000^b;47(4):778-87.

Damas JK, Aukrust P, Ueland T, Odegaard A, Eiken HG, Gullestad L, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances and interleukin-10 suppresses the production of inflammatory cytokines in adult rat cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol*. 2001;96(4):345-52.

Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Otterdal K, Hognestad A, Solum NO, et al. Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets. *Circulation*. 2003;107(21):2670-6.

Davidson N, Naab A, Hanson J, Kennedy N, Coutie W, Struthers A. Comparison of atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and N-terminal proatrial natriuretic peptide as indicators of left ventricular systolic dysfunction. *Am J Cardiol*. 1996;77:828-831.

De Maria R, Gavazzi A, Recalcati F, Baroldi G, De Vita C, Camerini F. Comparison of clinical findings in idiopathic dilated cardiomyopathy in women versus men. The Italian Multicenter Cardiomyopathy Study Group (SPIC) *Am J Cardiol*. 1993;72(7):580-5.

Devaux B, Scholz D, Hirche A, Klovekorn WP, Schaper J. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1997;18(3):470-9.

Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P, et al. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(5):2700-5.

Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. 1956;14(6):1035-60.

Dias JC, SILVEIRA AC, SCHOFIELD CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(5):603-12. Review.

Dinareello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Muhl H, et al. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol*. 1998;63(6):658-64.

Dos Santos RR, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of experimental medicine*. 1992;175(1):29-39.

Dos Santos PV, Roffê E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect*. 2001;3(12):971-84.

Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, Livingston DJ, Dinareello CA. Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. *Blood*. 1998;91(6):2118-25.

Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 1997;61(3):246-57. Review.

Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(3):407-11.

Filippatos G, Parissis JT, Adamopoulos S, Kardaras F. Chemokines in cardiovascular remodeling: clinical and therapeutic implications. *Curr Mol Med*. 2003;3(2):139-47.

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

Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairena EC, Bacal F, Bocchi E, Guilherme L, Zheng XX, Liew FY, Higuchi ML, Kalil J, Cunha-Neto E Locally Produced Survival Cytokines IL-15 and IL-7 may be Associated to the Predominance of CD8(+) T cells at Heart Lesions of Human Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Scand J Immunol*. 2007;66(2-3):362-71.

Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lewallen M, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *Faseb J*. 2001;15(8):1428-30.

Frangogiannis NG, Shimon S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, et al. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2002^a;39(9):1468-74.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002^b;53(1):31-47.

Frangogiannis NG, Entman ML. Targeting the chemokines in myocardial inflammation. *Circulation*. 2004;110(11):1341-2.

Freitas HF, Chizzola PR, Paes AT, Lima AC, Mansur AJ. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*. 2005;102(2):239-47.

Galli G, Chantry D, Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, Lazzeri E, Manetti R, Maggi E, Gray PW, Romagnani S. Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur J Immunol*. 2000;30(1):204-10.

Gattorno M, Prigione I, Morandi F, Gregorio A, Chiesa S, Ferlito F, et al. Phenotypic and functional characterisation of CCR7+ and CCR7- CD4+ memory T cells homing to the joints in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(2):R256-67.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*. 1992;22(10):2501-6.

Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol*. 2001;2(2):108-15.

Girones N, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends in parasitology*. 2003;19(1):19-22.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infection and immunity*. 2003;71(3):1185-93.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, Correa-Oliveira R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun*. 2005;73(12):7960-6.

Gombert M, Dieu-Nosjean MC, Winterberg F, Bünemann E, Kubitza RC, Da Cunha L, Haahtela A, Lehtimäki S, Müller A, Rieker J, Meller S, Pivarcsi A, Koreck A, Fridman WH, Zentgraf HW, Pavenstädt H, Amara A, Caux C, Kemeny L, Alenius H, Lauerma A, Ruzicka T, Zlotnik A, Homey B. CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. *J Immunol*. 2005;174(8):5082-91.

Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(10):1393-401.

