



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

RAPHAELA MENEZES DE OLIVEIRA

**Proteômica e Metabolômica Comparativas Aplicadas à Cardiomiopatia Dilatada Não
Isquêmica: Análise do Plasma de Pacientes Chagásicos e Idiopáticos Submetidos ao
Transplante Cardíaco**

BRASÍLIA, DF

2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

RAPHAELA MENEZES DE OLIVEIRA

Proteômica e Metabolômica Comparativas Aplicadas à Cardiomiopatia Dilatada Não Isquêmica: Análise do Plasma de Pacientes Chagásicos Crônicos e Idiopáticos Submetidos ao Transplante Cardíaco

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Coorientadora: Profa. Dra. Aline Maria Araújo Martins

Brasília, DF
Fevereiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu profundo agradecimento ao professor Dr. Carlos André Ricart por me acolher como aluna e transmitir seu saber com benevolência diariamente.

À minha co-orientadora, professora Dr. Aline Martins, agradeço pela oportunidade e por tamanha dedicação à minha formação, mas sobretudo pela confiança depositada em mim. Sua participação foi inestimável.

Aos meus colegas e professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, agradeço pela convivência diária, pelos momentos de descontração e pelo auxílio sempre que requerido.

Gostaria de expressar meu reconhecimento ao Centro de Excelência em Metabolômica e Bioanálise (CEMBIO) da Universidade CEU de San Pablo - Madri, representado pela professora Dr. Coral Barbas e sua equipe, pelo acesso aos equipamentos e pela oportunidade de explorar novas áreas e técnicas.

À equipe do Serviço de Cirurgia Cardíaca do Instituto de Cardiologia e Transplante do Distrito Federal (ICTDF), em especial ao professor Dr. Fernando Atik, agradeço pelo entusiasmo e contribuição na pesquisa. Seu apoio foi fundamental para a conclusão dessa jornada.

À minha família, que sempre me deu exemplos e encorajamento à sua maneira, expresso minha profunda gratidão.

Quero estender meus agradecimentos à Universidade de Brasília (UnB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) secundária à cardiomiopatia dilatada não isquêmica (CMDNI) lidera as indicações de transplante cardíaco (TxC) no Brasil, no entanto seu estudo concentra-se majoritariamente na cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI). A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), altamente prevalente na América Latina, apresenta maior severidade e pior desfecho se comparada às outras cardiomiopatias. Uma vez que os eventos moleculares da IC que conduzem o curso clínico distinto de pacientes com CMDNI ainda são pouco compreendidos, o presente estudo caracteriza e discrimina os perfis de proteínas e metabólitos em plasma de 15 pacientes com IC avançada submetidos ao TxC – 8 pacientes com CCC e 7 com CDI – por espectrometria de massas. Comparados aos 12 doadores de coração, incluídos para reproduzir experimentalmente as condições fisiológicas (grupo CTRL), pacientes com IC avançada exibiram maior abundância de proteínas associadas à defesa antioxidante, com destaque para o catabolismo do peróxido de hidrogênio e transporte de óxido nítrico, e um desequilíbrio metabólico global indicativo principalmente de um acúmulo de ácidos graxos, aminoácidos e componentes do ciclo de Krebs. Dentre as etiologias, 6 proteínas foram discriminantes entre pacientes com CCC e CDI, além da regulação positiva de proteínas efetoras da resposta imune pró-inflamatória e do transporte reverso de colesterol na CMDNI chagásica. As análises CCC vs. CDI revelaram ainda uma disparidade metabólica entre as condições patológicas, com 12 metabólitos de maior representatividade para a CCC e 11 para a CDI. Os distúrbios foram relacionados principalmente ao perfil de metabolismo de aminoácidos. Embora a disfunção mitocondrial possa ser um evento mecanicista central na predisposição à IC, a regulação diferencial de proteínas e o comprometimento metabólico associados diferem entre as populações de CCC e CDI, corroborando as observações clínicas quanto ao prognóstico de pacientes com doença de Chagas.

Palavras chave: cardiomiopatia dilatada não isquêmica, insuficiência cardíaca avançada, cardiomiopatia chagásica crônica, proteômica, metabolômica, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Heart failure (HF) secondary to non-ischemic dilated cardiomyopathy (NIDCM) leads the indications for heart transplantation (HT) in Brazil, however its study mainly focuses on idiopathic dilated cardiomyopathy (IDC). Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), highly prevalent in Latin America, presents greater severity and worse outcome compared to other cardiomyopathies. Since the molecular events of HF that drive the distinct clinical course of patients with NIMDC are still poorly understood, the present study characterizes and discriminates the protein and metabolite profiles in plasma of 15 patients with advanced HF that underwent HT – 8 patients with CCC and 7 with IDC – by mass spectrometry. Compared to 12 heart donors, included to experimentally reproduce physiological conditions (CTRL group), patients with advanced HF exhibited a greater abundance of proteins associated with antioxidant defense, with emphasis on hydrogen peroxide catabolism and nitric oxide transport, and a global metabolic imbalance indicative mainly of an accumulation of fatty acids, amino acids and components of the Krebs cycle. Among the etiologies, 6 proteins were discriminating between patients with CCC and IDC, in addition to the positive regulation of pro-inflammatory immune response and reverse cholesterol transport effector proteins in chagasic NIMDC. CCC vs. CDI analyses also revealed a metabolic disparity between pathological conditions, with 12 metabolites most representative of CCC and 11 of CDI. Disturbances were mainly related to amino acid metabolism profile. Although mitochondrial dysfunction may be a central mechanistic event in predisposing to HF, the differential protein regulation and metabolic impairment associated differ between CCC and IDC populations, corroborating clinical observations regarding the prognosis of patients with Chagas disease.

Keywords: non-ischemic dilated cardiomyopathy, advanced heart failure, chronic chagasic cardiomyopathy, proteomics, metabolomics, mass spectrometry.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. CARDIOMIOPATIA DILATADA NÃO ISQUÊMICA AVANÇADA	17
1.2. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA.....	20
1.3. CARDIOMIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA	23
1.4. PROTEÔMICA E METABOLÔMICA NA CMDNI CHAGÁSICA E IDIOPÁTICA.....	24
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. OBJETIVO GERAL.....	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. PACIENTES E MÉTODOS	28
4.1. POPULAÇÃO DE PESQUISA.....	28
4.1.1. Critérios de Inclusão	29
4.1.2. Critérios de Exclusão.....	29
4.2. TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	30
4.3. ANÁLISE PROTEÔMICA.....	31
4.3.1. Preparo de Amostras	31
4.3.2. Quantificação de Proteínas e Peptídeos.....	32
4.3.3. Digestão Triptica de Proteínas em Solução (Clássica)	33
4.3.4. Dessalinização de Peptídeos.....	34
4.3.5. Análise <i>Label-Free</i> por LC-MS/MS	34
4.3.6. Análise de Dados	35
4.3.7. Anotações Funcionais	36
4.4. ANÁLISE METABOLÔMICA	36

4.4.1. Preparo de Amostras	37
4.4.2. Análise por GC-Q-TOF	38
4.4.3. Processamento de Dados.....	39
4.4.4. Análise de Dados	40
5. RESULTADOS	41
5.1. DADOS CLÍNICOS	41
5.2. INSUFICIÊNCIA CARDÍACA AVANÇADA vs. CONTROLE.....	43
5.2.1. Análise Proteômica	43
5.2.2. Análise Metabolômica	48
5.3. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA vs. CONTROLE.....	51
5.3.1. Análise Proteômica	51
5.3.2. Análise Metabolômica	56
5.4. CARDIOMIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA vs. CONTROLE	57
5.4.1. Análise Proteômica	58
5.4.2. Análise Metabolômica	62
5.5. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA vs. CARDIOMIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA vs. CONTROLE	64
5.5.1. Análise Proteômica	64
5.5.2. Análise Metabolômica	67
5.6. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA vs. CARDIOMIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA	69
5.6.1. Análise Proteômica	69
5.6.2. Análise Metabolômica	73
6. DISCUSSÃO	75
6.1. FISIOPATOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA AVANÇADA.....	75
6.1.1. Regulação Diferencial de Proteínas	75
6.1.2. Comprometimento Metabólico	78
6.2. FISIOPATOLOGIA DAS CARDIOMIOPATIAS CHAGÁSICA E IDIOPÁTICA	79
6.2.1. Regulação Diferencial de Proteínas	79
6.2.2. Comprometimento Metabólico	82
6.3. FISIOPATOLOGIA COMPARATIVA NA CARDIOMIOPATIA DILATADA NÃO ISQUÊMICA AVANÇADA	86

7. CONCLUSÕES	88
8. TRABALHOS PUBLICADOS	89
9. REFERÊNCIAS.....	89
10. APÊNDICES.....	106
11. ANEXOS.....	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais componentes de um espectrômetro de massas.....	31
Figura 2: Fluxograma do método de análise proteômica.	31
Figura 3: Quantificação por Qubit™.....	33
Figura 4: Gradiente de eluição dos peptídeos trípticos fracionados em sistema LC-MS/MS..	35
Figura 5: Fluxograma do método de análise metabolômica.....	37
Figura 6: PCA <i>scores plot</i> dos dados metabolômicos obtidos por GC-Q-TOF.	40
Figura 7: Perfil de proteínas reguladas diferencialmente em plasma de pacientes com IC avançada (IC vs. CTRL).	44
Figura 8: Anotações GO quanto ao processo biológico e função molecular das proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes com IC avançada (IC vs. CTRL).....	45
Figura 9: Inter-relação das proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL.....	47
Figura 10: Volcano plot das proteínas discriminantes entre pacientes com IC avançada e pacientes CTRL.	47
Figura 11: OPLS-DA de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL.	49
Figura 12: Metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL por OPLS-DA.....	49
Figura 13: Boxplot dos metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL por OPLS-DA.	50
Figura 14: Rede metabólica associada à IC avançada de acordo com OPLS-DA (VIP score IC vs. CTRL).	51
Figura 15: Perfil de proteínas reguladas diferencialmente em plasma de pacientes com CCC (CCC vs. CTRL).....	52
Figura 16: Anotações GO quanto ao processo biológico e função molecular das proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes com CCC (CCC vs. CTRL).	52
Figura 17: Inter-relação das proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CCC e pacientes CTRL.....	55
Figura 18: Volcano plot das proteínas discriminantes entre pacientes com CCC e pacientes CTRL.....	55
Figura 19: OPLS-DA de pacientes com CCC e pacientes CTRL.	57
Figura 20: Metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com CCC e pacientes CTRL por OPLS-DA.....	57

Figura 21: Perfil de proteínas reguladas diferencialmente em plasma de pacientes com CDI (CDI vs. CTRL).....	58
Figura 22: Anotações GO quanto ao processo biológico e função molecular das proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes com CDI (CDI vs. CTRL).	59
Figura 23: Inter-relação das proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CDI e pacientes CTRL.....	61
Figura 24: Volcano plot das proteínas discriminantes entre pacientes com CDI e pacientes CTRL.....	62
Figura 25: OPLS-DA de pacientes com CDI e pacientes CTRL.	63
Figura 26: Metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com CDI e pacientes CTRL por OPLS-DA.....	63
Figura 27: Perfil de proteínas reguladas diferencialmente em plasma de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL (CCC vs. CDI vs. CTRL).	64
Figura 28: Agrupamento hierárquico por mapa de calor das proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL....	67
Figura 29: PLS-DA de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL.....	68
Figura 30: Metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL por PLS-DA.	69
Figura 31: Perfil de proteínas reguladas diferencialmente em plasma de pacientes com CMDNI chagásica (CCC vs. CDI).....	70
Figura 32: Anotações GO quanto ao processo biológico e função molecular das proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes com CMDNI chagásica (CCC vs. CDI).	71
Figura 33: Inter-relação das proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CCC e CDI.....	72
Figura 34: Volcano plot das proteínas discriminantes entre pacientes com CCC e CDI.	72
Figura 35: OPLS-DA de pacientes com CCC e pacientes com CDI.....	73
Figura 36: Metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com CCC e CDI por OPLS-DA.	74
Figura 37: Boxplot dos metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com CCC e pacientes com CDI por OPLS-DA.	74
Figura 38: Rede metabólica associada à CCC de acordo com OPLS-DA (VIP score CCC vs. CDI).....	75
Figura 39: Fisiopatologia da IC avançada e da CCC de acordo com as análises proteômica e metabolômica.	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Causas da cardiomiopatia dilatada não isquêmica.	17
Quadro 2: Classificação da insuficiência cardíaca.	19
Quadro 3: Escore de risco de mortalidade por cardiomiopatia chagásica crônica.	22
Quadro 4: Critérios para diagnóstico da cardiomiopatia dilatada idiopática.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características basais dos pacientes com CCC e CDI	42
Tabela 2. Proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL	45
Tabela 3. Metabólitos estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL.	48
Tabela 4. Proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CCC e pacientes CTRL	53
Tabela 5. Metabólitos estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CCC e pacientes CTRL.	56
Tabela 6. Proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CDI e pacientes CTRL	59
Tabela 7. Metabólitos estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CDI e pacientes CTRL.	62
Tabela 8. Proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL.....	65
Tabela 9. Metabólitos estatisticamente significantes na discriminação de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL.....	67
Tabela 10. Proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CCC e CDI	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAs – Aminoácidos

ACC/AHA – American College of Cardiology/American Heart Association (Colégio Americano de Cardiologia/Associação Americana do Coração)

AGs – Ácidos Graxos

ALT – Alanina Aminotransferase

ANOVA – Analysis of Variance (Análise de Variância)

AST – Aspartato Transaminase

ATP – Adenosine Triphosphate (Adenosina Trifosfato)

BNP – Peptídeo Natriurético do Tipo B

BRA – Bloqueadores dos Receptores da Angiotensina II

BSTFA – N, O-bistrifluoroacetamida

Ca²⁺ – Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CCC – Cardiomiopatia Chagásica Crônica

CDI – Cardiomiopatia Dilatada Idiopática

CMD – Cardiomiopatia Dilatada

CMDNI – Cardiomiopatia Dilatada Não Isquêmica

CTRL – Controle

CvDI – Cardioversor Desfibrilador Implantável

DCh – Doença de Chagas

DDA – Data Dependent Acquisition (Aquisição Dependente de Dados)

DDVE – Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo

DTT – Ditiotreitól

EDTA – Ethylenediamine Tetra Acetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)

EI – Electron Ionization (Impacto de Elétrons)

EIC – Extracted Ion Chromatogram (Cromatograma de Íons Extraídos)

FDR – False Discovery Rate (Taxa de Falsas Descobertas)

FEVE – Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo

GC – Gas Chromatography (Cromatografia Gasosa)

GMPc – Cyclic Guanosine-3',5'-monophosphate (Monofosfato Cíclico de Guanosina)

GO – Gene Ontology (Ontologia Gênica)

GT – Glutamil Transferase

HCD – Higher Energy Collisional Dissociation (Dissociação Induzida por Colisão de Alta Energia)

HIV – Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HTLV – Human T Lymphotropic Virus (Vírus Linfotrópico de Células T Humanas)

IAA – Iodoacetoamida

IC – Insuficiência Cardíaca

ICFEi – Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Intermediária

ICFEp – Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Preservada

ICFEr – Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida

ICTDF – Instituto de Cardiologia e Transplantes do Distrito Federal

IDO – Indolamina 2,3 Dioxigenase

IECA – Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina

IFN – Interferon

IgA – Imunoglobulina A

IgD – Imunoglobulina D

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – Interleucina

IMC – Índice De Massa Corporal

IP₃ – Inositol 1,4,5 Trisphosphate (Inositol 1,4,5 Trifosfato)

IP₃R – Inositol 1,4,5 Trisphosphate Receptors (Receptor de Inositol 1,4,5 Trifosfato)

IPs – Inositol Phosphates (Inositóis Polifosfato)

ITI – Inter- α -Trypsin Inhibitors (Inibidores Inter- α -Tripsina)

KNN – K-Nearest Neighbors (K-Vizinhos Mais Próximos)

LTQ – Linear Trap Quadrupole (Armadilha de Íons Linear)

m/z – Mass-to-charge (Massa/Carga)

MMPs – Matrix Metalloproteinases (Metaloproteínases Da Matriz)

MS – Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)

MS/MS – Tandem Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas em Sequência)

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas)

NF- κ B – Fator Nuclear κ B (*Nuclear Factor κ B*)

NT-proBNP – Fração N-terminal do Peptídeo Natriurético do Tipo B

NYHA – New York Heart Association

O₂ – Oxigênio

OPLS-DA – Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais)

PBS – Phosphate-buffered Saline (Tampão Fosfato-salino)

PCA – Principal Component Analysis (Análise dos Componentes Principais)

PIR – Protein Information Resource (Recurso de Informação de Proteínas)

PLS-DA – Partial Least Square Discriminant Analysis (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais)

QC – Quality Control (Controle de Qualidade)

Q-TOF – Quadrupole Time-of-flight (Quadrupolo – Tempo de Voo)

RER – Respiratory Exchange Ratio (Razão de Troca Respiratória)

RI – Retention Index (Índice de Retenção)

RSD – Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Relativo)

SCR – Síndrome Cardiorenal

SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SOD – Superóxido Dismutase

TEAB – Triethylammonium Bicarbonate (Bicarbonato de Trietilamônio)

TFA – Ácido Trifluoroacético

TIC – Total Ion Chromatogram (Cromatograma de Íons Totais)

TMCS – Trimethylsilyl Chloride (Clorotrimetilsilano)

TNF – Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)

TRC – Terapia de Ressincronização Cardíaca

Trp – Tryptophan (Triptofano)

TxC – Transplante Cardíaco

UHPLC – Ultra-high Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Performance)

v/v – Volume/Volume

VCO₂ – Volume de Dióxido de Carbono

VD – Ventrículo Direito

VE – Ventrículo Esquerdo

VIP score – Variable Importance in Projection Score (Escore de Variáveis Importantes na Projeção)

VO₂ – Volume de Oxigênio

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARDIOMIOPATIA DILATADA NÃO ISQUÊMICA AVANÇADA

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma doença do músculo cardíaco atribuída a causas genéticas ou não genéticas (Quadro 1) cujo desenvolvimento pode ocorrer a partir de uma longa fase pré-clínica sem dano cardíaco, mas que independentemente da etiologia, progride a um fenótipo patológico final comum caracterizado por dilatação e disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (VE) ou de ambos os ventrículos (ELLIOTT et al., 2007). Por definição, o comprometimento sistólico global não deve ser resultante de quadros de hipertensão ou de doença valvar, congênita ou coronariana, sendo necessário avaliar em especial a presença de lesões graves em artérias coronárias a fim de excluir a contribuição de um componente isquêmico à etiologia da doença, o que caracterizaria uma entidade patológica própria de fenótipo comparável – a cardiomiopatia isquêmica (REICHART et al., 2019). Assim, o uso do termo “CMD não isquêmica” (CMDNI) tornou-se frequente para esclarecer a condição em estudo, embora falhe ainda em excluir a CMD por sobrecarga de volume ou pressão.

<i>Etiologias Genéticas</i>	
Grupo	Subgrupo ou Agente
Principais genes associados a predominância do fenótipo cardíaco	TTN, LMNA, MYH7, TNNT2, MYBPC3, RBM20, MYPN, SCN5A, BAG3, PLN
Doenças neuromusculares	Distrofia muscular de Duchenne, de Becker e de Steinert
Erros inatos do metabolismo	Doenças mitocondriais e síndrome de Barth
<i>Etiologias Não Genéticas</i>	
Grupo	Subgrupo ou Agente
Medicamentos	Antitumorais (taxol, anticorpos monoclonais, inibidores de tirosina quinase e outros), psiquiátricos (clozapina, risperidona, antidepressivos tricíclicos e outros), cloroquina; ácido all-trans-retinóico; agentes anti-retrovirais; fenotiazinas
Sobrecarga tóxica	Etanol, cocaína, anfetaminas, ecstasy, arsênio, cobalto, esteroides anabólicos/androgênicos, sobrecarga de ferro
Deficiências nutricionais	Deficiência de selênio, tiamina (beribéri), carnitina, zinco e cobre
Ditúrbios hidroeletrólíticos	Hipocalcemia, hipofosfatemia
Distúrbios hormonais e metabólicos	Hipo e hipertireoidismo, doença de Addison, síndrome de Cushing, feocromocitoma, acromegalia e diabetes mellitus
Infecções	Viral (incluindo HIV), bacteriana (incluindo doença de Lyme), micobacteriana, fúngica, parasitária (doença de Chagas)
Doenças auto-imunes	Miocardite de células gigantes, CMD inflamatória, polimiosite/dermatomiosite; síndrome de Churg-Strauss; granulomatose de Wegener; lúpus eritematoso sistêmico, sarcoidose
Periparto	-
Idiopática	-

Quadro 1: Causas da cardiomiopatia dilatada não isquêmica.

CMD: cardiomiopatia dilatada; TTN: titina; LMNA: laminina A/C; MYH7: cadeia pesada da β -miosina; TNNT2: troponina T; MYBPC3: proteína C ligante de miosina; RBM20: proteína de ligação ao RNA 20; MYPN: miopaldina; SCN5A: subunidade α do canal de sódio; BAG3: atanogene 3 associada a BaCl2; PLN; fosfolamba. Fonte: adaptado de Pinto et al. (2016).

Frente à dificuldade em estabelecer perfis epidemiológicos de cardiomiopatias na população mundial – devido a carência de dados sistêmicos, a complexidade do diagnóstico de algumas condições e a frequente reclassificação –, a maioria dos estudos descritos na literatura reportam estatísticas de populações regionais ou tendem a extrapolar dados obtidos para subgrupos da doença. Todavia, de acordo com os últimos dados disponibilizados pela ferramenta de consulta *Global Health Data Exchange* (<http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>), criada pelo colaboradores do *Global Burden of Disease (GBD)*, estima-se que em 2019 a incidência de cardiomiopatia/miocardite em adultos com mais de 20 anos foi superior a 1 milhão de novos casos e que mais de 8 milhões de óbitos na faixa etária foram atribuídos às causas.

Recentemente, as diretrizes da Sociedade Europeia de Cardiologia para o tratamento de cardiomiopatias (ARBELO et al., 2023) resumiu que a prevalência da CMDNI em adultos varia entre 0.036–0.400%, baseando-se nos estudos de Codd et al. (1989) e Hershberger, Hedges e Morales (2013) da forma idiopática. Considerando que a prevalência de cardiomiopatias em países subdesenvolvidos e tropicais é maior, o número total de casos de CMDNI na América Latina presumivelmente supera as taxas reportadas para a forma idiopática nos Estados Unidos (36,5:100.000) e no Japão (14:100.000) (CODD et al., 1989; MIURA et al., 2002).

Acerca do espectro molecular da CMDNI, inicialmente observa-se uma estimulação dos sistemas simpático adrenérgico e renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e a mobilização de peptídeos natriuréticos a fim de aumentar o tônus vascular, o inotropismo e a retenção de sódio e água de maneira a sustentar a homeostase cardíaca. À medida que a doença progride, o comprometimento desses mecanismos leva ao remodelamento hipertrófico e predispõe gradativamente à insuficiência cardíaca (IC) (DADSON; HAUCK; BILLIA, 2017; VOLPE; CARNOVALI; MASTROMARINO, 2015). Não à toa, pacientes com CMDNI avançada regularmente apresentam sinais e sintomas de baixo débito e/ou congestão cardíaca, como dispneia progressiva, inchaço do tornozelo, ortopneia e capacidade de exercício reduzida.