Graefe SE, Jacobs T, Gaworski I, Klauenberg U, Steeg C, Fleischer B. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. *Microbes Infect*. 2003;5(10):833-9.

Grewe M, Gyufko K, Schopf E, Krutmann J. Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. *Lancet*. 1994;343:25-6.

Hamid Q, Naseer T, Minshall EM, Song YL, Bonguniewicz M, Leung DY. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunology*. 1996;98:225-31.

Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, Morris PJ, Powrie F, Wood KJ. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol*. 2001;166(6):3789-96.

Hardison JL, Wrightsman RA, Carpenter PM, Lane TE, Manning JE. The chemokines CXCL9 and CXCL10 promote a protective immune response but

do not contribute to cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2006;74(1):125-34.

Hase K, Tani K, Shimizu T, Ohmoto Y, Matsushima K, Sone S. Increased CCR4 expression in active systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol*. 2001;70(5):749-55.

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*. 1997;89(7):1165-73.

Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, Ponath PD, Mackay CR. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest*. 1997;99(2):178-84.

Helin M, Savola J, Lapinleimu K. Cardiac manifestations during a Coxsackie B5 epidemic. *Br Med J*. 1968;3(5610):97-9.

Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clinical cardiology*. 1987;10(11):665-70.

Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Archiv*. 1993^a;423(3):157-60.

Higuchi, M.D.; De Brito, T.; Reis, M.M.; Belotti, G.; Pereira-Barretto A.C.; Pileggi, F. Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovascular Pathology*. 1993^b; 2:101-105.

Holme PA, Muller F, Solum NO, Brosstad F, Froland SS, Aukrust P. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Faseb J*. 1998;12(1):79-89.

Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, Schaub GA, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infection and immunity*. 2000;68(7):4075-83.

Huehn J, Hamann A. Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol*. 2005;26(12):632-6.

Hunter CA, Slifer T, Araujo F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infection and immunity*. 1996;64(7):2381-6.

Hunter, J.J.; CHIEN, K.R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *The New England Journal of Medicine*. 1999;341(17):1276-1283.

Ide N, Hirase T, Nishimoto-Hazuku A, Ikeda Y, Node K. Angiotensin II increases expression of IP-10 and the renin-angiotensin system in endothelial cells. *Hypertens Res*. 2008;31(6):1257-67.

Iellem A, Colantonio L, Bhakta S, Sozzani S, Mantovani A, Sinigaglia F, et al. Inhibition by IL-12 and IFN-alpha of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur J Immunol*. 2000;30(4):1030-9.

Ishiyama S, Hiroe M, Nishikawa T, Abe S, Shimojo T, Ito H, Ozasa S, Yamakawa K, Matsuzaki M, Mohammed MU, Nakazawa H, Kasajima T, Marumo F Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation*. 1997;95(2):489-96.

Iwai Y, Hemmi H, Mizenina O, Kuroda S, Suda K, Steinman RM. An IFN-gamma-IL-18 signaling loop accelerates memory CD8+ T cell proliferation. *PLoS ONE*. 2008;3(6):e2404.

Joe EK, Schussheim AE, Longrois D, Mäki T, Kelly RA, Smith TW, Balligand JL Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): mechanisms of contractile depression by nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(2):303-15.

Johnston, D.; Lewandoviski, D.E. Fatty acid metabolism and contractile function in the reperfused myocardium. *Circ. Res*. 1991; 68:714-725.

Kalovidouris, A.E.; Plotkin, Z.; Graesser, D. Interferon-gamma inhibits proliferation, differentiation, and creatine kinase activity of cultured human muscle cells. II. A possible role in myositis. *J. Rheumatol*. 1993; 20:1718-1723.

Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol*. 1997;158(9):4129-36.

Kierszenbaum F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2003;37(1):1-11.

Kim SJ, Park K, Koeller D, Kim KY, Wakefield LM, Sporn MB, Roberts AB. Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J Biol Chem*. 1992;267(19):13702-7.

Kim YM, Kang HS, Paik SG, Pyun KH, Anderson KL, Torbett BE, Choi I. Roles of IFN consensus sequence binding protein and PU.1 in regulating IL-18 gene expression. *J Immunol*. 1999;163(4):2000-7.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992;258(5089):1798-801.

Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, Breckenridge S, Hensley J, Altschuld R, et al. Myocarditis induced by targeted expression of the MCP-1 gene in murine cardiac muscle. *Am J Pathol*. 1998;152(1):101-11.

Korbele F, Alcântara FG, Rebeiro-dos-Santos R. Patogenia da forma digestiva. Manifestações digestivas da moléstia de Chagas. *Sarvier*. 1983: 25-34.

Kotner J, Tarleton R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun*. 2007;75(2):861-9.

Kubota T, Bounoutas GS, Miyagishima M, Kadokami T, Sanders VJ, Bruton C, et al. Soluble tumor necrosis factor receptor abrogates myocardial inflammation but not hypertrophy in cytokine-induced cardiomyopathy. *Circulation*. 2000;101(21):2518-25.

Kühl U, Noutsias M, Schultheiss HP. Immunohistochemistry in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 1995;16 Suppl O:100-6.

Leung DY. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunology*. 1999;104:S99-108.

Li Mo, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146.

Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(5):1301-14.

Lit LC, Wong CK, Tam LS, Li EK, Lam CW. Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(2):209-15.

Liu P, Martino T, Opavsky MA, Penninger J. Viral myocarditis: balance between viral infection and immune response. *Can J Cardiol*. 1996;12(10):935-43.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(3):963-9.

Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 1998;391(6665):344-5.

Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998;338(7):436-45.

Macedo V, Prata A, da Silva GR, Castilho E. [Prevalence of electrocardiographic changes in Chagas' disease patients (preliminary information about the National Electrocardiographic survey)]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 1982;38(4):261-4.

Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 2000;102(24):3003-8.

Machado FS, Koyama NS, Carregaro V, Ferreira BR, Milanezi CM, Teixeira MM, et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with Trypanosoma cruzi. *J Infect Dis*. 2005;191(4):627-36.

Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*. 2001;2(2):95-101.

Mady C, Cardoso RH, Barretto AC, da Luz PL, Bellotti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. *Circulation*. 1994;90(6):3098-102.

Mady C, Ianni BM, Arteaga E, Montes GS, Caldini EG, Andrade G, Giorgi MC, Saldiva PH. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. *Am J Cardiol*. 1999;84(3):354-6, A9.

Maisch B, Portig I, Ristic AD, et al. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus - a status report. *Herz*. 2000;25:200-9.

Majumdar G, Johnson IM, Kale S, Raghow R. Epigenetic regulation of cardiac muscle-specific genes in H9c2 cells by Interleukin-18 and histone deacetylase inhibitor m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide. *Mol Cell Biochem*. 2008;312(1-2):47-60.

Malhotra R, Sadoshima J, Brosius FC 3rd, Izumo S. Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes In vitro. *Circ Res*. 1999;85(2):137-46.

Mann DL, Young JB. Basic mechanisms in congestive heart failure. Recognizing the role of proinflammatory cytokines. *Chest*. 1994;105(3):897-904.

Mariano FS, Gutierrez FR, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira AP, Ferreira BR, Cunha FQ, Cardoso CR, Silva JS. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect*. 2008;10(7):825-33.

Marinho CR, D'Imperio Lima MR, Grisotto MG, Alvarez JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infection and immunity*. 1999;67(1):308-18.

Marino AP, da Silva A, dos Santos P, Pinto LM, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Lannes-Vieira J. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation*. 2004;110(11):1443-9.

Martin UO, Afcham M, Ledesma O, Capron A. Circulating immune complexes in different developmental stages of Chagas' disease. *Medicina*. 1987;47:159-162.