Uma vez constatada a incapacidade de bombear sangue de forma a atender às necessidades metabólicas tissulares ou a efetivação somente com elevadas pressões de

enchimento intracardíaco (ROHDE et al., 2018), a IC é classificada de acordo com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), gravidade dos sintomas (NEW YORK HEART ASSOCIATION. CRITERIA COMMITTEE, 1994) e progressão da doença (HUNT et al., 2009) (Quadro 2).

Definição de insuficiência cardíaca de acordo com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo		
ICFEr	ICFEi	ICFEp
FEVE < 40%	FEVE 40 – 49%	FEVE ≥ 50%
BNP > 35-50pg/mL ou NT-proBNP > 125pg/mL	BNP > 35-50pg/mL ou NT-proBNP > 125pg/mL	BNP > 35-50pg/mL ou NT-proBNP > 125pg/mL
Alteração estrutural e disfunção sistólica	Alteração estrutural e/ou disfunção diastólica	Alteração estrutural e/ou disfunção diastólica
Classificação funcional de acordo com a gravidade dos sintomas (NYHA)		
Classe	Definição	Descrição
I	Ausência de sintomas	Assintomático
II	Limitação leve em atividades físicas habituais	Sintomas leves
III	Limitação importante em atividades físicas. Confortável somente em repouso	Sintomas moderados
IV	Incapacidade para realizar qualquer atividade. Sintomas até em repouso	Sintomas graves
Estágios de progressão da insuficiência cardíaca (ACC/AHA)		
Estágio	Descrição	Abordagens
A	Sem alteração estrutural ou sintomas de IC (sob risco de desenvolver)	Monitorar cardiotoxicidade. Controle de fatores de risco para IC
B	Alteração estrutural. Sem sintomas de IC	IECA, β-bloqueador e antagonistas mineralocorticoides
C	Alteração estrutural e sintomas de IC	Tratamento otimizado para ICFEr, TRC, CvDI, cirurgia e manejo multidisciplinar
D	IC refratária ao tratamento clínico	Medidas para estágio C, transplante cardíaco e dispositivos de assistência ventricular

Quadro 2: Classificação da insuficiência cardíaca.

BNP: peptídeo natriurético do tipo B; NT-proBNP: fração N-terminal do peptídeo natriurético do tipo B; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; NYHA: New York Heart Association; ACC/AHA: American College of Cardiology/American Heart Association; IC: insuficiência cardíaca; ICFEr: insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida; ICFEi: insuficiência cardíaca com fração de ejeção intermediária; ICFEp: insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada; CvDI: cardioversor desfibrilador implantável; IECA: inibidor da enzima conversora de angiotensina; TRC: terapia de ressincronização cardíaca. Fonte: adaptado de Rohde et al. (2018).

Dados obtidos no primeiro registro BREATHE demonstram que a CMDNI, não hipertensiva e não valvar é a segunda etiologia mais comum de IC no Brasil, correspondendo a 25,4% dos casos, dos quais 10,8% foram atribuídos à forma chagásica (ALBUQUERQUE et al., 2015). Nos Estados Unidos, dois terços dos óbitos de pacientes com CMD ocorrem devido a IC (BOZKURT et al., 2016), pois apesar do impacto positivo dos avanços terapêuticos na qualidade de vida e sobrevivência desses pacientes, alguns indivíduos progridem desfavoravelmente com sintomas incapacitantes e resistência ao tratamento otimizado, caracterizando a IC avançada (estágio D). Nesta fase, o transplante cardíaco (TxC) passa a ser considerado como uma opção terapêutica de prolongamento da vida, e em 2020 nos

Estados Unidos as cardiomiopatias representaram 60% das 4 mil indicações ao tratamento (COLVIN et al., 2022).

No Brasil, apesar da cardiomiopatia isquêmica ser predominante, a IC secundária à CMDNI lidera as indicações de TxC (BACAL et al., 2018). Tal estatística refere-se à menor incidência de comorbidades, cujos impactos são considerados na relação risco-benefício ao paciente (MANGINI et al., 2015). Dentre as etiologias, as CMDNI chagásica e idiopática destacam-se em número de casos, visto que o país é um dos principais focos endêmicos da Doença de Chagas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017) e a definição do subtipo da doença permanece desconhecida em 14,6% dos pacientes com IC (ALBUQUERQUE et al., 2015).

1.2. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

A Doença de Chagas (DCh), também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma das 20 doenças tropicais negligenciadas que ameaça mais de 75 milhões de pessoas no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). A infecção, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é um dos maiores obstáculos à saúde pública na América Latina devido a infraestrutura rudimentar propícia à reprodução dos vetores de transmissão triatomíneos (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019), com aproximadamente 7 milhões de casos relatados nas regiões endêmicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Dentre os 21 países listados, a Bolívia possui o maior índice de prevalência estimada, com cerca de 6% de sua população *T. cruzi* soropositiva, enquanto Argentina e Brasil lideram em número de pessoas infectadas, com mais de 1 milhão de casos estimados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015, 2017).

Nos últimos anos, registros crescentes de casos na América do Norte e Europa demonstram que a globalização e os padrões migratórios da população ocasionaram uma alteração no comportamento epidemiológico da doença, antes considerada de caráter rural (HOTEZ et al., 2013; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2015; STRASEN et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Diferentemente, em regiões não endêmicas o contágio da doença ocorre primariamente por transmissão vertical, de mãe para filho, e também por meio de transfusões sanguíneas, uma vez que somente a minoria destes países implementaram programas de triagem para doadores de sangue (ANGHEBEN et al., 2015; CARLIER et al., 2015; STRASEN et al., 2014).

A cada ano, mais de 10 mil mortes são atribuídas a manifestações clínicas da DCh, decorrentes principalmente do acometimento dos sistemas nervoso central, digestivo e

cardiovascular (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017, 2021). Clinicamente, a doença apresenta-se em 2 fases consecutivas: uma fase aguda, que na maioria dos casos é assintomática, e uma fase crônica, geralmente caracterizada sob a forma indeterminada a princípio (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Manifestações clínicas durante a infecção aguda ocorrem em somente 30% dos pacientes e, em alguns casos, o desenvolvimento de sintomas vagos podem dificultar o diagnóstico da doença nessa fase (GROOM; PROTOPAPAS; ZOCHIOS, 2017; MAGARAKIS et al., 2018). Aspectos clínicos específicos incluem intensa reação inflamatória no local da infecção vetorial (chagoma e Sinal de Romaña) e envolvimento cardíaco definido como miocardite aguda (GROOM; PROTOPAPAS; ZOCHIOS, 2017; VIEIRA et al., 2019).

Tipicamente, a resolução dos sintomas agudos ocorre de forma espontânea em até 8 semanas e 60 a 70% dos pacientes, apesar de soropositivos, permanecem assintomáticos em fase crônica indeterminada por um longo período (FALCHETTO; COSTA; ROCHITTE, 2015; ROSCOE et al., 2018). Casos de progressão direta entre fase aguda e crônica sintomática são raros, no entanto cerca de 30% dos portadores progridem e manifestam eventualmente alguma disfunção cardíaca devido ao tropismo do parasita pelas células do miocárdio, caracterizando a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (FALCHETTO; COSTA; ROCHITTE, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Considerada a manifestação clínica de pior prognóstico da DCh, a CCC é uma condição inflamatória degenerativa progressiva que ocasiona primariamente o acúmulo de colágeno no interstício miocárdico e perturbação do sistema condutor cardíaco (MARIN-NETO et al., 2007; ROSCOE et al., 2018). À medida que o sinergismo entre fatores imunológicos, inflamatórios, autonômicos e microvasculares promove a remodelação miocárdica (MARIN-NETO et al., 2007) e conseqüente progressão ao fenótipo final comum às CMDNI – dilatação e disfunção sistólica do ventrículo esquerdo ou de ambos os ventrículos – (ELLIOTT et al., 2007; HAMMERSLEY; HALLIDAY, 2020; PINTO et al., 2016), quadros de arritmia, complicações tromboembólicas, IC e morte súbita são observados adicionalmente (MAGARAKIS et al., 2018; VIEIRA et al., 2019).

A IC, outro grande problema de saúde pública na América Latina, é frequentemente relatada em portadores de CCC, uma vez que a progressão clínica desses pacientes apresenta maior severidade e pior desfecho se comparada a portadores de outras cardiomiopatias (BARBOSA et al., 2011; BERTOLINO et al., 2010; ROHDE et al., 2018; SHEN et al., 2017; VILAS BOAS et al., 2013). Quando descompensada, sua presença está altamente associada

ao mau prognóstico e baixo índice de sobrevivência de indivíduos chagásicos (BESTETTI et al., 1994; CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; MADY et al., 1994; RASSI et al., 2006; XAVIER; SOUSA; HASSLOCHER-MORENO, 2005), provavelmente devido ao maior grau de comprometimento cardíaco (menor fração de ejeção) e de instabilidade hemodinâmica (hipotensão arterial e frequência cardíaca mais baixas), aumento da ativação do sistema renina-angiotensina (hiponatremia), deterioração da função renal e aumento dos níveis séricos de citocinas (TNF- α) (CARDOSO et al., 2010a; SILVA et al., 2008).

Em pacientes com DCh especificamente, apenas a ICFer é observada (BESTETTI; DANIEL, 2016) e a FEVE deve ser monitorada regularmente para prevenção da IC manifesta (estágio C), uma vez que 3 a 20% desses pacientes apresentam dilatação assintomática do VE prévia (estágio B) (GONÇALVES et al., 2010; PETTI et al., 2008; ROHDE et al., 2018). Auxiliarmente, para fins de prognóstico, aplica-se também o sistema de pontuação proposto por Rassi et al. (2006) para estratificação do risco de morte em pacientes com CCC (Quadro 2).

Escore prognóstico de Rassi			
Fatores de risco			Pontos
NYHA classe III ou IV			5
Cardiomegalia (radiografia de tórax)			5
Anormalidade de motilidade global ou segmentar (ecocardiograma 2D)			3
Taquicardia ventricular não sustentada (Holter 24h)			3
Baixa voltagem no QRS (eletrocardiograma)			2
Sexo masculino			2
Total de Pontos	Mortalidade		Risco
	5 anos	10 anos	
0-6	2%	10%	Baixo
7-11	18%	44%	Intermediário
12-20	63%	84%	Alto

Quadro 3: Escore de risco de mortalidade por cardiomiopatia chagásica crônica. NYHA: New York Heart Association. Fonte: adaptado de Rassi et al. (2006).

Diante dos dados epidemiológicos da DCh e de estudos comparativos de coorte com amplas populações de IC descompensada demonstrando que a etiologia chagásica é um dos principais fatores determinantes da mortalidade cardiovascular (FREITAS et al., 2005; RASSI et al., 2005), é natural que a IC chagásica refratária (estágio D) represente a terceira causa mais comum de indicação ao transplante no Brasil (BACAL et al., 2018; MANGINI et al., 2015; SEGURO et al., 2014). No entanto, seu prognóstico pós-operatório por vezes melhor que o observado em casos equiparados de outras etiologias colabora para o caráter

imprevisível da doença (BACAL et al., 2018; BESTETTI; THEODOROPOULOS, 2009; BOCCHI; FIORELLI, 2001).

1.3. CARDIOMIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA

Identificar a causa subjacente das cardiomiopatias é essencial para a definição da estratégia terapêutica, monitoramento da evolução da doença e prognóstico. No entanto, quando não é possível atribuir uma das etiologias à CMDNI detectada – mesmo após extensa avaliação clínica incluindo técnicas de imagem cardíaca, histórico familiar, eletrocardiograma, marcadores sorológicos e por vezes biópsia endomiocárdica –, qualifica-se por critérios de exclusão (Quadro 4) como cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI).

<i>CMDNI de Etiologia Idiopática</i>	
Critérios de Inclusão	
	FEVE < 50%
	DDVE ≥ ao percentil de 95% para sexo e altura
Critérios de Exclusão	
	DAC causando cardiomiopatia isquêmica
	Doença valvar primária
	Exposição a medicamentos cardiotoxicos
	Outras causas detectáveis de cardiomiopatia
	Doença cardíaca congênita/estrutural
	Sarcoidose
	Amiloidose
	Sobrecarga de ferro
	Doença multissistêmica ativa causando CMD
	Hipertensão grave sem tratamento otimizado

Quadro 4: Critérios para diagnóstico da cardiomiopatia dilatada idiopática.

CMD: cardiomiopatia dilatada; CMDNI: cardiomiopatia dilatada não isquêmica; DAC: doença arterial coronariana; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Fonte: adaptado de Kinnamon et al. (2017).

Atualmente, o uso do termo CDI como referência a um diagnóstico de exclusão tem sido questionado por estudos como o *DCM Precision Medicine Study*, que investiga um possível componente genético associado ao desenvolvimento da CDI, inclusive em casos não familiares (KINNAMON et al., 2017). De fato, há evidências de origem familiar em 23% dos casos de CDI estudados por metanálise e estes foram irrogados a causas genéticas (PETRETTA et al., 2011). Mutações familiares que resultam em truncamentos da titina (vtTTN) são observadas em aproximadamente 25% dos casos de CDI (HERMAN et al., 2012). Além disso, o início da doença pode ser particularmente insidioso nas CMDNIs familiar e idiopática

(BOZKURT et al., 2016), e a escassa investigação por testes genéticos pode ser um importante fator para o diagnóstico não diferencial (ABABIO et al., 2023).

Perante a ausência de evidências de causas isquêmicas ou conhecidas e os achados histológicos inespecíficos, a literatura epidemiológica da CDI acaba por confundir-se com o histórico de relatos da CMDNI. Como visto anteriormente, os dados de distribuição da CMDNI em sua maioria são extrapolados a partir da CDI, assim estima-se que sua prevalência seja de 1:250–400 indivíduos em populações de estudo (CODD et al., 1989; HERSHBERGER; HEDGES; MORALES, 2013). Recentemente, em um estudo observacional retrospectivo, com validação clínica dos diagnósticos, a prevalência de CDI nos Estados Unidos foi estimada em 59,23:100.000 indivíduos, considerando a proporção obtida de 49,3% dentre os diagnósticos ratificados de CMDNI (ABABIO et al., 2023). Embora o número de casos relatados tenha sido superior ao observado em estudos populacionais anteriores, demonstrando a relevância crescente da elucidação da etiologia idiopática, ainda desconhece-se o verdadeiro peso clínico da CMDNI potencialmente genética.

Obter estimativas da verdadeira prevalência da CDI requer que o diagnóstico seja relatado após exame completa, de forma precisa e consistente, refletindo as diretrizes de diagnóstico atuais e incluindo as minorias raciais, visto que afro-americanos por exemplo possuem risco aumentado para CDI (COUGHLIN; LABENBERG; TEFFT, 1993). No que se refere à progressão a IC, definir a causa subjacente agrega valor prognóstico, uma vez que pacientes com CDI apresentam melhores taxas de sobrevivência do que aqueles portadores de outras cardiomiopatias, como chagásica e isquêmica (FELKER et al., 2000; SHEN et al., 2017). Em populações de estudos mais recentes, a sobrevivência de pacientes com IC secundária à CDI chegou a 93% em 5 anos quando tratados de acordo com as diretrizes atuais, sendo 84% livre de transplante (BROCH et al., 2015).

1.4. PROTEÔMICA E METABOLÔMICA NA CMDNI CHAGÁSICA E IDIOPÁTICA

A dificuldade em obter correspondência entre o diagnóstico ecocardiográfico pré-transplante e os achados anatomopatológicos de corações explantados reflete o quão desafiador é o diagnóstico das cardiomiopatias, até mesmo em estágios avançados, e a necessidade de novas ferramentas de investigação para por fim estabelecer uma estratégia terapêutica adequada (BEHZADNIA et al., 2021). Atualmente, na suspeita clínica de IC em consequência à CMDNI, a confirmação da etiologia chagásica é realizada por testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* (ANDRADE et al., 2011; BACAL et al., 2018; ROHDE et al., 2018)

e da etiologia idiopática via exclusão das demais causas. Quando o diagnóstico de IC é inconclusivo, a dosagem de peptídeos natriuréticos pode auxiliar na definição do quadro, embora exista uma incerteza sobre o ponto de corte ideal para pacientes ambulatoriais e restrições quanto à sua especificidade que limitam sua aplicação na prática (DANIELS et al., 2006; HOGENHUIS et al., 2007; MCCULLOUGH et al., 2003; REDFIELD et al., 2002; ROBERTS et al., 2015; ROHDE et al., 2018; TSUTAMOTO et al., 2006).

De uma perspectiva translacional, a caracterização de assinaturas moleculares fenotípicas pode aprofundar nosso conhecimento sobre CMDNI, CCC e CDI em um nível de detalhamento não alcançável pelas ferramentas ambulatoriais atualmente disponíveis e assim fornecer alicerce às decisões clínico-terapêuticas. Até o momento, não há sinais, sintomas ou alterações em exames complementares descritas como patognomônicas da CCC, embora esta por vezes apresente evolução clínica dessemelhante as outras cardiomiopatias (CARDINALLI-NETO et al., 2007; CARDOSO et al., 2010b; MARTINELLI FILHO et al., 2013). Mesmo o escore de Rassi et al. (2006), amplamente empregado para avaliar a sobrevida desses pacientes, considera fatores de risco inespecíficos da doença e o número de evidências científicas capazes de corroborar tal distinção ainda é limitado, favorecendo a vigência de diretrizes baseadas em extrapolações de resultados obtidos para outras etiologias em seu manejo clínico (CLELAND et al., 2005; MOSS et al., 2009).

Comparados à indivíduos controles, pacientes com CDI e CCC demonstram concentrações de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) elevadas em plasma, no entanto, a ativação local ou sistêmica de vias inflamatórias específicas e dependentes de IL-6 pode estar associada ao pior prognóstico da CCC se comparada a CDI (MOCELIN et al., 2005). Em estudo proteômico comparativo de amostras de tecido miocárdico, portadores de IC refratária decorrente de CCC e CDI não só apresentaram um maior número de proteínas desreguladas em relação aos indivíduos controle do que portadores da etiologia isquêmica, como também partilharam cerca de 77% dessas proteínas – em sua maioria relacionadas a disfunção mitocondrial. Apesar das semelhanças entre as CMDNIs, pacientes da etiologia chagásica exibiram maior enriquecimento das vias de β -oxidação de ácidos graxos (AGs), baixo potencial transmembranar mitocondrial e necrose cardíaca, sugerindo que a gravidade do prognóstico na CCC pode estar relacionado a intensidade do desequilíbrio do metabolismo energético mitocondrial (TEIXEIRA et al., 2021).

Tal severidade também pode ser atribuível a remodelação cardíaca progressiva, tendo em vista o alto índice de arritmias ventriculares e complicações tromboembólicas relatadas na CCC (VIEIRA et al., 2019). Para esses pacientes, alterações no padrão de expressão dos

peptídeos natriuréticos BNP e NT-proBNP podem não só fornecer indícios de remodelação do órgão (AZEVEDO et al., 2016; GRUPO DE ESPECIALISTAS EM BIOMARCADORES, 2014; ROHDE et al., 2018; ZORNOFF et al., 2009) como também sinalizar um desequilíbrio do metabolismo cardíaco de lipídeos associado à progressão da doença, uma vez que os mesmos desempenham papel lipolítico em adipócitos humanos (DESSÌ-FULGHERI; SARZANI; RAPPELLI, 2003; SENGENÈS et al., 2000) – local onde o *T. cruzi* remanesce e modifica suas funções a partir da regulação da lipólise e da inflamação (COMBS et al., 2005; NAGAJYOTHI et al., 2009, 2012).

Dentre outras consequências que refletem em dano cardíaco, a modulação do metabolismo lipídico induz variações nos níveis de metabólitos séricos, como acilcarnitinas, aminoácidos, aminas biogênicas, glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos, que resultam em sobrecarga hepática e podem assim predispor à CCC (LIZARDO et al., 2019). Com efeito, a infecção por *T. cruzi*, mesmo com diferentes cepas, altera o metaboloma de camundongos em regiões cardíacas específicas e distintas dos sítios de maior carga parasitária na DCh crônica, sobretudo no que se refere a abundância relativa de acilcarnitinas e glicerofosfocolinas (DEAN et al., 2021). Resultados semelhantes foram observados no estudo da DCh aguda, revelando que a modulação destes metabólitos pode estar associada ao mau prognóstico de pacientes chagásicos (MCCALL et al., 2017).

No contexto da patogênese da IC, relatos utilizando a abordagem metabolômica, em sua maioria, comparam portadores à pacientes controle (CHENG et al., 2015; MURASHIGE et al., 2020; SUN et al., 2016; WANG et al., 2013), ou IC em diferentes classes de FEVE (DEIDDA et al., 2015; HAGE et al., 2020; ZHAO et al., 2021), ou IC de origem idiopática e isquêmica, desconsiderando pacientes com CCC apesar de sua importância clínica e epidemiológica. Diversos metabólitos envolvidos na glicólise e no ciclo do ácido cítrico já foram descritos em soro de pacientes com IC idiopática com até até 5,7 vezes a abundância observada em indivíduos controle (HAAS et al., 2021). Outros 140 metabólitos foram detectados em plasma de portadores de IC idiopática e isquêmica em um estado de desregulação semelhante (ZHAO et al., 2020). Além disso, biópsias do VE de ambas as condições apresentam alterações em proteínas da matrix extracelular condizentes com a remodelação cardíaca, desequilíbrio de vias de sinalização do hormônio tireoidiano e reduções significativas do cofator riboflavina-5-monofosfato da oxidoreductase e do intermediário glicolítico frutose-6-fosfato (LI et al., 2020).

2. JUSTIFICATIVA

A IC secundária à CMDNI lidera as indicações de TxC no Brasil, com destaque em número de casos para as CMDNIs chagásica e idiopática. A CCC, considerada a complicação tardia mais importante da DCh, apresenta o pior prognóstico dentre as formas crônicas da infecção e evolução clínica por vezes dissimilar àquela observada em outras cardiomiopatias. Na prática, um dos maiores obstáculos é o monitoramento da progressão da doença, uma vez que quadros de IC descompensada são frequentemente relatados e sua presença, nestes portadores em especial, está altamente associada ao mau prognóstico e baixo índice de sobrevivência. Por ora, o número reduzido de evidências científicas capazes de corroborar as diferenças observadas entre as cardiomiopatias favorece a vigência de diretrizes baseadas em extrapolações de resultados obtidos para outras etiologias no manejo clínico da CCC.

Por outro lado, a CDI é uma condição cardíaca complexa e desafiadora, de causa subjacente desconhecida e melhores taxas de sobrevivência se comparada a outras cardiomiopatias, como a chagásica. Contudo, embora hajam indícios de componentes genéticos associados ao seu desenvolvimento, atualmente o termo “CDI” abrange um grupo muito heterogêneo de doenças, tanto no que diz respeito à causa quanto no que tange às manifestações clínicas, e definir a causa subjacente em estágios avançados de IC agrega valor prognóstico.