Mateo T, Abu Nabah YN, Abu Taha M, Mata M, Cerdá-Nicolás M, Proudfoot AE, Stahl RA, Issekutz AC, Cortijo J, Morcillo EJ, Jose PJ, Sanz MJ. Angiotensin II-induced mononuclear leukocyte interactions with arteriolar and venular endothelium are mediated by the release of different CC chemokines. *J Immunol*. 2006;176(9):5577-86.

Matsumoto S, Tsuji-Takayama K, Aizawa Y, Koide K, Takeuchi M, Ohta T, et al. Interleukin-18 activates NF-kappaB in murine T helper type 1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;234(2):454-7.

Mckenna WJ, Thiene G, Nava A, Fontaliran F, Blomstrom-Lundqvist C, Fontaine G, et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J*. 1994;71(3):215-8.

Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tonnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J. Molecular Diagnostic*. 2001; 3(2):55-61.

Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, et al. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol*. 1996;26(7):1647-51.

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

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

Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:401-4.

Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(5):577-91.

Morel JC, Park CC, Kumar P, Koch AE. Interleukin-18 induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast CXC chemokine production through NFkappaB activation. *Lab Invest*. 2001;81(10):1371-83.

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996;17(3):138-46. Review.

Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*. 2001;2(2):123-8.

Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 2004;25(2):75-84.

Muller U, Kohler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, Di Santo JP, et al. IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol.* 2001;167(6):3346-53.

Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett.* 1992;33(1):35-40.

Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in vascular biology. *J Vasc Res.* 2000;37(1):1-7.

Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature.* 1997;389(6651):631-5.

Nishikimi, T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovascular Research.* 2006;69:318-28.

Norii M, Yamamura M, Iwahashi M, Ueno A, Yamana J, Makino H. Selective recruitment of CXCR3+ and CCR5+ CCR4+ T cells into synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis. *Acta Med Okayama.* 2006;60(3):149-57.

Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol.* 1998;10(3):259-64.

Olivares-Villagomez D, McCurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1998;59(4):563-70.

Omland T, Akakbaag A, Bonarjee V, Caidahl K, Lie RT et al. Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. Comparison with plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide. *Circulation.* 1996;93:1963-1969.

Panina-Bordignon P, Papi A, Mariani M, Di Lucia P, Casoni G, Bellettato C, et al. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(11):1357-64.

Perera LP, Goldman CK, Waldmann TA. IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes. *J Immunol*. 1999;162(5):2606-12.

Petersen CA, Burleigh BA. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infection and immunity*. 2003;71(8):4441-7.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001^a;29(9):2002-7.

Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. *A-Z of quantitative PCR*. Ed. SA Bustin. 2001^b;3:123.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 2002; 30(9):1-10.

Piazza LA, de Bold AJ, Santamarina N, Hliba E, Rubiolo ER. Atrial natriuretic factor in experimental acute Chagas' disease. *Parasitol Research*. 1994;80(1):78-80.

Pierce EM, Carpenter K, Jakubzick C, Kunkel SL, Flaherty KR, Martinez FJ, Hogaboam CM. Therapeutic targeting of CC ligand 21 or CC chemokine receptor 7 abrogates pulmonary fibrosis induced by the adoptive transfer of human pulmonary fibroblasts to immunodeficient mice. *Am J Pathol*. 2007;170(4):1152-64.

Ponath PD, Qin S, Post TW, Wang J, Wu L, Gerard NP, Newman W, Gerard C, Mackay CR. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J Exp Med*. 1996;183(6):2437-48.

Powell MR, Morgan J, Guarner J, Colley DG. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 1998;20(10):463-71.

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

Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):106-15.

Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MS, Dinarello CA. Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14 $^{+}$ human blood mononuclear cells. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(3):711-21.

Puyó AM, Scaglione J, Auger S, Cavallero S, Postan M, Fernández BE. Natriuretic peptides as prognostic and diagnostic markers in Chagas' disease. *Regul Pept*. 2005 Jun;128(3):203-10. Review.

Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(4):746-54.

Rathanaswami P, Hachicha M, Sadick M, Schall TJ, McColl SR. Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*. 1993;268(8):5834-9.