Sendo assim, o estudo das CMDNIs chagásica e idiopática torna-se imperativo não só diante de suas prevalências estimadas e impacto na saúde pública, mas também devido a uma urgente necessidade em se caracterizar fatores moleculares associados às doenças, com potencial discriminativo, a fim de elucidar as patogêneses por trás dos diferentes desfechos observados na clínica. Tais relatos devem ser meticolosos na descrição do acervo amostral para que os resultados sejam reprodutíveis, considerando a complexidade do diagnóstico e possíveis reclassificações que dificultam a comparação direta com coortes históricas.

Dados acerca da caracterização do perfil de proteínas e metabólitos em amostras de plasma obtidas de pacientes com CCC ou CDI no pré-TxC em centros de referência, podem auxiliar a expandir a atual compreensão dos aspectos moleculares sistêmicos da IC avançada não isquêmica, desmistificando aqueles associados às etiologias, de forma minimamente invasiva e fiel à homogeneidade dentro e entre os grupos de estudo. Explorar estágios avançados por meio de estudos de descoberta é fundamental para o entendimento dos potenciais impactos patofisiológicos a serem investigados em estudos translationais maiores e no futuro desenvolvimento de estratégias de monitoramento mais precisas, tratamentos específicos e, potencialmente, medidas preventivas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

→ Caracterizar o perfil de proteínas e metabólitos em plasma de pacientes com IC avançada secundária às cardiomiopatias chagásica e idiopática por espectrometria de massas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→ Caracterizar o perfil de proteínas e metabólitos em plasma de pacientes com IC não isquêmica avançada em contraste à condição controle;

→ Caracterizar o perfil de proteínas e metabólitos em plasma de pacientes com CCC/CDI em estágio avançado em contraste à condição controle;

→ Discriminar as assinaturas proteômica e metabolômica associadas às etiologias chagásica e idiopática na IC avançada.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. POPULAÇÃO DE PESQUISA

No presente estudo, participam 15 pacientes portadores de IC avançada secundária à CMDNI – 8 pacientes com CCC e 7 com CDI – encaminhados ao Serviço de Cirurgia Cardíaca do Instituto de Cardiologia e Transplante do Distrito Federal (ICTDF) para TxC. Também foram incluídos 12 doadores de coração para reproduzir experimentalmente as condições fisiológicas (grupo CTRL) e, por fim, discriminar as características moleculares particularmente associadas aos estágios avançados de IC não isquêmica, CCC e CDI. Para a elegibilidade, foram aplicadas as mesmas condutas dispostas na 3ª Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco (BACAL et al., 2018) e na Portaria MS-GM nº 2.600, de 21 de outubro de 2009 (<https://saude.gov.br>), as quais regulamentam os critérios adotados pelo país na classificação de doadores de coração e potenciais receptores de transplante do órgão.

As amostras de sangue periférico foram coletadas do acesso venoso central no intraoperatório do TxC e anteriormente à heparinização e esternotomia. Após a separação

induzida por centrifugação em tubos EDTA, os respectivos plasmas foram aliquotados e mantidos sob criopreservação em super freezer a -80°C até a realização dos procedimentos laboratoriais. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ICTDF (Parecer Consubstanciado 3.385.202) (ANEXO A), segundo os critérios preconizados pela norma vigente para pesquisa com seres humanos regulamentado na Resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

4.1.1. Crítérios de Inclusão

A seleção de pacientes com IC considerou os seguintes critérios:

- I. IC secundária à CMDNI chagásica ou idiopática;
- II. Condição refratária (estágio D);
- III. Classe funcional NYHA III ou IV;
- IV. ICFEr (FEVE < 40%);
- V. Etiologia chagásica confirmada por dois testes sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* positivos;
- VI. Etiologia idiopática confirmada por exclusão das demais causas conhecidas de CMD;
- VII. Encaminhamento ao TxC no ICTDF.

Para pacientes doadores, estes diagnosticados com morte encefálica, porém com suas funções fisiológicas sustentadas por aparelhos, considerou-se:

- I. Idade inferior a 50 anos;
- II. Ausência de doença cardíaca prévia ou atual;
- III. Encaminhamento ao TxC no ICTDF, a fim de preservar o método de coleta das amostras.

4.1.2. Crítérios de Exclusão

As principais contraindicações avaliadas na triagem de pacientes com IC foram:

- I. Retransplante;

- II. Idade superior a 70 anos;
- III. Hipertensão significativa;
- IV. Histórico de infarto agudo do miocárdio, doença arterial coronariana e/ou valvar;
- V. Doenças cerebrovasculares, vasculares periféricas graves, hepáticas ou pulmonares prévias;
- VI. IC secundária às cardiomiopatias isquêmica, valvar, periparto, congênita, hipertensiva e alcoólica.

Do mesmo modo, para a exclusão de pacientes doadores foram considerados os seguintes critérios:

- I. Malformação cardíaca ou disfunção ventricular significativa ao ecocardiograma;
- II. Septicemia ou síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS);
- III. Paradas cardíacas sem causas circunstanciais;
- IV. Testes sorológicos positivos e confirmatórios para DCh, hepatite B, hepatite C, sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus, HIV e/ou HTLV I e II.

4.2. TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Dentre as estratégias para caracterização de assinaturas moleculares, a espectrometria de massas (MS) destaca-se pela sensibilidade, aplicabilidade em amostras complexas como fluídos e tecidos biológicos, potencial multidisciplinar e compatibilidade a multiplataformas, permitindo a avaliação dos dados adquiridos de forma individual ou em conjunto, como em análises multiômicas.

Na prática, a técnica permite identificar, quantificar e elucidar propriedades físico-químicas de compostos e moléculas de interesse a partir da conversão em íons em fase gasosa e separação de acordo com a razão massa/carga (m/z) do analito (FENN et al., 1989). O instrumento – basicamente constituído por uma fonte de íons, um sistema de alto vácuo, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados (Figura 1) – gera gráficos (espectros de massas) em sinais da abundância *versus* razão m/z de cada íon. Assim, métodos baseados em MS podem não só enriquecer a compreensão das mais diversas doenças, como também favorecer a extensão futura para a clínica.

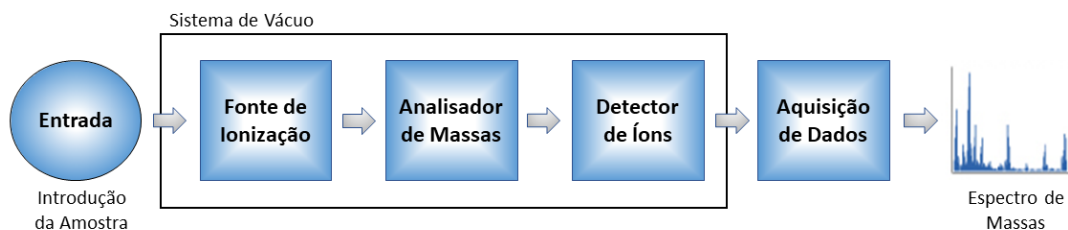


Figura 1: Principais componentes de um espectrômetro de massas.
 Fonte: elaborada pela autora (2023).

4.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

A proteômica baseada em MS revolucionou a compreensão da complexidade de peptídeos e proteínas, suas modificações e regulação nas mais diversas esferas. Na medicina, a cromatografia líquida combinada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) encontra-se atualmente em transição entre o pioneirismo e a simplificação da estrutura física e do preparo de amostras para adaptação à rotina laboratorial (SEGER; SALZMANN, 2020). O método possibilita a identificação direta e sensível de proteínas em misturas complexas como o plasma, e já compõe diversos protocolos de estudo da DCh, CCC, CDI e IC (CAMINHA et al., 2019; CAO et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2021; VALERO-MUÑOZ et al., 2022; ZAGO et al., 2019).

Aqui, a avaliação do perfil proteômico das amostras foi realizada a partir de protocolos que permitem a caracterização do painel global e abundância relativa das proteínas em cada grupo indicado no desenho experimental. O processo de análise está resumido na Figura 2.

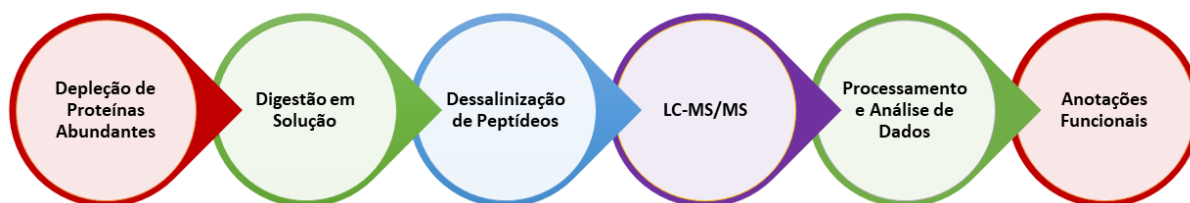


Figura 2: Fluxograma do método de análise proteômica.
 Resumo das principais etapas do processo de caracterização e discriminação do perfil de proteínas em plasma de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL. Fonte: elaborada pela autora (2023).

4.3.1. Preparo de Amostras

Considerando que diversas proteínas de interesse estão presentes em baixas quantidades no plasma e são difíceis de detectar na presença de proteínas altamente abundantes, as amostras

foram inicialmente depletadas em um único passo utilizando mini colunas *spin* pré-empacotadas com resina de afinidade por anticorpos imobilizados para albumina, IgA, IgD, IgE, IgM, IgG, IgG cadeias leves κ e λ , α -1-ácidoglicoproteína, α -1-antitripsina, α -2-macroglobulina, apolipoproteína A1, fibrinogênio, haptoglobina e transferrina (*High-Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Columns*, Thermo Fisher Scientific).

Nesta etapa, alíquotas de 10 μ L de plasma não diluído foram diretamente aplicadas nas colunas, que contêm tampão de PBS 10mM e azida sódica 0,02% (pH 7,4) para armazenamento, diluição e ligação. Após incubação em homogeneizador rotatório por 10 min e temperatura ambiente, as colunas foram acopladas a tubos coletores e centrifugadas a 1000 \times g por 2 min para eluição das proteínas de interesse, posteriormente quantificadas utilizando o método de Qubit™. Os filtrados de proteínas abundantes foram coletados em novos tubos e estocados a -80°C.

4.3.2. Quantificação de Proteínas e Peptídeos

A quantificação da concentração de proteínas das amostras foi realizada a partir da detecção de fluorescência pela técnica de Qubit™ (Invitrogen). A primeira etapa compreende o preparo do reagente fluorescente a partir da junção entre as soluções de fluoróforo e tampão na proporção de 1:200. Em seguida, adicionou-se 5 μ l de amostra diluída em água Milli-Q® (1:3) ao reagente a fim de atingir o volume final de 200 μ l. As misturas foram incubadas por 15 min cada, em temperatura ambiente, de forma sequencial, e então analisadas no equipamento portátil Qubit™.

Após a leitura de cada amostra, a concentração final foi obtida multiplicando-se o valor da leitura pelo fator de diluição escolhido. O protocolo do fabricante é apresentado na Figura 3.

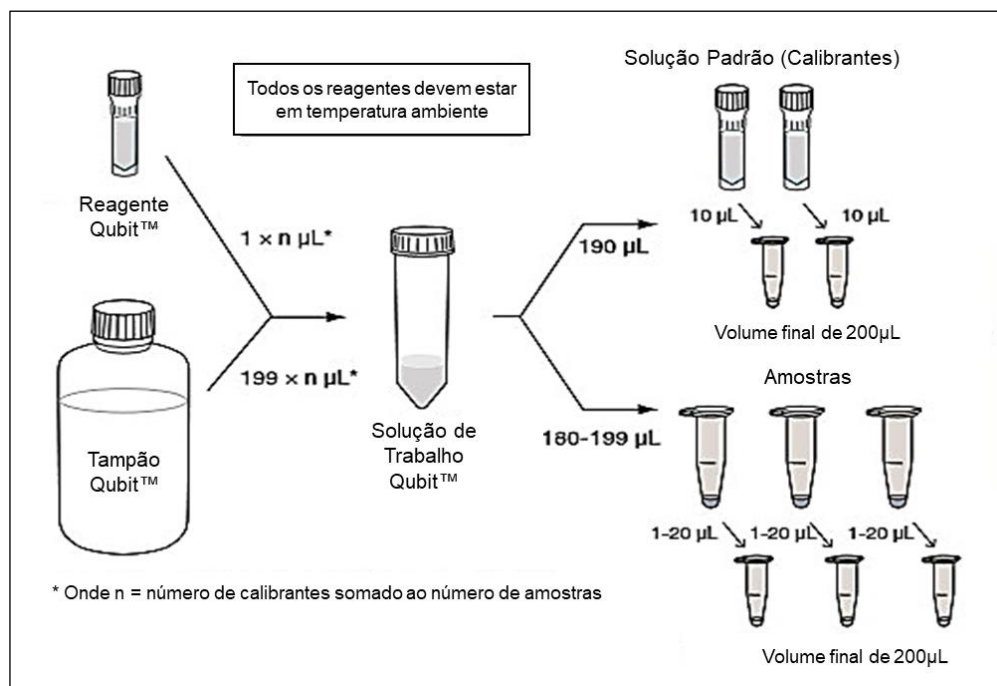


Figura 3: Quantificação por Qubit™.

Instruções do fabricante acerca do procedimento para calibração e quantificação. Fonte: adaptado do fabricante (Invitrogen).

4.3.3. Digestão Triptica de Proteínas em Solução (Clássica)

Foram aliqüotadas $30 \mu\text{g}$ de proteína em tubos de baixa adsorção para proteínas e peptídeos (Eppendorf® LoBind) para o processo de digestão. Após liofilização em concentrador rotatório SpeedVac™ SC100 (Savant™), os extratos proteicos foram ressuspendidos em solução de TEAB 20mM, ureia 8M e DTT 5mM (pH 7,9) e incubados em thermomixer por 25 min a 55°C e 400rpm. Após resfriamento, adicionou-se solução de IAA suficiente para atingir concentração final de 14mM e incubou-se novamente por 40 min a 21°C e 400rpm no escuro. Ao final, adicionou-se solução de DTT suficiente para atingir concentração final de 5mM a fim de parar a reação de alquilação.

As amostras foram diluídas em seguida na razão 1:5 com solução de TEAB 20mM (pH 7,9) devido a intolerância da enzima tripsina às altas concentrações de ureia, já considerando a adição de solução de CaCl_2 suficiente para atingir concentração final de 1mM e a adição de tripsina (Promega) na razão 1:50 (tripsina:proteína). Após incubação por 13 horas a 37°C e 300rpm para digestão, adicionou-se TFA na concentração final de 1% a fim de parar a reação e evitar clivagens inespecíficas. Os digestos proteicos foram dessalinizados imediatamente.

4.3.4. Dessalinização de Peptídeos

Os peptídeos trípticos foram dessalinizados em micro colunas *home-made* de fase reversa. Construídas em ponteiras P200 a partir de discos Empore™ SPE (Sigma-Aldrich, USA), com partículas C18 de característica hidrofóbica, as micro colunas permitem a purificação e enriquecimento dos peptídeos a partir da retirada de sal e subsequente eluição dos mesmos.

Para o seu preparo, foram realizadas sequências de centrifugação a 1000_xg por 3 min com 100μL de metanol, seguido de 100μL de ácido acético 0,5% v/v em acetonitrila 80% v/v, e por fim 100μL de ácido acético 0,5% v/v. Os digestos proteicos foram então adicionados às colunas, centrifugados a 900_xg durante 4 min e dessalinizados duas vezes com 100μL de ácido acético 0,5% v/v a 1000_xg por 3 min.

A eluição dos peptídeos foi realizada com concentrações crescentes de acetonitrila (25%, 50%, 80% e 100%), mantendo-se a concentração de ácido acético a 0,5% nas soluções, e centrifugações lentas de 600_xg durante 3 min. As frações, de 20μL cada, foram coletadas em um único tubo Eppendorf® LoBind por amostra e, após liofilização em concentrador rotatório SpeedVac™ SC100 (Savant™), armazenadas a -80°C até a quantificação na plataforma Qubit™.

4.3.5. Análise *Label-Free* por LC-MS/MS

As amostras foram analisadas em sistema Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific). Da fração de peptídeos dessalinizados, 2μg foram injetados em pré-coluna *home-made* (100μm de diâmetro interno x 4cm de comprimento) com partículas esféricas de sílica revestidas por C18 ReprosilPur de 5μm e poros de 120Å (Dr. Maich GmbH) para remoção de resíduos de sais. O gradiente de eluição foi composto de 98% de fase A (ácido fórmico 0,1% v/v) a 2% de fase B (ácido fórmico 0,1% v/v em acetonitrila) em fluxo de 3μL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados em coluna analítica *home-made* (75μm de diâmetro interno x 20cm de comprimento) com partículas C18 ReprosilPur de 3μm e poros de 120Å (Dr. Maich GmbH) utilizando um gradiente de eluição em fluxo de 0.250μL/min composto de 95% de fase A a 45% de fase B por 180 min e 45% a 80% de fase B durante 10 min, totalizando 190 min (Figura 4). Após cada corrida, a coluna foi reequilibrada com 98% de fase A por 20 min.

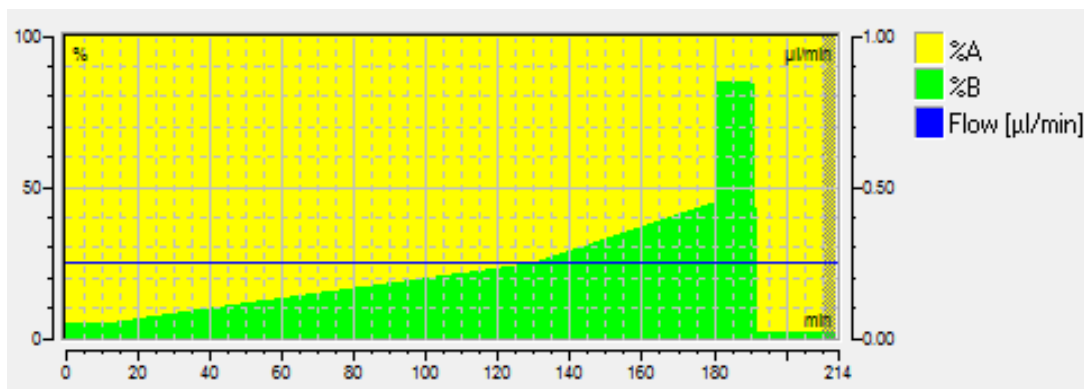


Figura 4: Gradiente de eluição dos peptídeos tripticos fracionados em sistema LC-MS/MS.

Fonte: adaptado do software Xcalibur™ (Thermo Fisher Scientific).

Os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo com aquisição de espectros de MS/MS dependente de dados (Data Dependent Acquisition – DDA). Em MS1 foram obtidos espectros de precursores em alta resolução (120.000 FWHM), entre 350 – 1650 m/z . Cada varredura foi seguida por fragmentação (MS2) pelo método de dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD) dos 15 íons mais intensos de carga > 2 , também em alta resolução (15.000 FWHM). As sequências de íons detectadas na faixa de erro de 10ppm foram excluídas dinamicamente por 90 seg e a janela de isolamento foi definida considerando precursores ≥ 2 m/z , energia de colisão normalizada a 35% e sinal mínimo requerido de 3000.

4.3.6. Análise de Dados

Os espectros foram processados no *software* Progenesis QI (Nonlinear Dynamics©), onde primeiramente são submetidos ao alinhamento do tempo de retenção cromatográfico e normalização baseados em uma corrida de referência, e em seguida à quantificação de acordo com a área de intensidade integrada dos picos recuperados do cromatograma de íons extraídos (EIC, *Extracted Ion Chromatogram*).

Os peptídeos detectados foram então triados utilizando o filtro ANOVA ($p \leq 0,05$), a fim de garantir dados estatisticamente significantes. Peptídeos com máximo de 5 fragmentações foram aceitos para exportação e identificação na plataforma Peaks® Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions, Inc.) obedecendo os seguintes parâmetros: proteínas com mínimo de 2 peptídeos, taxonomia *Homo sapiens*, banco de dados UniProtKB - SWISS-PROT/TrEMBL (nov/2023), acurácia em MS1 de 10ppm; acurácia em MS2 de 0,05Da; até 2 locais de clivagem perdidos; carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa; oxidação de metionina como modificação variável; até 5 modificações variáveis permitidas por peptídeo. Após filtrar o

espectro-peptídeo correspondente (PSM, *Peptide-Spectrum Match*) por taxa de falsas descobertas (FDR, *False Discovery Rate*) ($< 1\%$), a lista de proteínas identificadas foi exportada para revisão dos padrões de expressão e escores de identificação no *software* Progenesis QI. A relação final pode ser observada no APÊNDICE A.

Para avaliar o potencial discriminativo das proteínas identificadas em *i) IC x CTRL* e *ii) CCC x CDI x CTRL*, construiu-se um arquivo com os dados de abundância bruta correspondentes em cada amostra para processamento no *software* Viime (<http://www.Viime.org>) (CHOUDHURY et al., 2020). Os dados foram inicialmente normalizados por soma e, devido ao grande número de variáveis, transformados em escala logarítmica. Os dados foram inicialmente filtrados por significância ($p < 0,05$) e previsão estatística (FDR $< 0,05$) aplicando-se *i)* teste de Wilcoxon associado ao teste de Hocheberg e *ii)* ANOVA associado ao teste post hoc de Tukey para todos os possíveis pareamentos de grupos – *CCC x CTRL*, *CDI x CTRL*, *CCC x CDI*. Os resultados foram hierarquicamente agrupados por mapa de calor e tanto para *i)* como para *ii)*, avaliou-se ainda a correlação (≥ 0.06) entre proteínas filtradas e a magnitude da variação entre as abundâncias detectadas para cada proteína identificada (fold change $\geq \pm 1.2$), a fim de garantir não só dados estatisticamente significantes mas também com variações relativas à abundância entre os cenários.

4.3.7. Anotações Funcionais

Para obter informações mais detalhadas sobre as proteínas que melhor distinguem os cenários experimentais, foram realizados enriquecimentos baseados em ontologia gênica (GO, *Gene Ontology*) quanto à função molecular e processo biológico no *software* Metascape (<https://www.metascape.org>) (ZHOU et al., 2019), que além das anotações também identifica regiões densamente conectadas em redes de interação proteína-proteína. Os três termos GO mais significativamente enriquecidos nessas regiões são combinados para anotar putativamente papéis biológicos para o possível complexo molecular detectado (MCODE, *Molecular Complex Detection*). Todas as anotações são filtradas por significância ($p \leq 0.01$) e as interações combinam dados dos *software* STRING (score > 0.132), OmniPath, InWeb_IM and BioGrid.

4.4. ANÁLISE METABOLÔMICA

A MS é considerada uma tecnologia emergente em análises de lipídeos e metabólitos, campo no qual já foi implementada não apenas na prática clínica, mas também no centro

cirúrgico por meio das tecnologias iKnife e MasSpec Pen (BALOG et al., 2013; EBERLIN et al., 2012; ST JOHN et al., 2017; ZHANG et al., 2016, 2017). Dentre os métodos, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é considerada o padrão-ouro para a caracterização do perfil de pequenas moléculas desde a década de 1970, devido as suas bibliotecas públicas padronizadas e unificação de todos os íons fragmentados em espectros de massa purificados (FIEHN, 2016).

Aqui, a técnica compõe o protocolo de estudo do perfil metabolômico das amostras a fim de caracterizar o painel global e a abundância relativa de pequenas moléculas em cada grupo indicado no desenho experimental. O processo de análise é resumido na Figura 5.



Figura 5: Fluxograma do método de análise metabolômica.

Resumo das principais etapas do processo de caracterização e discriminação do perfil de metabólitos em plasma de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL. Fonte: elaborada pela autora (2023).

4.4.1. Preparo de Amostras

Para realizar a análise por cromatografia gasosa (GC) acoplada à MS é necessário que os analitos possuam boa volatilidade e estabilidade térmica. Dessa forma, compostos de alta massa molar e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares (-COOH, -OH, -NH, -SH) devem ser derivatizados a fim de gerar novos produtos com melhores propriedades cromatográficas. Adotou-se aqui o protocolo de duas etapas que abrange oximação e sililação (MASTRANGELO et al., 2015).

Inicialmente, alíquotas de 50µL de plasma foram diluídas em 150µL de acetonitrila fria contendo 15ppm de padrão interno para controle de derivatização (ácido 4-nitrobenzóico) e vigorosamente vortexadas por 2 min. Após 5 min em repouso no gelo, para facilitar a precipitação de proteínas, as misturas foram centrifugadas a 154000_xg por 10 min a 4°C para induzir a separação de fases. Recuperados os sobrenadantes, alíquotas de 100µL foram transferidas para um frasco equipado com *insert* próprio para GC e liofilizadas a 30°C em um concentrador a vácuo (SpeedVac Concentrator, Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras foram reconstituídas em 10µL de piridina contendo 15ppm de hidrocloreto de o-metoxiamina e homogeneizadas por vórtex e sonicação em Tip Sonicador Q125 (QSonica) com intensidade

a 40% do potencial em 3 ciclos de 10 seg cada. Para permitir a metoximação completa, os frascos foram mantidos no escuro em temperatura ambiente por 16 horas.

No dia seguinte, 10 μ L de N, O-bistrifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de clorotrimetilsilano (TMCS) foram adicionados em cada frasco. Após agitação em vórtex por 5 min, as amostras foram primeiramente incubadas a 70°C por 1 hora e então mantidas em temperatura ambiente por mais 1 hora no escuro para a sililação completa. Em seguida, 100 μ L de heptano contendo 20ppm de tricosano (padrão interno para controle de injeção) foram adicionados e homogeneizados por 2 min em vórtex. Para finalizar, as amostras foram centrifugadas a 2500rpm por 15 min a 20°C.

Também foram derivatizadas, de forma aleatória para evitar possíveis vieses, quatro brancos de amostragem, substituindo o plasma pela mesma quantidade de água Milli-Q® (50 μ L), e cinco controles de qualidade (QC), aliqüotados (50 μ L) a partir da mistura homogênea de 100 μ L de cada amostra de paciente participante do estudo.

4.4.2. Análise por GC-Q-TOF

As amostras foram analisadas por um cromatógrafo gasoso modelo 7890A (equipado com amostrador automático 7693, Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo tempo-de-voo 7200 (Q-TOF, Agilent Technologies). Da fração de amostras derivatizadas, 1 μ L foi injetado em pré-coluna J&W 122-5532G de 10m (Agilent Technologies, EUA) e fracionado em coluna analítica DB5-MS (60m x 0,25mm x 0,25 μ m, filme 95% dimetil/5% difenilpolisiloxano) aplicando-se um gradiente de temperatura de 60°C a 325°C, com aquecimento de 10°C/min, e 10 min a 325°C para eluição. A injeção foi realizada em modo *splitless*, na razão 1:10, mantendo-se a porta a 250°C para vaporização da amostra e o fluxo do gás de arraste (hélio) em 1ml/min. As temperaturas da fonte de ionização e da linha de transferência foram mantidas a 200°C e 280°C, respectivamente.

O espectrômetro de massas foi operado em modo varredura na faixa de 50-500 m/z com a fonte de ionização por impacto de elétrons (EI) constante a -70eV, tendo em vista que a fragmentação diretamente na fonte gera espectros característicos e de alta reprodutibilidade, por conseguinte permite a comparação às bibliotecas para posterior identificação dos compostos. Para a aquisição, de 5 espectros/segundo, utilizou-se a ferramenta *Instrument Control* do *software* MSD ChemStation (Agilent Technologies). Todos os cromatogramas e picos de padrões internos foram cuidadosamente analisados para verificar a qualidade da derivatização dos compostos, estabilidade analítica e qualidade dos dados. Uma mistura de n-

alcanos (1µL, C₈-C₂₈, Sigma-Aldrich, USA) foi analisada no início do experimento como padrão externo de referência para posterior identificação e caracterização dos compostos.

A sequência de análise incluiu a injeção inicial de dois brancos e cinco QCs, para remover quaisquer compostos residuais, equilibrar e verificar a estabilidade do sistema pré-análise. A cada bloco de cinco amostras de estudo, um QC foi injetado para assegurar as condições do sistema e, ao final da análise, injetou-se dois brancos para garantir que não ocorresse a acumulação de analitos.

4.4.3. Processamento de Dados

Os cromatogramas de íons totais (TICs, *Total Ion Chromatograms*) das amostras foram inicialmente submetidos a deconvolução espectral no *software* Unknowns Analysis (Agilent Technologies), para identificação e desdobramento de possíveis compostos coeluídos, e em seguida ao alinhamento do tempo de retenção cromatográfico no *software* Mass Profile Professional 14,9 (Agilent Technologies).

Considerando que a identificação putativa dos compostos requer dois parâmetros independentes, inicialmente construiu-se um arquivo de calibração no *software* MassHunter Qualitative B.10.00 (Agilent Technologies) com número de carbonos, tempo de retenção experimental e índice de retenção (RI) (consultado no *software* NIST MS Search – Gaithersburg, MD, EUA) dos n-alcanos analisados. Estes parâmetros foram em sequência utilizados para o cálculo do RI de cada composto detectado, cujos resultados foram comparados aos RI descritos nas bibliotecas Fiehn 2013, NIST17 e PCDL (*in-house*) para colunas analíticas semelhantes. Os espectros de fragmentação dos compostos também foram comparados aos padrões de fragmentação presentes nessas bibliotecas.

Após conferência e refinamento das anotações manualmente, aplicou-se o método semiquantitativo de normalização para a integração das áreas percentuais dos picos ($\text{área\%} = \frac{\text{área}_{\text{interesse}}}{\text{área}_{\text{total}}} \times 100$) recuperados do EIC no *software* Mass Hunter Quantitative B.08.00 (Agilent Technologies), considerando um íon quantificador e dois íons qualificadores (95% de confiança). A integração foi checada e corrigida manualmente, e uma tabela contendo os metabólitos/entidades moleculares (*unknown*) e suas respectivas áreas de intensidade em cada amostra analisada foi gerada. Nesta, os valores ausentes foram substituídos por zero e a área média dos brancos de amostragem foi subtraída da área de cada analito em cada amostra de paciente e QC analisados. Finalmente, os valores negativos foram substituídos por “NA”

(*missing value*) e as análises dos brancos de amostragem removidas, gerando uma matriz de dados brutos.

Para assegurar a qualidade dos dados obtidos, os metabólitos que estavam presentes em menos que 70% das amostras de cada grupo do desenho experimental e/ou cujos desvios padrões relativos (RSD) das áreas eram superiores a 25% nos QCs foram ainda removidos, e o conjunto de dados normalizado pelos padrões internos de derivatização e injeção (ácido 4-nitrobenzóico e tricosano, respectivamente), gerando duas novas matrizes de dados.

4.4.4. Análise de Dados

Tanto a matriz de dados brutos quanto as matrizes de dados normalizados foram direcionadas à plataforma online MetaboAnalyst 4.0® (<http://www.metaboanalyst.ca>) (CHONG et al., 2018) para análise multivariada. Inicialmente, os *missing values* foram substituídos por um valor estimado segundo o algoritmo KNN e os dados normalizados via mediana, transformação logarítmica e escala de Pareto. Em seguida, a análise dos componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*) permitiu observar o agrupamento natural dos QCs, para certificar a confiabilidade do método experimental, e das amostras, a fim de selecionar a matriz mais adequada para a análise dos dados – no presente estudo a matriz normalizada pelo padrão ácido 4-nitrobenzóico (Figura 6).

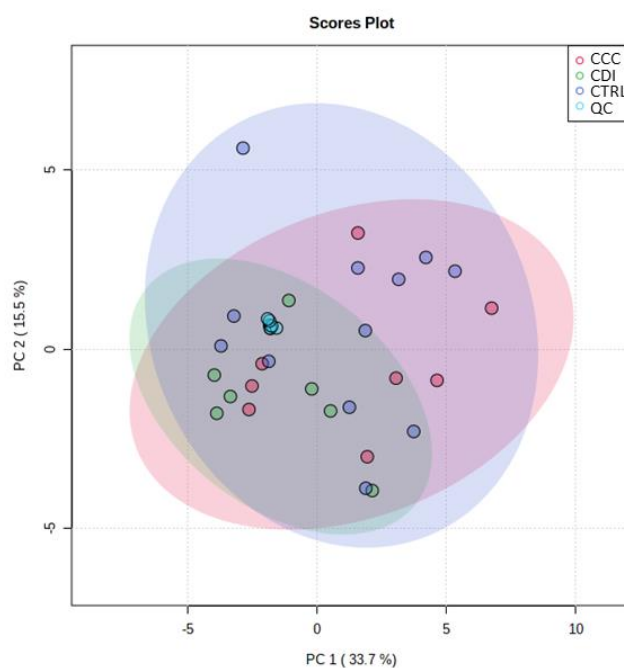


Figura 6: PCA scores plot dos dados metabolômicos obtidos por GC-Q-TOF.

Dados normalizados pelo padrão interno de derivatização ácido 4-nitrobenzóico. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

Uma vez definida, a matriz referência foi conduzida às análises supervisionadas PLS-DA e OPLS-DA para avaliação das capacidades preditiva e descritiva dos modelos segundo a seleção de variáveis discriminativas. Também foram avaliados o agrupamento hierárquico por mapa de calor dos metabólitos de maior contribuição para a caracterização dos cenários (VIP score $\geq 1,0$), e suas interações físicas ou funcionais (escore de confiança $\geq 0,900$) segundo fontes experimentais, bancos de dados e vizinhança genômica na plataforma online STITCH (KUHN et al., 2010).

Para avaliar o potencial discriminativo dos metabólitos individualmente, também foram realizadas análises univariadas a partir da matriz referência para *i) IC x CTRL* e *ii) CCC x CDI x CTRL* utilizando a linguagem estatística R (versão 4.1.0) e seguindo os pacotes Nortest, Stats, Onewaytests e Ggplot2. A princípio, o teste de Shapiro-Wilk verificou a normalidade dos dados em ambas as análises. Isto posto, dados com distribuição paramétrica foram filtrados por significância ($p < 0,05$) e homogeneidade das variâncias ($p > 0,05$) aplicando-se *i) teste T não-pareado associado ao teste F* e *ii) ANOVA associada ao teste de Bartlett*. Aos dados não paramétricos, foram aplicados os testes de *i) Wilcoxon* e *ii) Kruskal-Wallis* com a mesma finalidade.

Por fim, a aplicação do critério de previsão estatística FDR $< 0,05$ permitiu refinar os resultados observados nos testes de significância em *i) e em ii) os testes post hoc de Tukey e de Dunn* – para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente – examinaram todos os possíveis pareamentos de grupos (*CCC x CTRL, CDI x CTRL, CCC x CDI*) a fim de identificar os metabólitos estatisticamente significantes entre as condições. Para as comparações entre 2 grupos, foram ainda calculadas as variações percentuais entre as áreas médias de intensidade de cada metabólito prospectado.

5. RESULTADOS

5.1. DADOS CLÍNICOS

A Tabela 1 apresenta as características demográficas e clínicas dos pacientes com IC avançada avaliados no presente trabalho. Indivíduos com CCC e CDI foram pareados por sexo, idade, peso, índice de massa corporal, classe funcional de NYHA, perfil hemodinâmico, histórico médico, dados físicos, ecocardiográficos e laboratoriais, medicamentos em uso e

dispositivos cardíacos. Com exceção da idade, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca, não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) entre os grupos e todos os pacientes com IC apresentavam disfunção ventricular direita.

Tabela 1. Características basais dos pacientes com CCC e CDI.

Características	CCC (n = 8)	CDI (n = 7)	p-Valor
Sexo masculino	6 (75%)	4 (57,14%)	0,855
Idade, anos	56,6 ($\pm 10,6$)	29,3 ($\pm 21,9$)	0,03
Peso, kg	57,5 ($\pm 12,5$)	61,1 ($\pm 20,9$)	1
IMC, kg/m ²	21,2 ($\pm 4,81$)	22,7 ($\pm 7,93$)	1
Classe funcional de NYHA ⁽¹⁾	-	-	0,232
I/II	0(0%)	1 (14,29%)	-
III	4(50%)	2 (28,57%)	-
IV	4(50%)	4 (57,14%)	-
Perfil hemodinâmico ⁽²⁾	-	-	0,935
A	1 (12,5%)	1 (14,29%)	-
B	4 (50%)	4 (57,14%)	-
C	3 (37,5%)	2 (28,57%)	-
Histórico	-	-	-
Hipertensão	1 (12,5%)	1 (14,29%)	1
Dislipidemia	4 (50%)	1 (14,29%)	0,36
Infarto do miocárdio	0 (0%)	0 (0%)	-
Acidente vascular cerebral	3 (37,5%)	1 (14,29%)	0,506
Tabagismo	0 (0%)	1 (14,29%)	1
Fibrilação atrial	2 (25%)	2 (28,57%)	0,506
Exame Físico	-	-	-
PA sistólica, mmHg	95,4 ($\pm 16,8$)	105 ($\pm 12,8$)	0,152
PA diastólica, mmHg	58,4 ($\pm 9,2$)	71,9 (± 13)	0,042
Frequência cardíaca, bpm	64,2 (± 11)	83,1 ($\pm 18,6$)	0,02
Saturação O ₂ , %	99 (± 1)	99 ($\pm 0,9$)	0,7
Ecocardiograma	-	-	-
FEVE, %	26 (± 7)	25 (± 8)	0,955
DDVE, mm	69,4($\pm 7,76$)	64 ($\pm 9,19$)	0,473
Disfunção diastólica	6 (75%)	7 (100%)	0,344
Disfunção ventricular direita	8 (100%)	7 (100%)	-
Laboratório	-	-	-
Hemoglobina, g/dL	12,7 ($\pm 2,29$)	12,1 ($\pm 2,11$)	0,601
Uréia, mg/dL	80,5 ($\pm 29,9$)	64,4 ($\pm 51,9$)	0,281
Creatinina, mg/dL	2,2 ($\pm 2,14$)	1,21 ($\pm 0,815$)	0,129
Sódio, mEq/L	138 ($\pm 1,85$)	137 ($\pm 1,99$)	1
AST, U/L	35,6 ($\pm 28,1$)	18,7 ($\pm 5,38$)	0,145
ALT, U/L	30,3 ($\pm 26,5$)	17 ($\pm 8,49$)	0,442
Bilirrubina total, mg/dL	1,0 ($\pm 0,92$)	1,21 ($\pm 0,85$)	0,52
Fosfatase alcalina, U/L	106 ($\pm 43,9$)	76 ($\pm 8,28$)	0,127
γ -GT, U/L	97,6 ($\pm 68,7$)	98,7 ($\pm 62,8$)	0,897
Medicamentos	-	-	-
IECA	2 (25%)	1 (14,29%)	0,4

BRA	2 (25%)	3 (42,86%)	0,175
β -bloqueadores	8 (100%)	4 (57,16%)	0,155
Espironolactona	6 (75%)	7 (100%)	0,509
Diuréticos de alça	6 (75%)	6 (85,71%)	1
Diuréticos tiazídicos	1 (12,5%)	1 (14,29%)	1
Hidralazina/nitrato	4 (50%)	1 (14,29%)	0,36
Digoxina	2 (25%)	0 (0%)	0,509
Amiodarona	5 (62,5%)	1 (14,29%)	0,17
Escore de Rassi ⁽³⁾	14,8 (\pm 2,2)	-	-
Dispositivos cardíacos ⁽⁴⁾	5 (62,5%)	2 (28,58%)	0,23

Fonte: Dados cedidos pelo Instituto de Cardiologia e Transplante do Distrito Federal (ICTDF).

Nota: (IECA) Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina; (ALT) Alanina Aminotransferase; (BRA) Bloqueadores dos Receptores da Angiotensina II; (AST) Aspartato Transaminase; (IMC) Índice De Massa Corporal; (GT) Glutamil Transferase; (DDVE) Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo; (FEVE) Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo; (NYHA) New York Heart Association; (O₂) Oxigênio. Sinais convencionais utilizados: (-) não se aplica. Os dados são expressos como média (\pm desvio padrão) ou como número (%).

⁽¹⁾ Classificação funcional de acordo com a gravidade dos sintomas.

⁽²⁾ Estratificação por grau de congestão e adequação da perfusão.

⁽³⁾ Escore para predição do risco de morte em pacientes com CCC.

⁽⁴⁾ Cardioversores desfibriladores implantáveis, marcapassos e terapia de resincronização cardíaca (estimulação biventricular).

5.2. INSUFICIÊNCIA CARDÍACA AVANÇADA vs. CONTROLE

A fim de caracterizar as assinaturas proteômica e metabolômica da IC avançada e observar a estratificação de pacientes atualmente praticada, foram inicialmente comparados os perfis de pacientes com CCC e CDI vs. pacientes CTRL.

5.2.1. Análise Proteômica

Dentre as 118 proteínas identificadas, 51 apresentavam-se em estado de regulação positivo em plasma de pacientes com IC avançada e 67 em regulação negativa se comparadas aos pacientes CTRL. Na avaliação por PCA, a contribuição de cada proteína para a caracterização das amostras resultou em uma tendência de agrupamento semelhante aos cenários fenotípicos em estudo, demonstrando que na IC ocorre uma alteração do perfil global de proteínas plasmáticas (Figura 7A). Para a presente comparação, o poder estatístico obtido com a média de 13 replicatas por condição é equivalente a aproximadamente 75% (Figura 7B).

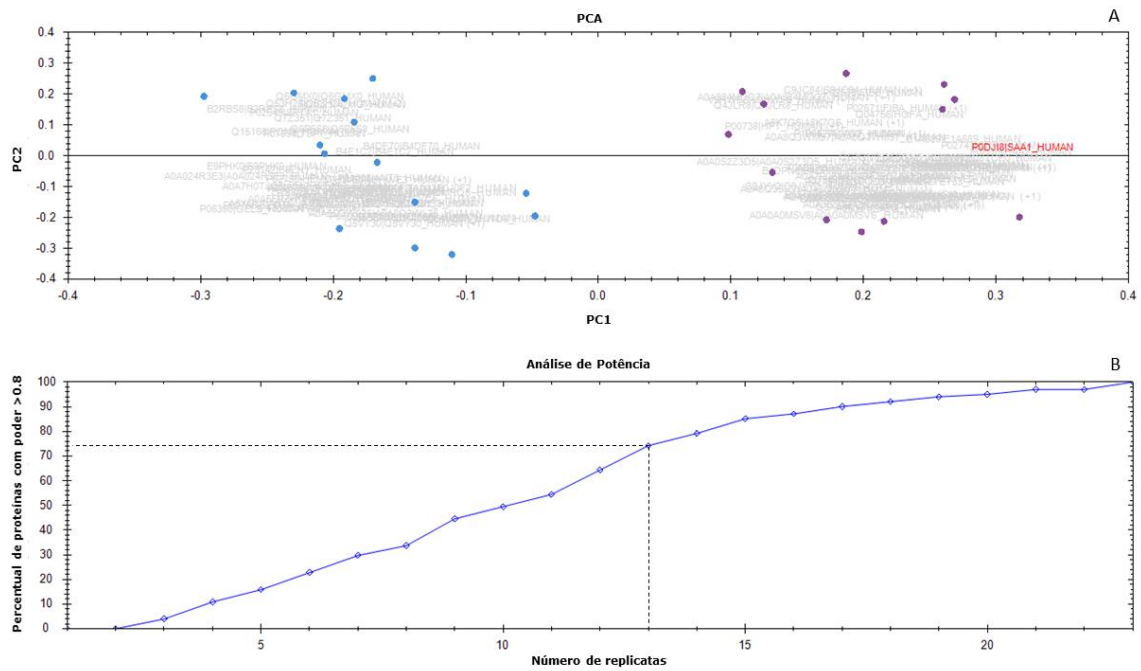


Figura 7: Perfil de proteínas reguladas diferencialmente em plasma de pacientes com IC avançada (IC vs. CTRL).

(A) PCA *biplot*. As amostras de pacientes com IC avançada são representadas em azul e de pacientes CTRL em roxo. Em cinza, as proteínas são ordenadas de acordo com a representatividade para a caracterização dos cenários. (B) Potência estatística do conjunto de dados proteômicos. Fonte: adaptado do *software* Progenesis QI.

As anotações funcionais por GO para processos biológicos e funções moleculares demonstraram que as proteínas reguladas positivamente na IC estão significativamente implicadas no catabolismo do peróxido de hidrogênio (Figura 8A). Além disso, a densa interação entre 6 proteínas envolvidas no transporte de óxido nítrico e ligação à haptoglobina sugerem maior atividade de um complexo molecular associado ao papel das hemoglobinas na IC (Figura 8B).

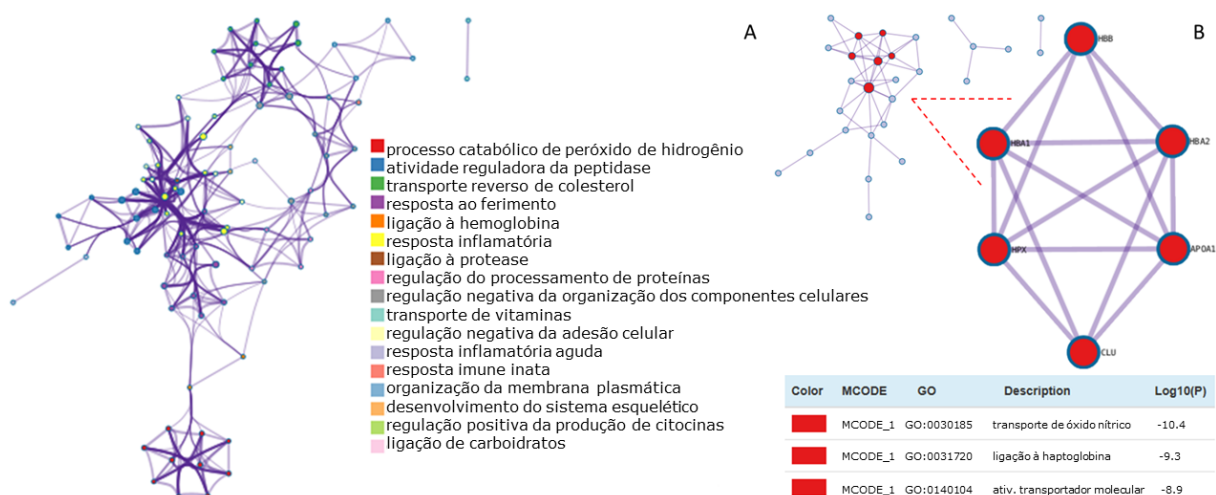


Figura 8: Anotações GO quanto ao processo biológico e função molecular das proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes com IC avançada (IC vs. CTRL).