Reddy VS, Harskamp RE, van Ginkel MW, Calhoon J, Baisden CE, Kim IS, Valente AJ, Chandrasekar B. Interleukin-18 stimulates fibronectin expression in primary human cardiac fibroblasts via PI3K-Akt-dependent NF- κ B activation. *J Cell Physiol*. 2008;215(3):697-707.

Reis DD, Jones EM, Tostes S, Jr., Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α^{+} cells and dominance of granzyme A $^{+}$, CD8 $^{+}$ lymphocytes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1993^a;48(5):637-44.

Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, et al. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1993^b;49(2):192-200.

Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R $^{+}$ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;83(2):165-72.

Ribeirao M, Pereira-Chiocola VL, Renia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol.* 2000;22(1):49-53.

Ribeiro AL, Rocha MO. [Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1998;31(3):301-14.

Ribeiro ALP, Reis AM, Barros MVL et al. Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in Chagas' disease. *Lancet.* 2002;360:461-462.

Riol-Blanco L, Sánchez-Sánchez N, Torres A, Tejedor A, Narumiya S, Corbí AL, Sánchez-Mateos P, Rodríguez-Fernández JL. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol.* 2005;174(7):4070-80.

Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *The Journal of experimental medicine.* 2004;200(6):725-35.

Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira AR. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity.* 1989;57(9):2640-4.

Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity.* 1997;7(4):571-81.

Rocha MO, Ribeiro AL, Teixeira MM. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci.* 2003;1(8):e44-54.

Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood.* 1991;78(4):1112-6.

Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 1997;90(3):909-28.

Romagnani P, LAzzeri E, Lasagni L, Mavilia C, Beltrame C, Francalanci M, et al. IP-10 and Mig production by glomerular cells in human proliferative glomerulonephritis and regulation by nitric oxide. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):53-64.

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type I regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological Reviews*. 2006;212:28-50.

Rossi MA. Patterns of myocardial fibrosis in idiopathic cardiomyopathies and chronic Chagasic cardiopathy. *Can J Cardiol*. 1991;7(7):287-94.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:217-42.

Sad S, Mosmann TR. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol*. 1994;153(8):3514-22.

Saeki H, Tamaki K. Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol Sci*. 2006;43(2):75-84.

Sahar S, Dwarakanath RS, Reddy MA, Lanting L, Todorov I, Natarajan R. Angiotensin II enhances interleukin-18 mediated inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells: a novel cross-talk in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2005;96(10):1064-71.

Sakai Sakai N, Wada T, Yokoyama H, Lipp M, Ueha S, Matsushima K, Kaneko S. Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):14098-103.

Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*. 1997;277(5334):2005-7.

Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*. 1998;19(12):568-74.

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.

Sallusto F, Langenkamp A, Geginat J, Lanzavecchia A. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;251:167-71.

Sambrook J, Gething M. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. 1989 Nov 16;342(6247):224-5.

Sangiorgi M. Clinical and epidemiological aspects of cardiomyopathies: a critical review of current knowledge. *European Journal of Internal Medicine*. 2003;14:5-17.

Sato M, Shegogue D, Gore EA, Smith EA, McDermott PJ, Trojanowska M. Role of p38 MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2002;118(4):704-11.

Sauty A, Dziejman M, Taha RA, Iarossi AS, Neote K, Garcia-Zepeda EA, Hamid Q, Luster AD The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J Immunol*. 1999;162(6):3549-58.

Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990;347(6294):669-71.

Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, et al. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1991;83(2):504-14.

Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med*. 1997;75(11-12):901-20.

Schluns KS, Lefrancois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):269-79.

Seta Y, Kanda T, Tanaka T, Arai M, Sekiguchi K, Yokoyama T, et al. Interleukin-18 in patients with congestive heart failure: induction of atrial natriuretic peptide gene expression. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2000;108(1-2):87-95.

Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, et al. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev*. 1992;127:183-204.