(A) Rede de termos enriquecidos. Os termos são apresentados em ordem decrescente de significância ($p \leq 0.01$). (B) Rede de interação proteína-proteína e componentes MCODE identificados. Fonte: adaptado do *software* Metascape.

Em análise univariada, 44 proteínas foram consideradas estatisticamente significantes para a discriminação dos cenários, sendo 36 reguladas positivamente na IC e 8 reguladas negativamente em comparação ao CTRL (Tabela 2).

Tabela 2. Proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL

<i>Proteínas</i>	<i>p-Valor</i>	<i>FDR</i>
<i>Reguladas Positivamente na IC avançada</i>		
<i>APOA1 (Epididymis secretory sperm binding protein)</i>	6.21266E-06	0.000664755
<i>LUM (Epididymis secretory sperm binding protein)</i>	5.63281E-05	0.005238514
<i>ADID (Adiponectin D)</i>	0.000527869	0.039590172
<i>BTD (Biotinidase - fragment)</i>	7.7037E-05	0.006933328
<i>A0A7H0TJC6 (Heparin cofactor II splice isoform)</i>	6.21266E-06	0.000664755
<i>A0A8Q3WL25 (Coagulation factor XII)</i>	4.03823E-05	0.003876699
<i>HBD (Delta globin)</i>	0.00010458	0.009203019
<i>CP (CP protein)</i>	8.28E-07	9.36041E-05
<i>A6XGL1 (Transthyretin)</i>	4.03823E-05	0.003876699
<i>B2R7F8 (Plasminogen)</i>	9.31899E-06	0.000969175
<i>B2R8I2 (cDNA, FLJ93914, highly similar to homo sapiens histidine-rich glycoprotein, mRNA)</i>	3.93468E-06	0.000428881
<i>B2RBS8 (cDNA, FLJ95666, highly similar to homo sapiens albumin, mRNA)</i>	2.87853E-05	0.002878532
<i>KLKB1 (cDNA, FLJ51250, highly similar to plasma kallikrein)</i>	0.000139992	0.011759322
<i>B7Z8Q5 (cDNA FLJ56762, highly similar to hyaluronan-binding protein 2)</i>	0.000318502	0.025161684
<i>ECM1 (Truncated extracellular matrix protein 1)</i>	2.00876E-05	0.002028847
<i>D3JV41 (C-X-C motif chemokine - fragment)</i>	3.93468E-06	0.000428881
<i>CLEC3B (C-type lectin domain family 3 member B)</i>	5.63281E-05	0.005238514
<i>ATRN (Attractin)</i>	1.38749E-05	0.001429119
<i>SERPINC1 (Antithrombin-III)</i>	0.000139992	0.011759322
<i>A2M (Alpha-2-macroglobulin)</i>	0.000411278	0.03166841

<i>SPTA1 (Spectrin alpha chain, erythrocytic 1)</i>	0.000318502	0.025161684
<i>AHSG (Alpha-2-HS-glycoprotein)</i>	4.14E-07	4.76304E-05
<i>HPX (Hemopexin)</i>	3.93468E-06	0.000428881
<i>APOD (Apolipoprotein D)</i>	2.48506E-06	0.000278327
<i>GSN (Gelsolin)</i>	4.14E-07	4.76304E-05
<i>APOA4 (Apolipoprotein A-IV)</i>	5.63281E-05	0.005238514
<i>THBS1 (Thrombospondin-1)</i>	2.00876E-05	0.002028847
<i>FBLN1 (Fibulin-1)</i>	9.31899E-06	0.000969175
<i>AFM (Afamin)</i>	0.00010458	0.009203019
<i>Q53H26 (Serotransferrin - fragment)</i>	0.000139992	0.011759322
<i>RBP4 (Retinol-binding protein)</i>	0.000411278	0.03166841
<i>Q6GMX0 (Ig-like domain-containing protein)</i>	0.000244158	0.019776758
<i>DKFZp686N02209 (Uncharacterized protein)</i>	7.7037E-05	0.006933328
<i>PGLYRP2 (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase)</i>	0.000139992	0.011759322
<i>APOA2 (Apolipoprotein A-II - fragment)</i>	7.7037E-05	0.006933328
<i>HEL-S-11 (Carbonic anhydrase)</i>	4.03823E-05	0.003876699
Reguladas Negativamente na IC avançada		
<i>B3KS79 (cDNA, FLJ35730 FIS, clone TESTI2003131, highly similar to alpha-1-antichymotrypsin)</i>	0.000244158	0.019776758
<i>E1A689 (Mutant Apo B 100)</i>	9.31899E-06	0.000969175
<i>CRP (C-reactive protein)</i>	8.28E-07	9.36041E-05
<i>S100A8 (Protein S100-A8)</i>	0.000154499	0.01282344
<i>S100A9 (Protein S100-A9)</i>	4.03823E-05	0.003876699
<i>SAA1 (Serum amyloid A-1 protein)</i>	2.07E-07	2.44365E-05
<i>SAA2 (Serum amyloid A-2 protein)</i>	4.14E-07	4.76304E-05
<i>LBP (Lipopolysaccharide-binding protein)</i>	0.000527869	0.039590172

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Nota: (FDR) False Discovery Rate; (RSD) Relative Standard Deviation.

A intensidade relativa e inter-relação das 44 proteínas, bem como o agrupamento das amostras resultante, são demonstrados por escala de cor na Figura 9A. A correlação entre as mesmas, detalhada de forma interativa ao lado (Figura 9B), demonstra que a maioria das proteínas estão diretamente correlacionadas, logo à medida que a abundância de uma determinada proteína aumenta ou diminui, o mesmo acontece com aquelas cujo grau de correlação é positivo. Todas as proteínas apresentaram ao menos uma relação de covariância significativa.

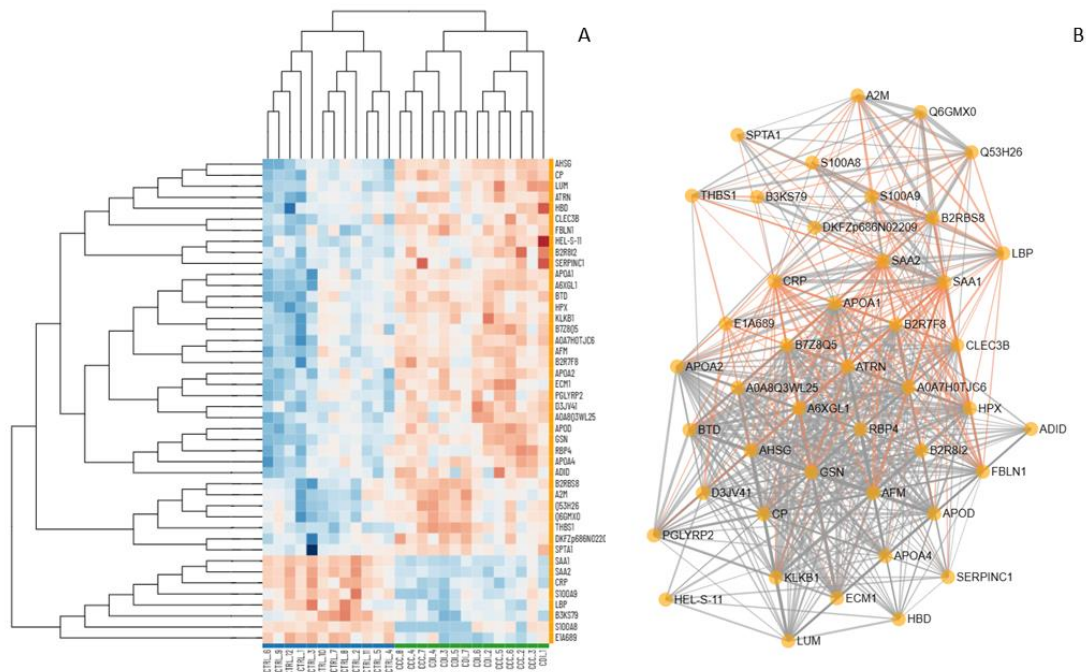


Figura 9: Inter-relação das proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL.

(A) Agrupamento hierárquico por mapa de calor. Os arranjos expressam a relação entre as proteínas ou amostras. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. (B) Rede de correlação ($r \geq 0.6$). Linhas mais espessas representam correlações mais fortes, sendo cinza para correlações positivas e laranja para correlações negativas. Fonte: adaptado do software Viime.

O estado de regulação e graus de significância e magnitude das proteínas identificadas são condensados na Figura 10. Todas as 44 proteínas foram qualificadas nos filtros aplicados.

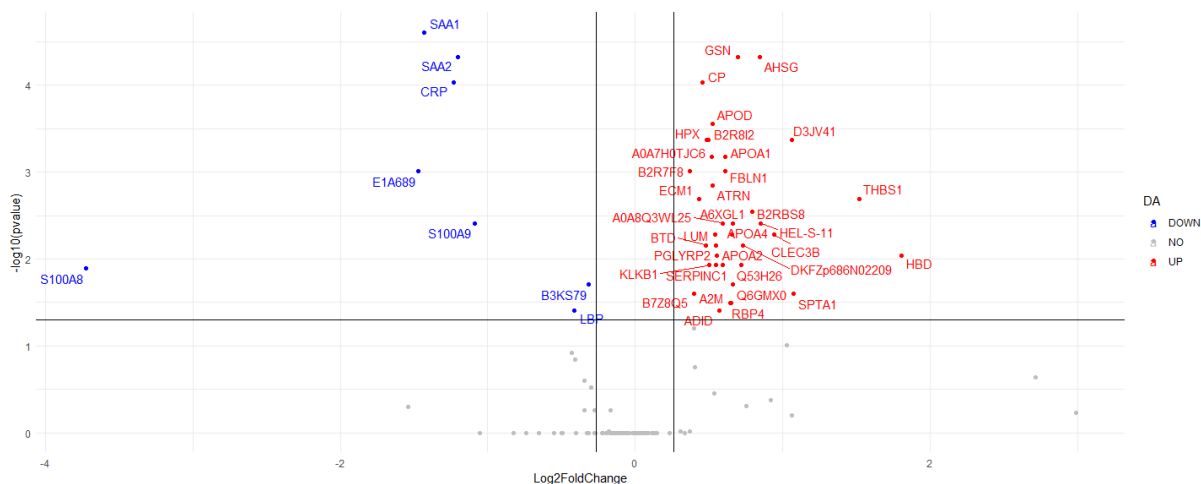


Figura 10: Volcano plot das proteínas discriminantes entre pacientes com IC avançada e pacientes CTRL.

A linha horizontal determina o limiar de significância ($p \leq 0.05$) e as linhas verticais os limiares negativo e positivo de magnitude (fold change $\geq \pm 1.2$). Cada ponto no gráfico representa uma proteína, onde aquelas cuja abundância está reduzida em relação ao grupo CTRL estão localizadas à esquerda e aquelas cuja abundância está elevada são ilustradas à direita. Proteínas estatisticamente significantes com variações de pelo menos 20% são representadas em azul e vermelho. Fonte: adaptado do software Viime.

5.2.2. Análise Metabolômica

Nas análises univariadas, 13 metabólitos foram considerados estatisticamente significantes para a discriminação das condições, sendo variações positivas indicativas de maior intensidade em plasma de pacientes com IC e variações negativas de menor intensidade (Tabela 2).

Tabela 3. Metabólitos estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL.

<i>Compostos</i>	<i>FDR</i>	<i>QC (RSD%)</i>	<i>Varição (%)</i>
<i>Ácido Glicérico</i>	0,0002	18,3	166,9
<i>Ácido Linoleico</i>	0,001	5,4	174,1
<i>L-5-Oxoprolina</i>	0,005	17,8	76,0
<i>Ácido 3-Hidroxibutírico</i>	0,005	16,2	400,1
<i>Ácido Oleico</i>	0,005	5,5	145,2
<i>Ácido 2-Ceto-3-Metilvalérico</i>	0,006	10,3	89,3
<i>Colesterol</i>	0,006	9,6	-35,9
<i>Ácido Palmítico</i>	0,01	4,5	160,6
<i>Ácido 13-Octadecenóico</i>	0,01	5,7	87,4
<i>Mio-Inositol</i>	0,02	18,5	28,7
<i>Ácido Palmitoleico</i>	0,02	5,2	121,5
<i>Ácido Glicólico</i>	0,02	19,8	79,0
<i>Unknown 11</i>	0,02	15,8	-64,6

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Nota: (FDR) False Discovery Rate; (RSD) Relative Standard Deviation.

Na estatística multivariada, a avaliação por OPLS-DA revelou um perfil metabólico distinto no comprometimento cardíaco, com validade preditiva (Q^2) de 0,83 (Figura 11A e 11B, respectivamente).

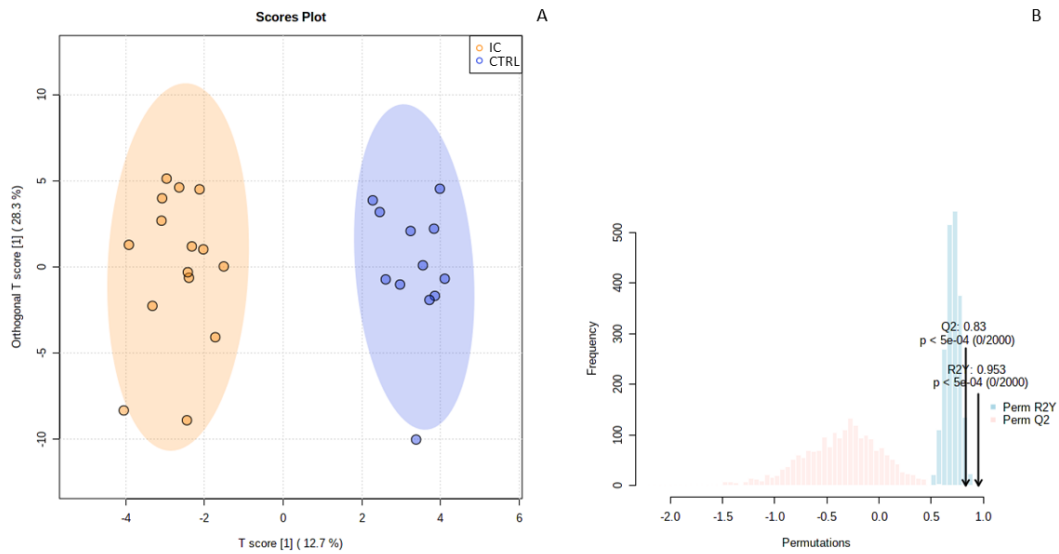


Figura 11: OPLS-DA de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL.

(A) *Scores plot*. A porcentagem de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção plotada e as regiões elípticas correspondem ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada ponto no gráfico corresponde a uma amostra de paciente. (B) Validação do modelo. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

O modelo permitiu ainda a análise dos metabólitos de maior representatividade e contribuição para a diferenciação dos cenários (Figura 12). Dentre os 24 metabólitos de contribuição considerada significativa ($VIP \text{ score} \geq 1.0$), 21 apresentaram maior intensidade relativa em pacientes com IC avançada. A variação na intensidade desses compostos em cada condição fenotípica, exceto daqueles não identificados, é detalhada na Figura 13 por *box plot*.

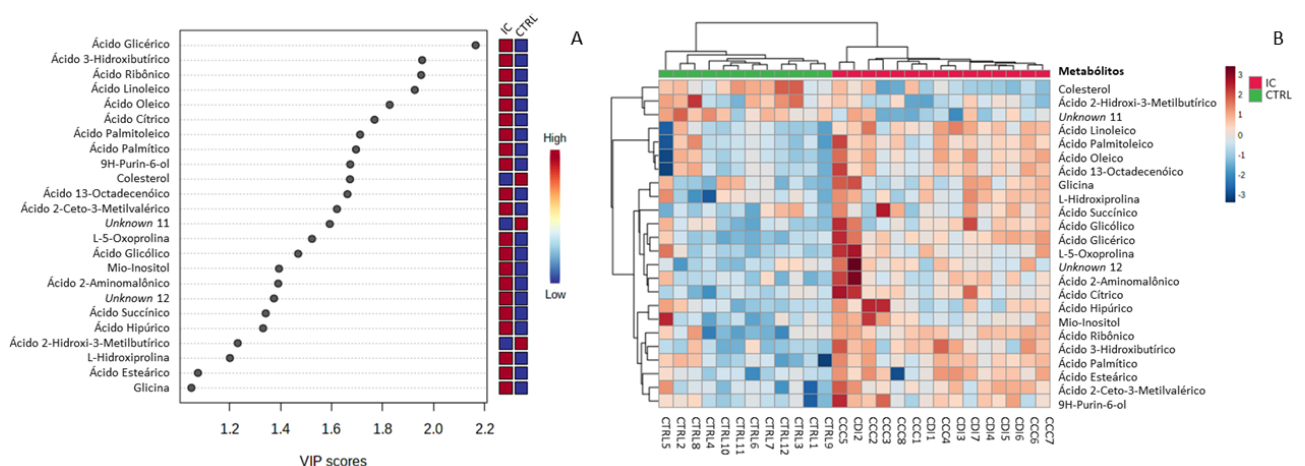


Figura 12: Metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL por OPLS-DA.

(A) *VIP score*. Os metabólitos estão organizados em ordem de representatividade e as caixas coloridas à direita indicam suas intensidades relativas em cada grupo fenotípico. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. (B) Agrupamento hierárquico por mapa de calor. Os arranjos expressam a relação dos metabólitos ou das amostras e a escala colorida à direita indica a intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

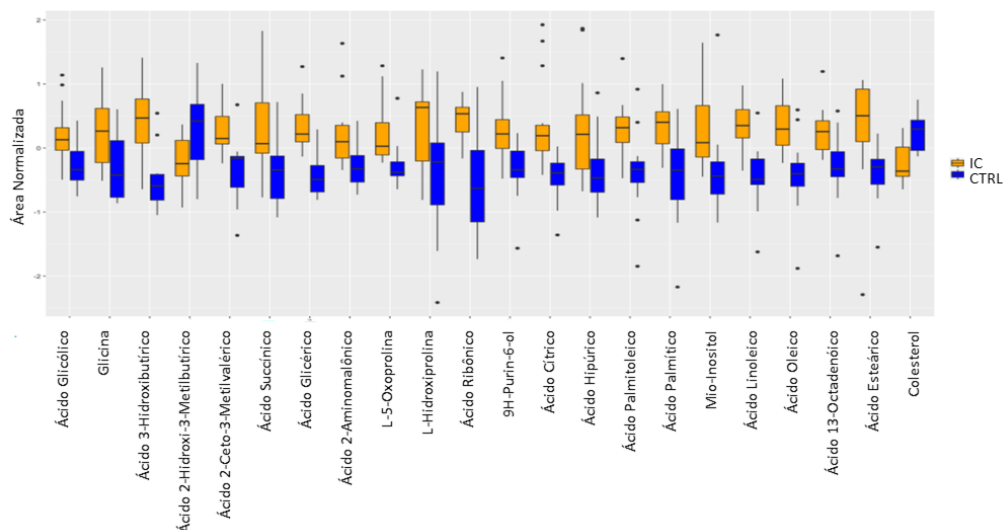


Figura 13: Boxplot dos metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com IC avançada e pacientes CTRL por OPLS-DA.

O diagrama mostra a distribuição dos compostos em quartis para cada condição. Cada ponto fora do intervalo corresponde a uma amostra *outlier*. Fonte: elaborada pela autora (2023).

Dos 21 metabólitos mais intensos em pacientes com IC avançada, um (1) era uma entidade desconhecida (unknown), não sendo possível identificá-la; cinco (5) pertencem à classe dos AGs e conjugados; quatro (4) à aminoácidos, peptídeos e análogos; dois (2) à álcoois e polióis; dois (2) à carboidratos e conjugados de carboidratos; um (1) à ácidos benzóicos e derivados; um (1) à β hidroxiácidos e derivados; um (1) à ácidos dicarboxílicos e derivados; um (1) à ácidos linoleicos e derivados; um (1) à purina e derivados de purina; um (1) à cetoácidos de cadeia curta e derivados; e um (1) à ácidos tricarboxílicos e derivados (Figura 14A). A potencial rede de interação desses metabólitos é demonstrada na Figura 14B.

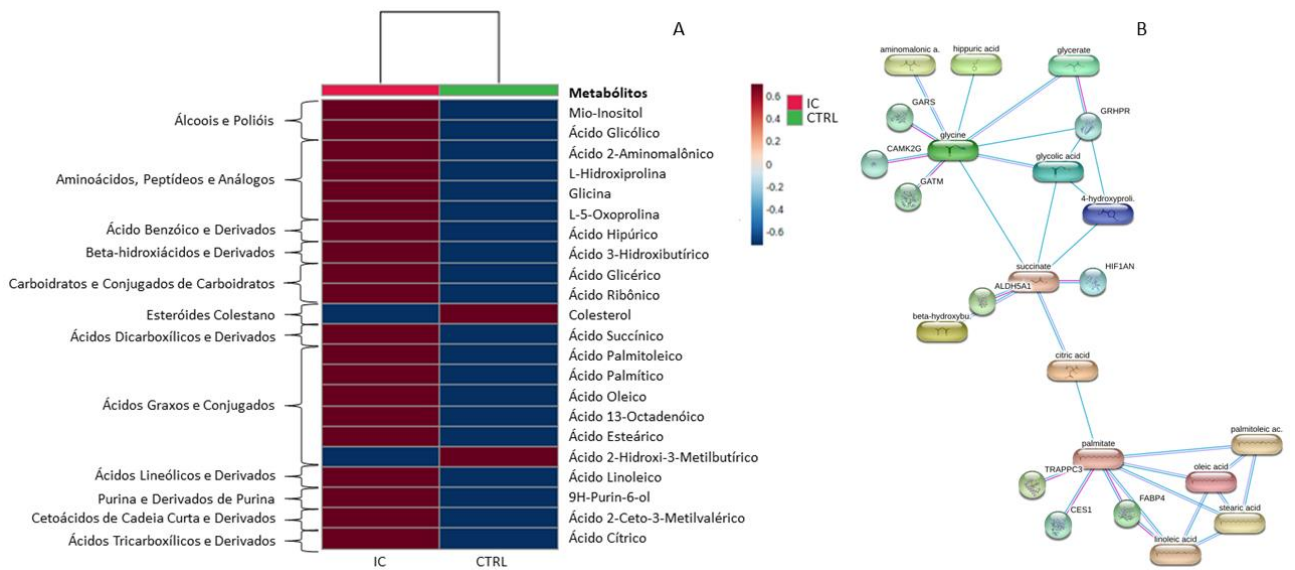


Figura 14: Rede metabólica associada à IC avançada de acordo com OPLS-DA (VIP score IC vs. CTRL). (A) Agrupamento em classes bioquímicas por mapa de calor dos metabólitos discriminantes entre as condições. A escala colorida à direita indica a intensidade relativa de cada metabólito em cada grupo. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. (B) Rede de interação dos metabólitos representativos para a caracterização da IC avançada. Os nós esféricos representam parceiros funcionais previstos e as cores das linhas indicam o tipo de evidência da interação, sendo azul para bancos de dados curados, rosa para determinados experimentalmente e roxo para homologia de proteínas. Fonte: ^A elaborada pela autora (2023) e ^B adaptado do software STITCH.

5.3. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA vs. CONTROLE

A fim de caracterizar os perfis proteômico e metabolômico especificamente na cardiomiopatia chagásica, tais pacientes foram comparados à condição não patológica.

5.3.1. Análise Proteômica

Dentre as 118 proteínas identificadas, 50 apresentavam-se em estado de regulação positivo em plasma de pacientes com CCC e 68 em regulação negativa se comparadas aos pacientes CTRL. A Figura 15A apresenta simultaneamente a contribuição de cada proteína para a caracterização dos cenários e a tendência de agrupamento das amostras resultante, revelando um desequilíbrio do perfil proteômico circulante na CCC. O poder estatístico obtido com a média de 10 replicatas é de aproximadamente 65% (Figura 15B).

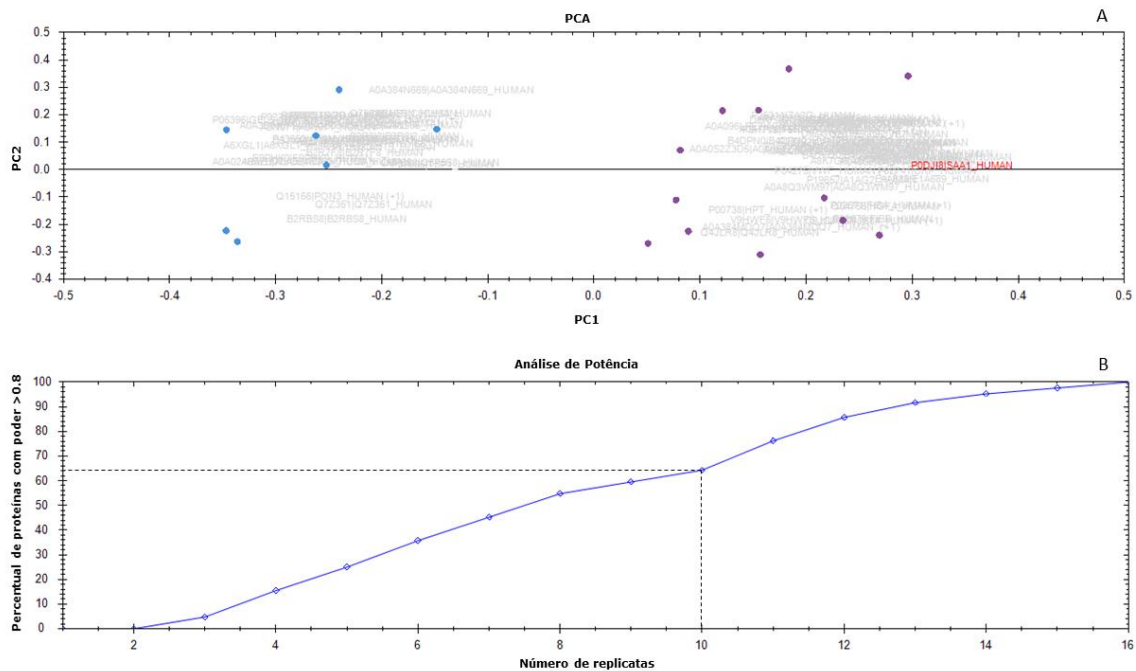


Figura 15: Perfil de proteínas reguladas diferencialmente em plasma de pacientes com CCC (CCC vs. CTRL).

(A) PCA *biplot*. As amostras de pacientes com CCC são representadas em azul e de pacientes CTRL em roxo. Em cinza, as proteínas são ordenadas de acordo com a representatividade para a caracterização dos cenários. (B) Potência estatística do conjunto de dados proteômicos. Fonte: adaptado do *software* Progenesis Q1.

As anotações funcionais por GO para processos biológicos e funções moleculares revelaram que as proteínas reguladas positivamente na CCC estão envolvidas de forma significativa no transporte reverso do colesterol (Figura 16A). Em conformidade, o enriquecimento em especial da rede de interação entre 3 proteínas implicadas na regulação da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) sugere o aumento da esterificação de colesterol na CCC (Figura 16B).

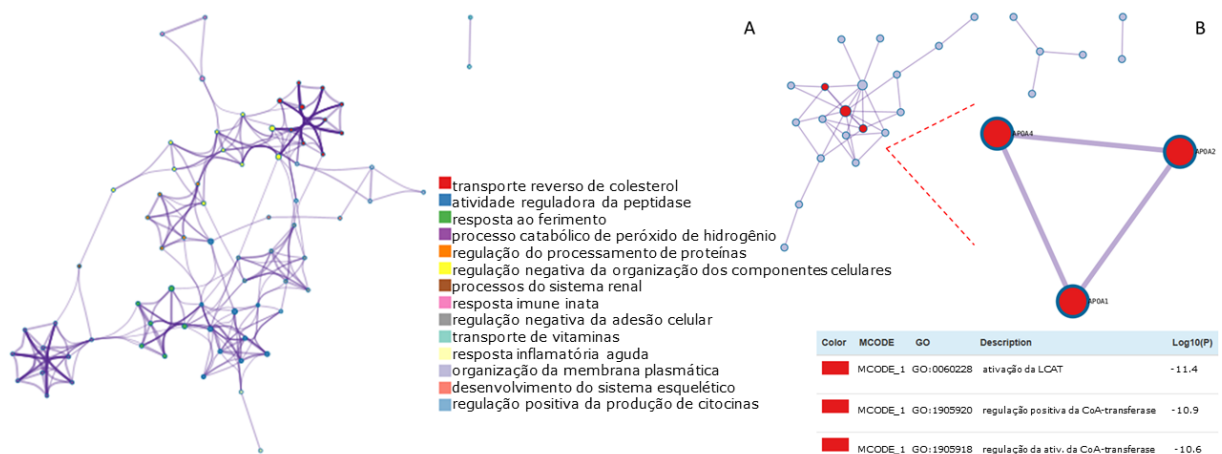


Figura 16: Anotações GO quanto ao processo biológico e função molecular das proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes com CCC (CCC vs. CTRL).

(A) Rede de termos enriquecidos. Os termos são apresentados em ordem decrescente de significância ($p \leq 0.01$).
 (B) Rede de interação proteína-proteína e componentes MCODE identificados.
 Fonte: adaptado do *software* Metascape.

Na análise univariada, foram elegidas 56 proteínas com significância estatística na discriminação dos cenários, das quais 40 demonstravam regulação positiva na CCC e 16 regulação negativa em comparação ao CTRL (Tabela 4).

Tabela 4. Proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CCC e pacientes CTRL

<i>Proteínas</i>	<i>p-Valor Post hoc</i>
<i>Reguladas Positivamente na CCC</i>	
<i>APOA1 (Epididymis secretory sperm binding protein)</i>	0.000107717
<i>Gc (Vitamin D binding protein - fragment)</i>	0.004833661
<i>LUM (Epididymis secretory sperm binding protein)</i>	0.000245076
<i>ADID (Adiponectin D)</i>	2.28252E-05
<i>BTD (Biotinidase - fragment)</i>	0.002346534
<i>A0A7H0TJC6 (Heparin cofactor II splice isoform)</i>	0.000176642
<i>A0A8Q3WL25 (Coagulation factor XII)</i>	0.000244144
<i>HBD (Delta globin)</i>	0.009641473
<i>CP (CP protein)</i>	7.06E-07
<i>A6XGL1 (Transferrin)</i>	3.99123E-05
<i>B2R7F8 (Plasminogen)</i>	8.558E-05
<i>B2R8I2 (cDNA, FLJ93914, highly similar to homo sapiens histidine-rich glycoprotein, mRNA)</i>	0.000201831
<i>B2RBS8 (cDNA, FLJ95666, highly similar to homo sapiens albumin, mRNA)</i>	0.002393156
<i>KLKB1 (cDNA, FLJ51250, highly similar to plasma kallikrein)</i>	0.003654625
<i>KNG1 (Kininogen 1, isoform CRA_b)</i>	0.018049266
<i>B7Z8Q5 (cDNA FLJ56762, highly similar to hyaluronan-binding protein 2)</i>	0.002005676
<i>TTN (Titin)</i>	0.028053475
<i>ECM1 (Truncated extracellular matrix protein 1)</i>	0.000124817
<i>D3JV41 (C-X-C motif chemokine - fragment)</i>	5.42459E-05
<i>CLEC3B (C-type lectin domain family 3 member B)</i>	3.8613E-05
<i>ATRN (Attractin)</i>	0.000414838
<i>SERPINC1 (Antithrombin-III)</i>	0.002902381
<i>A2M (Alpha-2-macroglobulin)</i>	0.043814401
<i>AHSG (Alpha-2-HS-glycoprotein)</i>	1.1202E-06
<i>HPX (Hemopexin)</i>	0.000249417
<i>APOD (Apolipoprotein D)</i>	3.94151E-06
<i>GSN (Gelsolin)</i>	1.91E-07
<i>APOA4 (Apolipoprotein A-IV)</i>	0.00012004
<i>THBS1 (Thrombospondin-1)</i>	0.003342304
<i>FBLN1 (Fibulin-1)</i>	8.68733E-05
<i>AFM (Afamin)</i>	0.000208394
<i>Q53H26 (Serotransferrin - fragment)</i>	0.007708136
<i>ITIH2 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2)</i>	0.004779655
<i>RBP4 (Retinol-binding protein)</i>	0.000135114
<i>Q6GMX0 (Ig-like domain-containing protein)</i>	0.01054921

<i>DKFZp686N02209 (Uncharacterized protein)</i>	0.003569263
<i>PGLYRP2 (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase)</i>	0.003182732
<i>APOA2 (Apolipoprotein A-II - fragment)</i>	5.03128E-05
<i>HEL-S-163pA (Epididymis secretory sperm binding protein Li 163pA)</i>	0.001225982
<i>HEL-S-11 (Carbonic anhydrase)</i>	0.004793102
Reguladas Negativamente na CCC	
<i>FCGBP (FC gamma binding protein)</i>	0.029728245
<i>A0A8Q3SID8 (Complement factor H)</i>	0.010044327
<i>B3KS79 (cDNA FLJ35730 FIS, clone TESTI2003131, highly similar to alpha-1-antichymotrypsin)</i>	0.018031977
<i>FGG (Fibrinogen gamma chain)</i>	0.019575825
<i>E1A689 (Mutant Apo B 100)</i>	0.000260125
<i>FGA (Fibrinogen alpha chain)</i>	0.003256331
<i>FGB (Fibrinogen beta chain)</i>	0.006062016
<i>CRP (C-reactive protein)</i>	3.2797E-05
<i>S100A8 (Protein S100-A8)</i>	0.001462729
<i>S100A9 (Protein S100-A9)</i>	0.000605193
<i>SAA1 (Serum amyloid A-1 protein)</i>	1.37E-09
<i>SAA2 (Serum amyloid A-2 protein)</i>	2.30E-07
<i>ORM2 (Alpha-1-acid glycoprotein 2)</i>	0.017983194
<i>HGFAC (Hepatocyte growth factor activator)</i>	0.014823338
<i>LBP (Lipopolysaccharide-binding protein)</i>	0.00633611
<i>SERPINA10 (Protein Z-dependent protease inhibitor)</i>	0.024458848

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Nota: (FDR) False Discovery Rate; (RSD) Relative Standard Deviation.

A escala de cor na Figura 17A ilustra a intensidade relativa das 56 proteínas, dispostas de acordo com a inter-relação presente e o agrupamento resultante das amostras. A rede de correlação entre essas proteínas indica, na maioria das interações, um grau de correlação positivo e direto entre as abundâncias observadas (Figura 17B). Não foi possível identificar covariâncias significativas para 2 das proteínas (ORM2 e TTN).

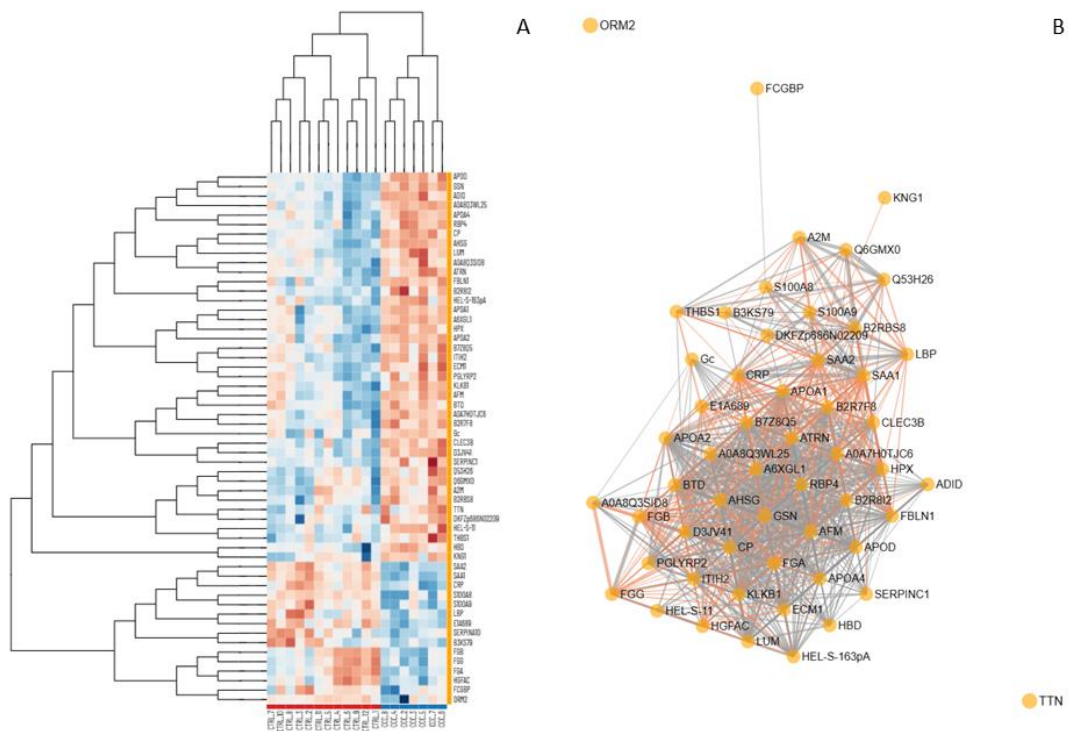


Figura 17: Inter-relação das proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CCC e pacientes CTRL.

(A) Agrupamento hierárquico por mapa de calor. Os arranjos expressam a relação entre as proteínas ou amostras. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. (B) Rede de correlação ($r \geq 0.6$). Linhas mais espessas representam correlações mais fortes, sendo cinza para correlações positivas e laranja para correlações negativas. Fonte: adaptado do software Viime.

A Figura 18 resume o estado de regulação e graus de significância e magnitude das proteínas identificadas. No total, 53 proteínas foram qualificadas conforme os filtros aplicados.

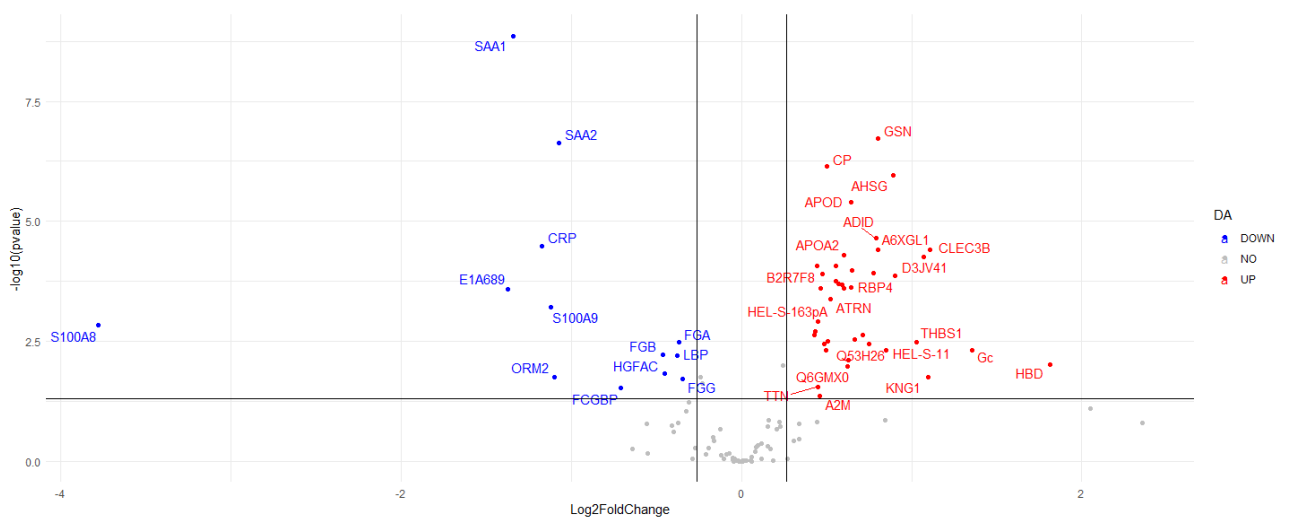


Figura 18: Volcano plot das proteínas discriminantes entre pacientes com CCC e pacientes CTRL.

A linha horizontal determina o limiar de significância ($p \leq 0.05$) e as linhas verticais os limiares negativo e positivo de magnitude (fold change $\geq \pm 1.2$). Cada ponto no gráfico representa uma proteína, onde aquelas cuja abundância está reduzida em relação ao grupo CTRL estão localizadas à esquerda e aquelas cuja abundância está elevada são

ilustradas à direita. Proteínas estatisticamente significantes com variações de pelo menos 20% são representadas em azul e vermelho. Fonte: adaptado do software Viime.

5.3.2. Análise Metabolômica

A estatística univariada demonstrou que 12 metabólitos se mantiveram no intervalo de erro padrão e por isso foram considerados estatisticamente significantes, sendo variações positivas indicativas de maior intensidade em pacientes com CCC e variações negativas de menor intensidade (Tabela 5).

Tabela 5. Metabólitos estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CCC e pacientes CTRL.

<i>Compostos</i>	<i>p-Valor Post hoc</i>	<i>QC (RSD%)</i>	<i>Varição (%)</i>
<i>Ácido Glicérico</i>	0,002	18,3	186,1
<i>Ácido Linoleico</i>	0,005	5,4	182,3
<i>Ácido 3-Hidroxibutírico</i>	0,002	16,2	597,3
<i>Ácido Oleico</i>	0,005	5,5	185,0
<i>L-5-Oxoprolina</i>	0,010	17,8	73,7
<i>Ácido 2-Ceto-3-Metilvalérico</i>	0,023	10,3	83,6
<i>Mio-Inositol</i>	0,005	18,5	90,9
<i>Ácido Palmítico</i>	0,015	4,5	200,0
<i>Ácido 13-Octadecenóico</i>	0,016	5,7	118,6
<i>Ácido Palmitoleico</i>	0,014	5,2	186,5
<i>Unknown 11</i>	0,019	15,8	-74,3
<i>Ácido Hipúrico</i>	0,029	11,0	749,9

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Nota: (RSD) Relative Standard Deviation.

O modelo multivariado OPLS-DA revelou uma discriminação metabólica robusta entre os cenários, com validade preditiva (Q^2) de 0,8 (Figura 19A e 19B, respectivamente) e 18 metabólitos determinantes (VIP score ≥ 1.0) para a caracterização da CCC (Figura 20).

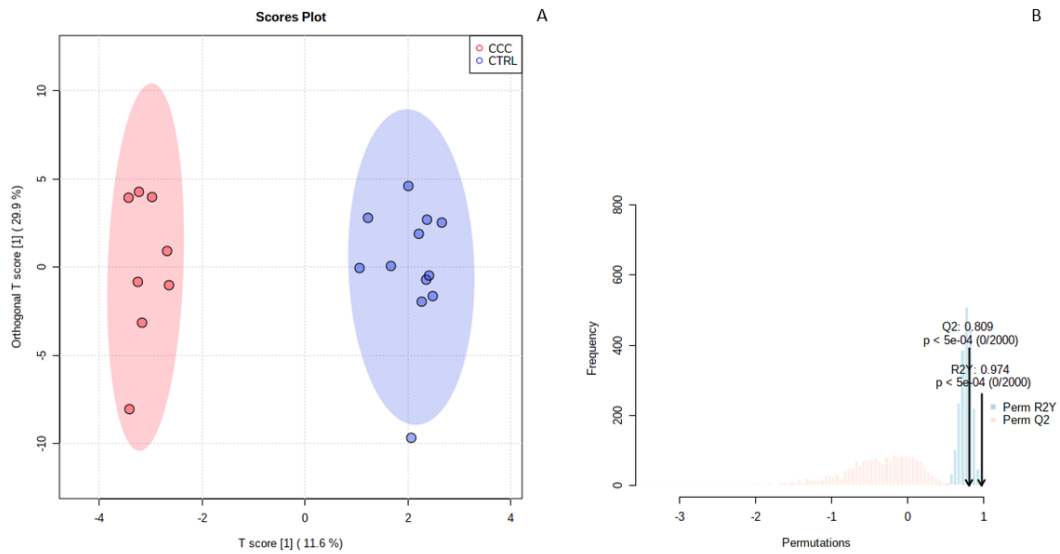


Figura 19: OPLS-DA de pacientes com CCC e pacientes CTRL.
 (A) *Scores plot*. A porcentagem de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção plotada e as regiões elípticas correspondem ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada ponto no gráfico corresponde a uma amostra de paciente. (B) Validação do modelo. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

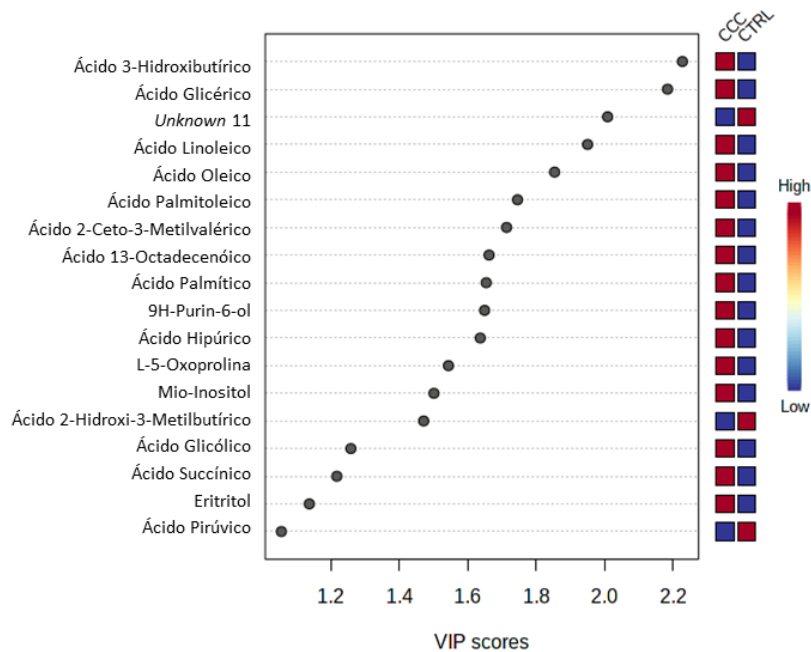


Figura 20: Metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com CCC e pacientes CTRL por OPLS-DA.
 Os metabólitos estão organizados em ordem de representatividade (VIP scores) e as caixas coloridas à direita indicam suas intensidades relativas em cada grupo fenotípico. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

5.4. CARDIOMIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA vs. CONTROLE

Os perfis proteômico e metabolômico da cardiomiopatia idiopática também foram caracterizados mediante a comparação com a condição não patológica.