Shimada Y, Takehara K, Sato S. Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2004;34(3):201-8.

Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(3):539-45.

Siveke JT, Hamann A. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol.* 1998;160(2):550-4.

Soler D, Chapman TR, Poisson LR, Wang L, Cote-Sierra J, Ryan M, McDonald A, Badola S, Fedyk E, Coyle AJ, Hodge MR, Kolbeck R. CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3⁺ regulatory and Th2 effector lymphocytes. *J Immunol.* 2006;177(10):6940-51.

Sun J, Tarleton RL. Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;48(2):161-9.

Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2000;2(8):851-66.

Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *International immunology.* 1996;8(1):13-22.

Tarleton RL, Grusby MJ, Zhang L. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 2000;165(3):1520-5.

Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *SCIENCE.* 1993;260(5106):355-8.

Teixeira AR, Cunha Neto E, Rizzo LV, Silva R. Trypanocidal nitroarene treatment of experimental *Trypanosoma cruzi* infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbits. *J Infect Dis.* 1990;162(6):1420.

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in parasitology.* 2002;18(6):262-5.

Teixeira PC, Iwai LK, Kalil J, Cunha-Neto E. Differential protein expression profiles in hearts of chronic Chagas' disease cardiomyopathy or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2003;45(Suppl 13):84-85.

Teixeira LK, Fonseca, BPF, Barboza BA, Viola JPB. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005;100:137-144.

Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX, Wilson DW, Vergona R, Sullivan ME, Dole W, Rutledge JC. Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics.* 2002;11(1):21-30.

Tone M, Thompson SA, Tone Y, Fairchild PJ, Waldmann H. Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. *J Immunol.* 1997;159(12):6156-63.

Tsunawaki, S.; Sporn, M.; Ding, A.; Nathan, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature.* 1998; 334:260-263.

Uguccioni M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhee S, LaRosa GJ, Rao P, Ponath PD, Baggiolini M, Dahinden CA. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest.* 1997;100(5):1137-43.

Ulloa L, Doody J, Massague J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature.* 1999;397(6721):710-3.

Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol.* 2006;79(2):285-93.

Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol.* 2000;115(4):640-6.

Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, Fuentes AM, Anasagasti MJ, Martin J, et al. IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000;97(2):734-9.

Wakugawa M, Nakamura K, Kakinuma T, Onai N, Matsushima K, Tamaki K. CC chemokine receptor 4 expression on peripheral blood CD4+ T cells reflects disease activity of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2001;117(2):188-96.

Wang, D.; MCMillin, J.B.; Bick, R. Response of the neonatal rat cardiomyocyte in culture to energy depletion: Effects of cytokines, nitric oxide, and heat shock proteins. *Lab Invest.* 1996; 75:809-818.

Wendel S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Current opinion in hematology.* 1998;5(6):406-11.

Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, et al. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *The Journal of clinical investigation.* 1996;97(6):1525-34.

WHO/ISFC Task Force. Clinical and epidemiological aspects of cardiomyopathies: a critical review of current knowledge. *European Journal of Internal Medicine.* 2003; 14:5-17.

Wigle ED, Sasson Z, Henderson MA, Ruddy TD, Fulop J, Rakowski H, Williams WG. Hypertrophic cardiomyopathy. The importance of the site and the extent of hypertrophy. A review. *Prog Cardiovasc Dis.* 1985;28(1):1-83.

Woodruff JF. Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol.* 1980;101(2):425-84.

Yndestad A, Holm AM, Muller F, Simonsen S, Froland SS, Gullestad L, et al. Enhanced expression of inflammatory cytokines and activation markers in T-cells from patients with chronic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2003;60(1):141-6.

Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation.* 1997;95(5):1247-52.

Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts AI, et al. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *The Journal of experimental medicine.* 1999;190(9):1241-56.

Zingoni A, Soto H, Hedrick JA, Stoppacciaro A, Storlazzi CT, Sinigaglia F, et al. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol.* 1998;161(2):547-51.