5.4.1. Análise Proteômica

Dentre as 118 proteínas identificadas, 50 apresentavam-se em estado de regulação positivo em plasma de pacientes com CDI e 68 em regulação negativa se comparadas aos pacientes CTRL. A Figura 21A apresenta de forma simultânea a contribuição de cada proteína para a caracterização dos cenários e o agrupamento natural das amostras resultante, demonstrando uma alteração do perfil de proteínas em plasma de pacientes com CDI. O poder estatístico obtido com a média de 10 replicatas é de aproximadamente 70% (Figura 21B).

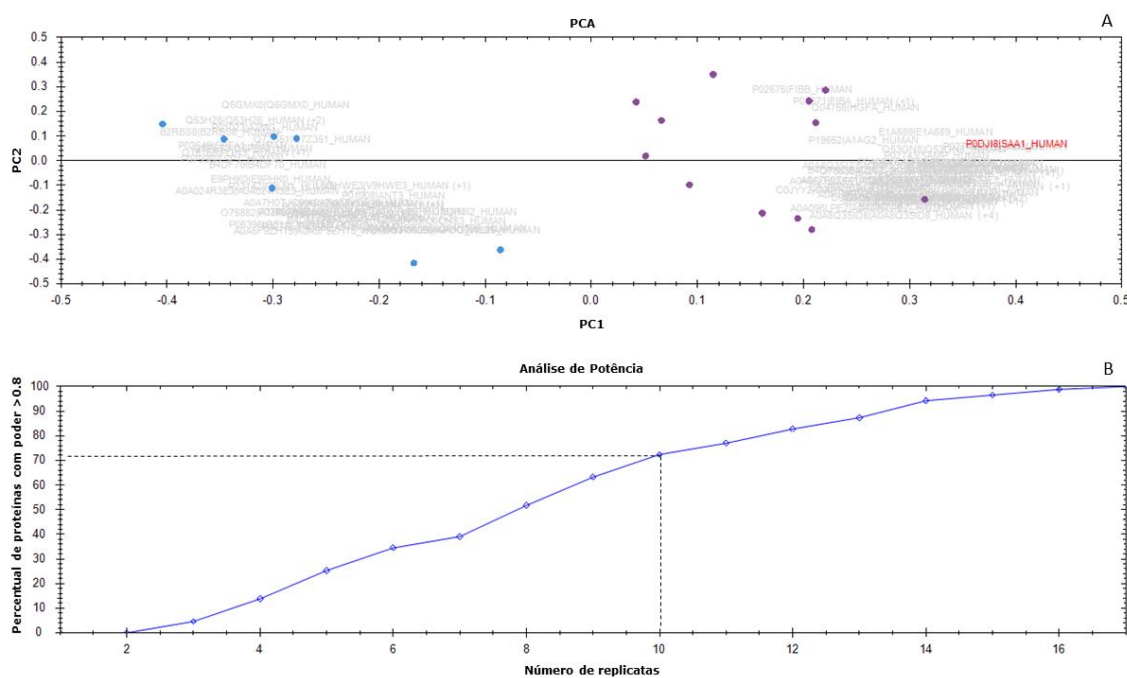


Figura 21: Perfil de proteínas reguladas diferencialmente em plasma de pacientes com CDI (CDI vs. CTRL). (A) PCA *biplot*. As amostras de pacientes com CDI são representadas em azul e de pacientes CTRL em roxo. Em cinza, as proteínas são ordenadas de acordo com a representatividade para a caracterização dos cenários. (B) Potência estatística do conjunto de dados proteômicos. Fonte: adaptado do *software* Progenesis QI.

As anotações em termos GO para processos biológicos e funções moleculares indicaram que as proteínas reguladas positivamente na CDI atuam de maneira significativa no catabolismo do peróxido de hidrogênio (Figura 22A). As redes de interação proteína-proteína com maior enriquecimento de termos sugerem elevada atividade de dois complexos moleculares associados ao papel das hemoglobinas via transporte de óxido nítrico e ligação à haptoglobina,

e ao transporte de substâncias orgânicas como lipídeos e compostos hidroxila na CDI (Figura 22B).

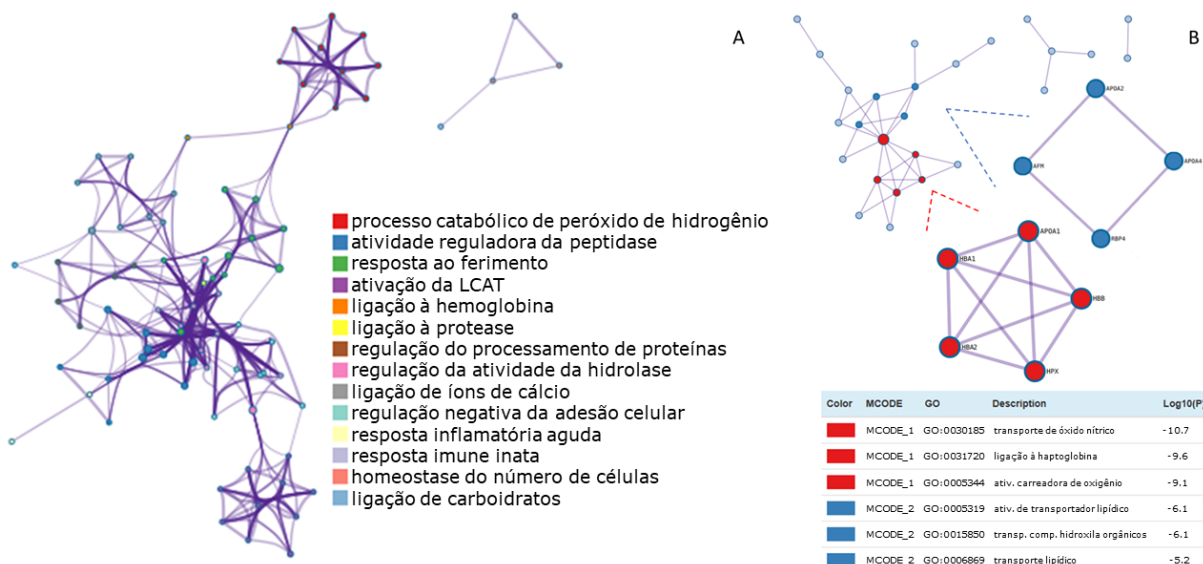


Figura 22: Anotações GO quanto ao processo biológico e função molecular das proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes com CDI (CDI vs. CTRL).

(A) Rede de termos enriquecidos. Os termos são apresentados em ordem decrescente de significância ($p \leq 0.01$). (B) Rede de interação proteína-proteína e componentes MCODE identificados. Fonte: adaptado do *software* Metascape.

Das 118 proteínas identificadas, 59 foram consideradas estatisticamente significantes para sob análise univariada, sendo 41 reguladas positivamente na CDI e 18 reguladas negativamente em comparação ao CTRL (Tabela 6).

Tabela 6. Proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CDI e pacientes CTRL

Proteínas	p-Valor Post hoc
Reguladas Positivamente na CDI	
<i>APOA1 (Epididymis secretory sperm binding protein)</i>	0.000541825
<i>LUM (Epididymis secretory sperm binding protein)</i>	0.002570312
<i>BTD (Biotinidase - fragment)</i>	0.000279135
<i>A0A7H0TJC6 (Heparin cofactor II splice isoform)</i>	0.000723479
<i>A0A8Q3WKT7 (Complement C8 alpha chain)</i>	0.016616428
<i>A0A8Q3WL25 (Coagulation factor XII)</i>	0.00177592
<i>HBD (Delta globin)</i>	0.010667324
<i>CP (CP protein)</i>	1.68664E-05
<i>A6XGL1 (Transferrin)</i>	0.004614253
<i>B2R7F8 (Plasminogen)</i>	0.005135734
<i>B2R8I2 (cDNA, FLJ93914, highly similar to homo sapiens histidine-rich glycoprotein, mRNA)</i>	0.004876069
<i>B2RBS8 (cDNA, FLJ95666, highly similar to homo sapiens albumin, mRNA)</i>	0.000293938
<i>B4DF70 (cDNA FLJ60461, highly similar to peroxiredoxin-2)</i>	0.039305377
<i>KLKB1 (cDNA, FLJ51250, highly similar to plasma kallikrein)</i>	0.002000108

<i>KNG1 (Kininogen 1, isoform CRA_b)</i>	0.041953895
<i>B7Z8Q5 (cDNA, FLJ56762, highly similar to hyaluronan-binding protein 2)</i>	0.009868176
<i>ECM1 (Truncated extracellular matrix protein 1)</i>	0.001026801
<i>D3JV41 (C-X-C motif chemokine - fragment)</i>	7.2356E-05
<i>CLEC3B (C-type lectin domain family 3 member B)</i>	0.002305265
<i>ATRN (Attractin)</i>	0.000454929
<i>SERPINC1 (Antithrombin-III)</i>	0.021251968
<i>A2M (Alpha-2-macroglobulin)</i>	0.000381839
<i>SPTA1 (Spectrin alpha chain, erythrocytic 1)</i>	0.015545137
<i>SLC4A1 (Band 3 anion transport protein)</i>	0.030453922
<i>AHSG (Alpha-2-HS-glycoprotein)</i>	7.17474E-06
<i>HPX (Hemopexin)</i>	8.94781E-05
<i>APOD (Apolipoprotein D)</i>	0.001711371
<i>GSN (Gelsolin)</i>	2.76357E-05
<i>APOA4 (Apolipoprotein A-IV)</i>	0.005805193
<i>THBS1 (Thrombospondin-1)</i>	7.30E-07
<i>FBLN1 (Fibulin-1)</i>	7.57792E-06
<i>AFM (Afamin)</i>	0.001039918
<i>PON3 (Serum paraoxonase/lactonase 3)</i>	0.019375167
<i>Q53H26 (Serotransferrin - fragment)</i>	0.00078827
<i>Q6GMX0 (Ig-like domain-containing protein)</i>	0.004006601
<i>IGK@ (IGK@ protein)</i>	0.002949458
<i>DKFZp686N02209 (Uncharacterized protein)</i>	0.005835453
<i>PGLYRP2 (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase)</i>	0.000771911
<i>APOA2 (Apolipoprotein A-II - fragment)</i>	0.000522335
<i>HEL-S-163pA (Epididymis secretory sperm binding protein Li 163pA)</i>	0.012026169
<i>HEL-S-11 (Carbonic anhydrase)</i>	0.004821112
Reguladas Negativamente na CDI	
<i>C1QB (Complement C1Q B chain - fragment)</i>	0.014518154
<i>A0A8Q3SI37 (Complement C9)</i>	0.026811653
<i>B3KS79 (cDNA, FLJ35730 FIS, clone TESTI2003131, highly similar to alpha-1-antichymotrypsin)</i>	0.000178156
<i>B4E1I8 (cDNA, FLJ54228, highly similar to leucine-rich alpha-2-glycoprotein)</i>	0.006298089
<i>E1A689 (Mutant Apo B 100)</i>	4.94733E-05
<i>ITIH3 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3)</i>	0.007363773
<i>TNC (Tenascin C)</i>	0.001285252
<i>CRP (C-reactive protein)</i>	8.51963E-06
<i>APCS (Serum amyloid P-component)</i>	0.020296072
<i>S100A8 (Protein S100-A8)</i>	0.001915953
<i>S100A9 (Protein S100-A9)</i>	0.001100384
<i>C1S (Complement C1S subcomponent)</i>	0.017043818
<i>SAA1 (Serum amyloid A-1 protein)</i>	1.27E-10
<i>SAA2 (Serum amyloid A-2 protein)</i>	5.18E-09
<i>DEFA1B; DEFA1 (Neutrophil defensin 1)</i>	0.00413196
<i>HGFAC (Hepatocyte growth factor activator)</i>	0.049747297
<i>SERPING1 (Serine/cysteine proteinase inhibitor clade G member 1 splice variant 2 - fragment)</i>	0.030665214
<i>LBP (Lipopolysaccharide-binding protein)</i>	0.001347056

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Nota: (FDR) False Discovery Rate; (RSD) Relative Standard Deviation.

A intensidade relativa e a inter-relação das 59 proteínas, assim como o agrupamento resultante das amostras, são ilustrados por meio de uma escala de cor na Figura 23A. O grau de correlação entre as mesmas, detalhado no diagrama interativo ao lado (Figura 23B), demonstra que a maioria das proteínas exprimem uma correlação positiva e direta entre as abundâncias detectadas. Não foi possível identificar covariâncias significativas para 1 das proteínas (B4DF70).

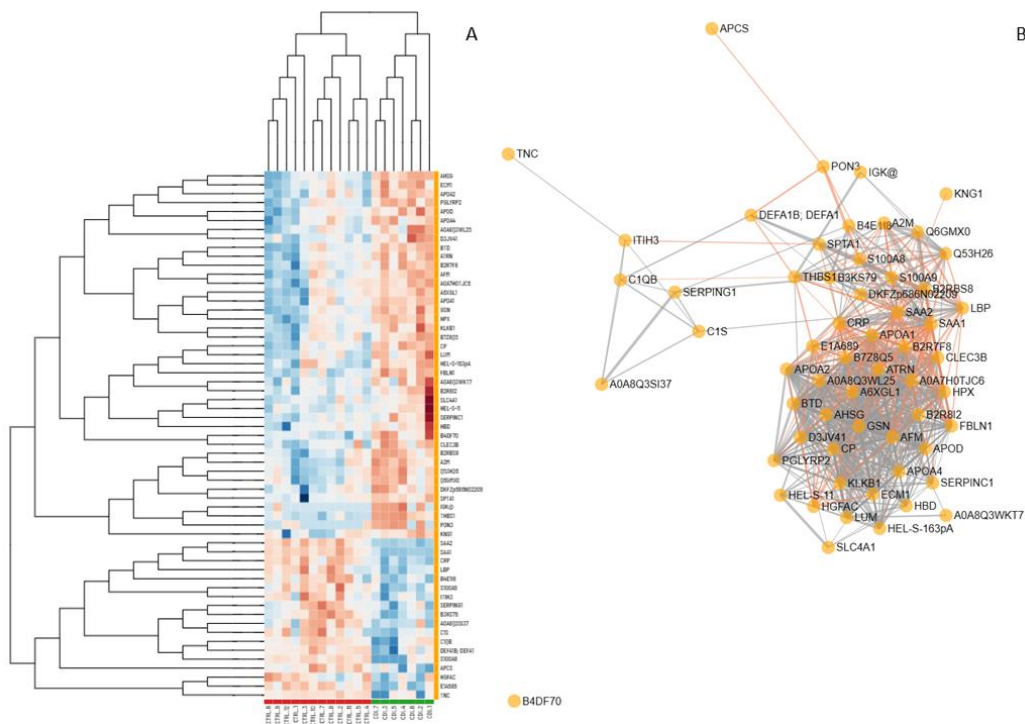


Figura 23: Inter-relação das proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CDI e pacientes CTRL.

(A) Agrupamento hierárquico por mapa de calor. Os arranjos expressam a relação entre as proteínas ou amostras. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. (B) Rede de correlação ($r \geq 0.6$). Linhas mais espessas representam correlações mais fortes, sendo cinza para correlações positivas e laranja para correlações negativas. Fonte: adaptado do software Viime.

As proteínas identificadas foram ainda triadas de acordo com o estado de regulação, significância e magnitude (Figura 24). Ao todo, 55 proteínas foram qualificadas.

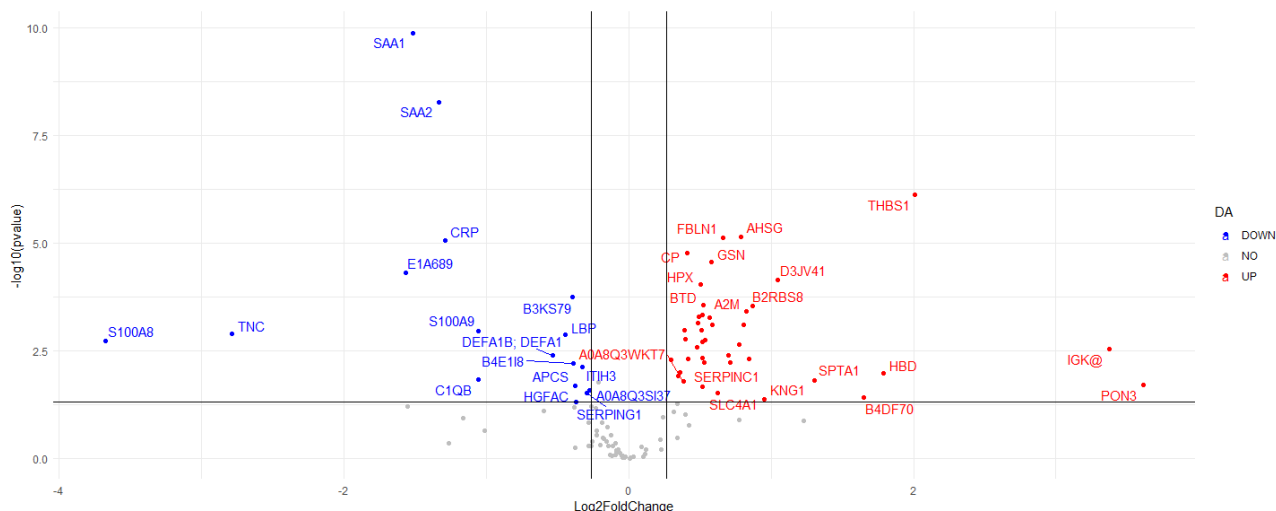


Figura 24: Volcano plot das proteínas discriminantes entre pacientes com CDI e pacientes CTRL.

A linha horizontal determina o limiar de significância ($p \leq 0.05$) e as linhas verticais os limiares negativo e positivo de magnitude (fold change $\geq \pm 1.2$). Cada ponto no gráfico representa uma proteína, onde aquelas cuja abundância está reduzida em relação ao grupo CTRL estão localizadas à esquerda e aquelas cuja abundância está elevada são ilustradas à direita. Proteínas estatisticamente significativas com variações de pelo menos 20% são representadas em azul e vermelho. Fonte: adaptado do software Viime.

5.4.2. Análise Metabolômica

Nove (9) metabólitos foram considerados estatisticamente significantes na análise univariada, sendo variações positivas indicativas de maior intensidade em plasma de pacientes com CDI e variações negativas de menor intensidade (Tabela 7).

Tabela 7. Metabólitos estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CDI e pacientes CTRL.

<i>Compostos</i>	<i>p-Valor Post hoc</i>	<i>QC (RSD%)</i>	<i>Variação (%)</i>
Ácido Glicérico	0,003	18,3	-59,2
Ácido Linoleico	0,008	5,4	-62,2
Ácido Oleico	0,035	5,5	-49,9
Colesterol	0,006	9,6	76,3
L-5-Oxoprolina	0,025	17,8	-44,0
Ácido 2-Ceto-3-Metilvalérico	0,017	10,3	-48,9
Ácido Glicólico	0,008	19,8	-50,0
L-Hidroxiprolina	0,020	15,4	-66,2
Glicina	0,049	16,9	-59,4

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Nota: (RSD) Relative Standard Deviation.

Na estatística multivariada, a discriminação por OPLS-DA demonstrou uma dissociação entre os cenários, com validade preditiva (Q^2) de 0,65 (Figura 25A e 25B, respectivamente) e 25 metabólitos representativos (VIP score ≥ 1.0) de maior intensidade na CDI (Figura 26).

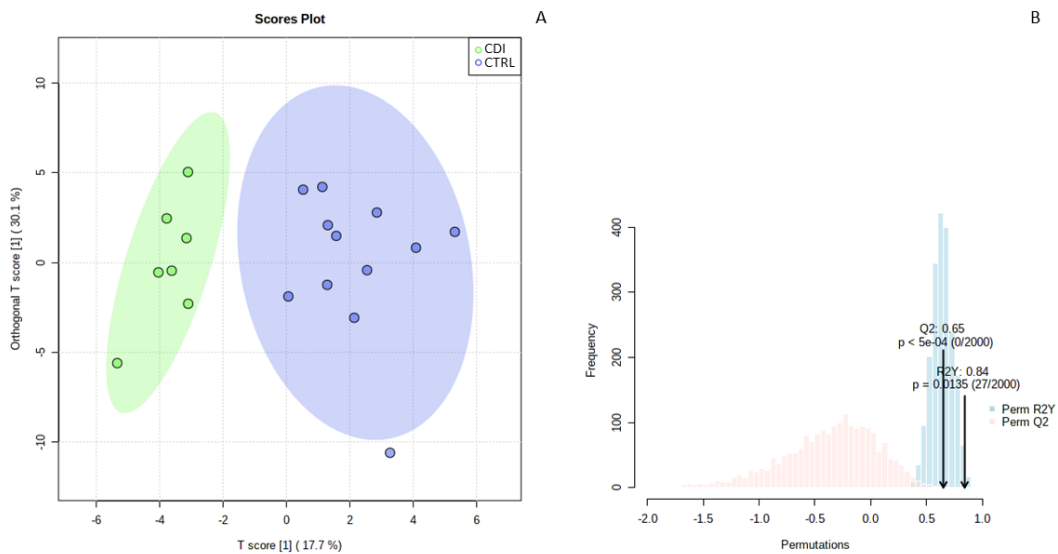


Figura 25: OPLS-DA de pacientes com CDI e pacientes CTRL.

(A) *Scores plot*. A porcentagem de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção plotada e as regiões elípticas correspondem ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada ponto no gráfico corresponde a uma amostra de paciente. (B) Validação do modelo. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

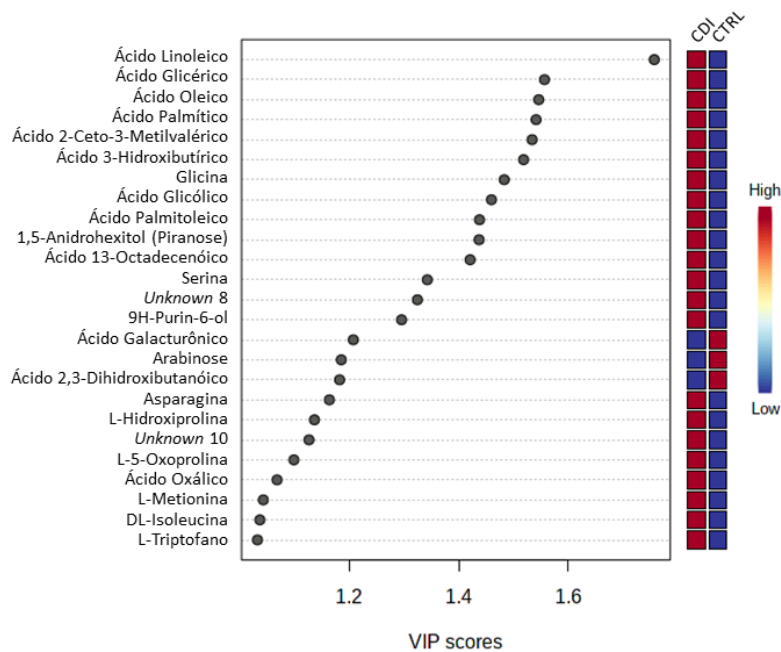


Figura 26: Metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com CDI e pacientes CTRL por OPLS-DA.

Os metabólitos estão organizados em ordem de representatividade (VIP scores) e as caixas coloridas à direita indicam suas intensidades relativas em cada grupo fenotípico. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

5.5. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA vs. CARDIOMIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA vs. CONTROLE

Com o intuito de verificar se a discriminação etiológica influencia as assinaturas proteômica e metabolômica da IC avançada, as três condições CCC, CDI e CTRL foram comparadas.

5.5.1. Análise Proteômica

Na avaliação por PCA, a contribuição de cada proteína para a caracterização das amostras resultou em uma tendência de agrupamento discriminativa entre os cenários patológicos e não patológico, porém discreta entre as etiologias da IC avançada (Figura 27A). Para esta comparação, o poder estatístico obtido com a média de 9 replicatas por condição é equivalente a cerca de 65% (Figura 27B).

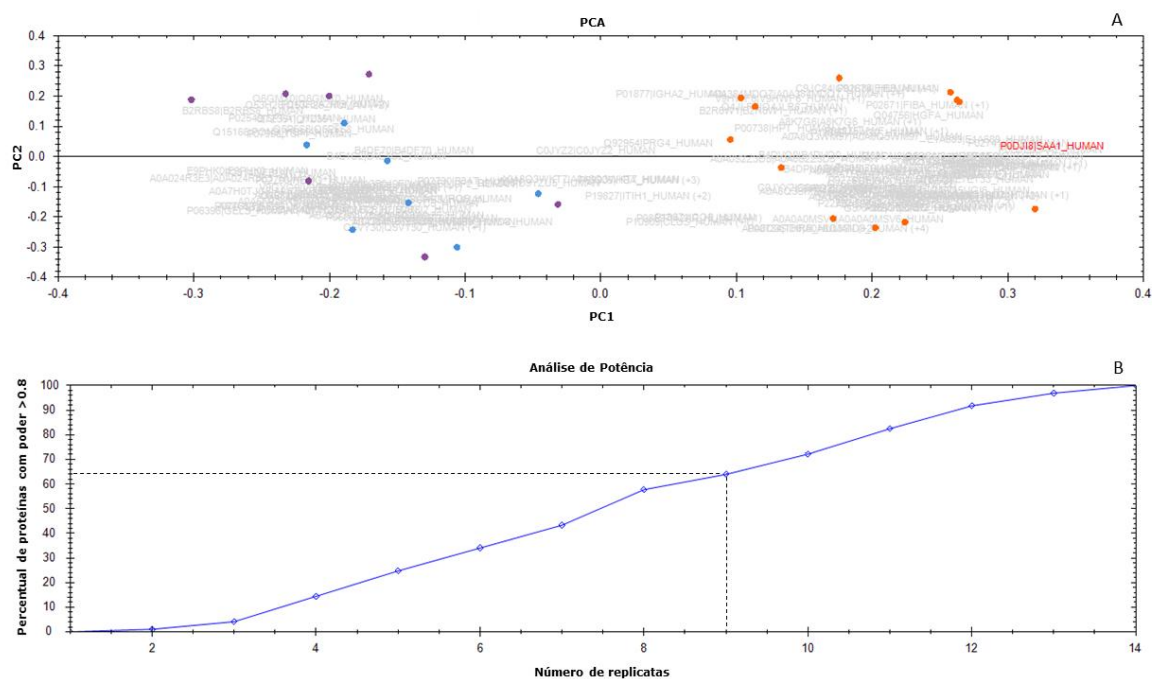


Figura 27: Perfil de proteínas reguladas diferencialmente em plasma de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL (CCC vs. CDI vs. CTRL).

(A) PCA *biplot*. As amostras de pacientes com CCC são representadas em azul, de pacientes com CDI em roxo e de pacientes CTRL em laranja. Em cinza, as proteínas são ordenadas de acordo com a representatividade para a caracterização dos cenários. (B) Potência estatística do conjunto de dados proteômicos. Fonte: adaptado do *software* Progenesis QI.

Dentre as 118 proteínas identificadas, 73 foram consideradas estatisticamente significantes (Tabela 8).

Tabela 8. Proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL

Proteínas	p-Valor
<i>APOA1 (Epididymis secretory sperm binding protein)</i>	3.27639E-05
<i>FCGBP (FC gamma binding protein)</i>	0.038152509
<i>C1QB (Complement C1Q B chain - fragment)</i>	0.010041881
<i>Gc (Vitamin D binding protein - fragment)</i>	0.005614725
<i>LUM (Epididymis secretory sperm binding protein)</i>	0.000119532
<i>ADID (Adiponectin D)</i>	3.66152E-05
<i>BTB (Biotinidase - fragment)</i>	0.00012584
<i>A0A7H0TJC6 (Heparin cofactor II splice isoform)</i>	5.23834E-05
<i>A0A8Q3SI37 (Complement C9)</i>	0.024175071
<i>A0A8Q3SID8 (Complement factor H)</i>	0.009323393
<i>A0A8Q3WKT7 (Complement C8 alpha chain)</i>	0.018098048
<i>A0A8Q3WL25 (Coagulation factor XII)</i>	0.000100712
<i>HBD (Delta globin)</i>	0.002944936
<i>CP (CP protein)</i>	2.32E-07
<i>A6XGL1 (Transthyretin)</i>	3.67654E-05
<i>B2R7F8 (Plasminogen)</i>	7.05294E-05
<i>B2R8I2 (cDNA, FLJ93914, highly similar to homo sapiens histidine-rich glycoprotein, mRNA)</i>	0.0001353
<i>B2RBS8 (cDNA, FLJ95666, highly similar to homo sapiens albumin, mRNA)</i>	0.000131693
<i>B3KS79 (cDNA FLJ35730 FIS, clone TESTI2003131, highly similar to alpha-1-antichymotrypsin)</i>	0.000190767
<i>B4DF70 (cDNA FLJ60461, highly similar to peroxiredoxin-2)</i>	0.040754257
<i>KLKB1 (cDNA FLJ51250, highly similar to plasma kallikrein)</i>	0.000591434
<i>KNG1 (Kininogen 1, isoform CRA_b)</i>	0.009734811
<i>B4E1I8 (cDNA FLJ54228, highly similar to leucine-rich alpha-2-glycoprotein)</i>	0.008580068
<i>B7Z8Q5 (cDNA FLJ56762, highly similar to hyaluronan-binding protein 2)</i>	0.000997251
<i>TTN (Titin)</i>	0.034225738
<i>ECM1 (Truncated extracellular matrix protein 1)</i>	4.90401E-05
<i>FGG (Fibrinogen gamma chain)</i>	0.024507329
<i>D3JV41 (C-X-C motif chemokine - fragment)</i>	7.47185E-06
<i>E1A689 (Mutant Apo B 100)</i>	1.37243E-05
<i>ITIH3 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3)</i>	0.005530196
<i>CLEC3B (C-type lectin domain family 3 member B)</i>	2.85518E-05
<i>TNC (Tenascin C)</i>	0.001289629
<i>CFI (Complement factor I)</i>	0.044994016
<i>ATRNL1 (Attractin)</i>	6.93982E-05
<i>SERPINC1 (Antithrombin-III)</i>	0.001871205
<i>A2M (Alpha-2-macroglobulin)</i>	0.000465139
<i>SPTA1 (Spectrin alpha chain, erythrocytic 1)</i>	0.015414383
<i>FGA (Fibrinogen alpha chain)</i>	0.003261776
<i>FGB (Fibrinogen beta chain)</i>	0.007879279
<i>SLC4A1 (Band 3 anion transport protein)</i>	0.026943976
<i>CRP (C-reactive protein)</i>	1.61305E-06
<i>APCS (Serum amyloid p-component)</i>	0.012783148
<i>AMBIP (Protein AMBP)</i>	0.015643684
<i>AHSG (Alpha-2-HS-glycoprotein)</i>	2.17E-07
<i>HPX (Hemopexin)</i>	1.96588E-05

<i>APOD (Apolipoprotein D)</i>	4.07429E-06
<i>S100A8 (Protein S100-A8)</i>	0.000337617
<i>GSN (Gelsolin)</i>	1.08E-07
<i>S100A9 (Protein S100-A9)</i>	0.000143503
<i>APOA4 (Apolipoprotein A-IV)</i>	9.62983E-05
<i>THBS1 (Thrombospondin-1)</i>	1.06177E-06
<i>C1S (Complement C1S subcomponent)</i>	0.019083562
<i>SAA1 (Serum amyloid A-1 protein)</i>	1.65E-11
<i>SAA2 (Serum amyloid A-2 protein)</i>	1.47E-09
<i>ORM2 (Alpha-1-acid glycoprotein 2)</i>	0.023706831
<i>FBLN1 (Fibulin-1)</i>	2.361E-06
<i>AFM (Afamin)</i>	6.99644E-05
<i>DEFA1B; DEFA1 (Neutrophil defensin 1)</i>	0.004415262
<i>HGFAC (Hepatocyte growth factor activator)</i>	0.009267932
<i>PON3 (Serum paraoxonase/lactonase 3)</i>	0.019128542
<i>Q53H26 (Serotransferrin - fragment)</i>	0.000454069
<i>ITIH2 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2)</i>	0.004810289
<i>SERPING1 (Serine/cysteine proteinase inhibitor clade G member 1 splice variant 2 - fragment)</i>	0.027120257
<i>RBP4 (Retinol-binding protein)</i>	0.000206929
<i>Q6GMX0 (Ig-like domain-containing protein)</i>	0.001661295
<i>IGK@ (IGK@ protein)</i>	0.00318799
<i>DKFZp686N02209 (Uncharacterized protein)</i>	0.001111438
<i>LBP (Lipopolysaccharide-binding protein)</i>	0.000607293
<i>PGLYRP2 (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase)</i>	0.000294277
<i>SERPINA10 (Protein Z-dependent protease inhibitor)</i>	0.02861954
<i>APOA2 (Apolipoprotein A-II - fragment)</i>	1.92168E-05
<i>HEL-S-163pA (Epididymis secretory sperm binding protein Li 163pA)</i>	0.000765498
<i>HEL-S-11 (Carbonic anhydrase)</i>	0.00119288

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Nota: (FDR) False Discovery Rate; (RSD) Relative Standard Deviation.

A escala de cor na Figura 28 ilustra a intensidade relativa das 73 proteínas, dispostas de acordo com a inter-relação presente e o agrupamento resultante das amostras.

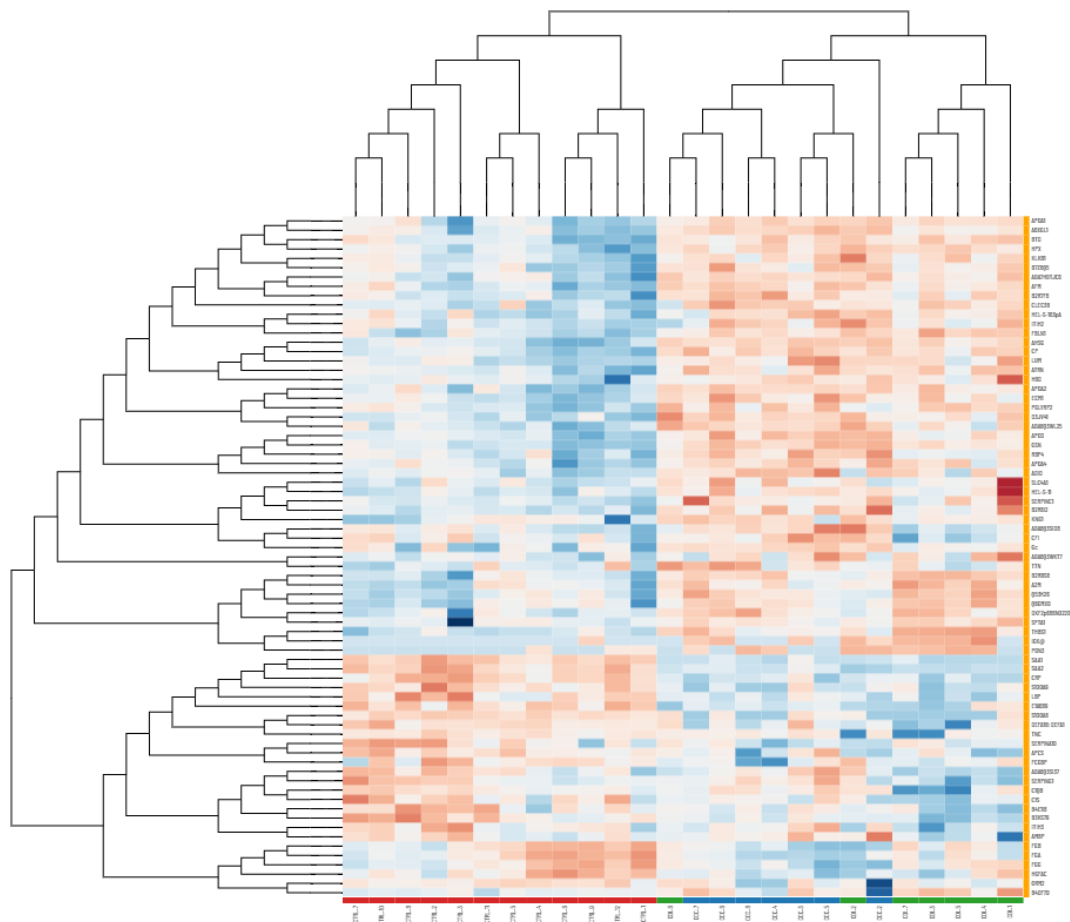


Figura 28: Agrupamento hierárquico por mapa de calor das proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL. Os arranjos expressam a relação entre as proteínas ou amostras. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. Fonte: adaptado do software Viime.

5.5.2. Análise Metabolômica

Na análise univariada, 16 metabólitos foram considerados significantes (Tabela 9).

Tabela 9. Metabólitos estatisticamente significantes na discriminação de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL.

<i>Compostos</i>	<i>p-Valor</i>	<i>QC (RSD%)</i>
<i>Ácido Glicérico</i>	0,0003	18,3
<i>Ácido Linoleico</i>	0,0015	5,4
<i>Ácido 3-Hidroxibutírico</i>	0,0025	16,2
<i>Ácido Oleico</i>	0,0035	5,5
<i>Colesterol</i>	0,0044	9,6
<i>L-5-Oxoprolina</i>	0,0046	17,8
<i>Ácido 2-Ceto-3-Metilvalérico</i>	0,0062	10,3
<i>Mio-Inositol</i>	0,0071	18,5
<i>Ácido Glicólico</i>	0,0095	19,8
<i>Ácido Palmítico</i>	0,0103	4,5
<i>Ácido 13-Octadecenóico</i>	0,0116	5,7

Ácido Palmítico	0,0141	5,2
Unknown 11	0,0175	15,8
L-Hidroxi prolina	0,0248	15,4
Ácido Hipúrico	0,0302	11,0
Glicina	0,0550	16,9

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Nota: (RSD) Relative Standard Deviation.

O modelo multivariado PLS-DA identificou perfis distintos para cada condição, com maior distância entre os grupos CCC e CTRL (Figura 29A). O modelo obteve validade preditiva (Q^2) de 0,8 e $P = 0.02$ em 2000 permutações (Figuras 29B e 29C, respectivamente).

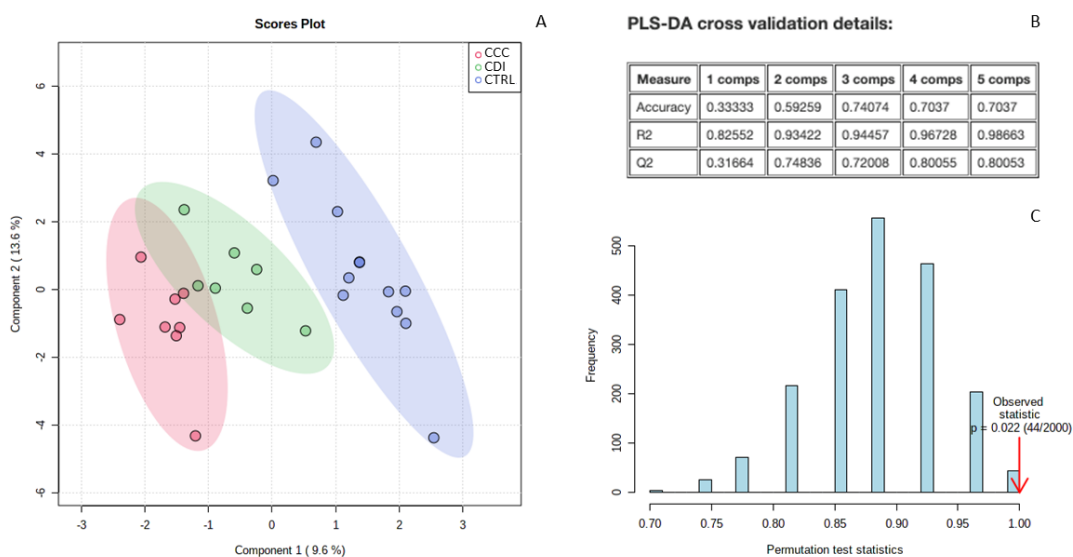


Figura 29: PLS-DA de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL.

(A) *Scores plot*. A porcentagem de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção plotada e as regiões elípticas correspondem ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada ponto no gráfico corresponde a uma amostra de paciente. (B) Detalhes da validação cruzada. (C) Permutação. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

Variações na intensidade relativa de 20 metabólitos (VIP score $\geq 1,0$) foram cruciais para a caracterização dos cenários (Figura 30).

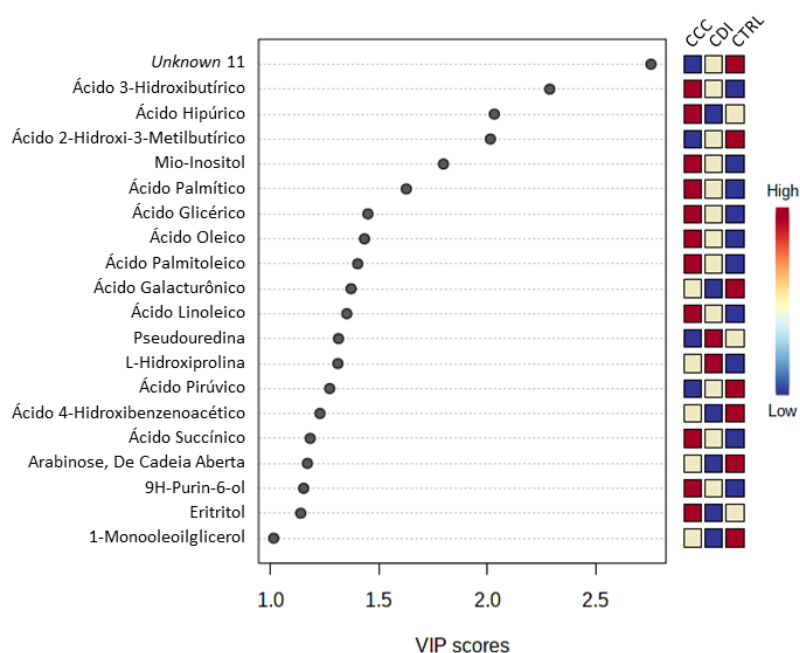


Figura 30: Metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes portadores de CCC e CDI, e pacientes CTRL por PLS-DA.

Os metabólitos estão organizados em ordem de representatividade (VIP scores) e as caixas coloridas à direita indicam suas intensidades relativas em cada grupo fenotípico. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

5.6. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA vs. CARDIOMIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA

Finalmente, CCC e CDI foram confrontadas diretamente para investigar um potencial paralelo entre os panoramas proteômico e metabolômico e a severidade da cardiomiopatia em pacientes chagásicos.

5.6.1. Análise Proteômica

Dentre as 118 proteínas identificadas, 56 apresentavam-se em estado de regulação positivo em plasma de pacientes com CCC e 62 em regulação negativa se comparadas aos pacientes com CDI. A Figura 31A apresenta simultaneamente a contribuição de cada proteína para a caracterização dos cenários e a tendência de agrupamento das amostras resultante, revelando uma sutil discrepância do perfil proteômico circulante na CMDNI chagásica. O poder estatístico obtido com a média de 7 replicatas é de cerca de 10% (Figura 31B).

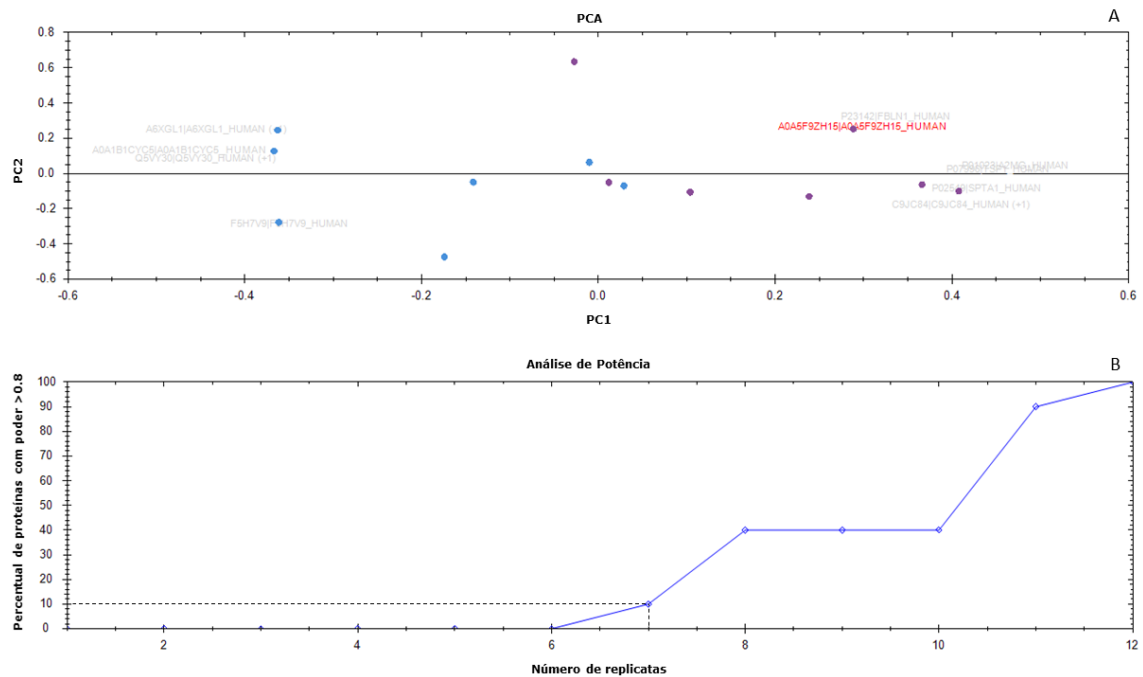


Figura 31: Perfil de proteínas reguladas diferencialmente em plasma de pacientes com CMDNI chagásica (CCC vs. CDI).

(A) PCA *biplot*. As amostras de pacientes com CCC são representadas em azul e de pacientes com CDI em roxo. Em cinza, as proteínas são ordenadas de acordo com a representatividade para a caracterização dos cenários. (B) Potência estatística do conjunto de dados proteômicos. Fonte: adaptado do *software* Progenesis Q1.

As anotações em termos GO para processos biológicos e funções moleculares demonstraram que as proteínas reguladas positivamente na CCC estão significativamente implicadas nas respostas imune de fase aguda e humoral (Figura 32A). Quanto à rede de interação proteína-proteína, o enriquecimento em especial de 2 complexos moleculares sugerem um aumento da atividade de mecanismos efetores da resposta imune inata e do transporte reverso de colesterol na etiologia chagásica (Figura 32B).

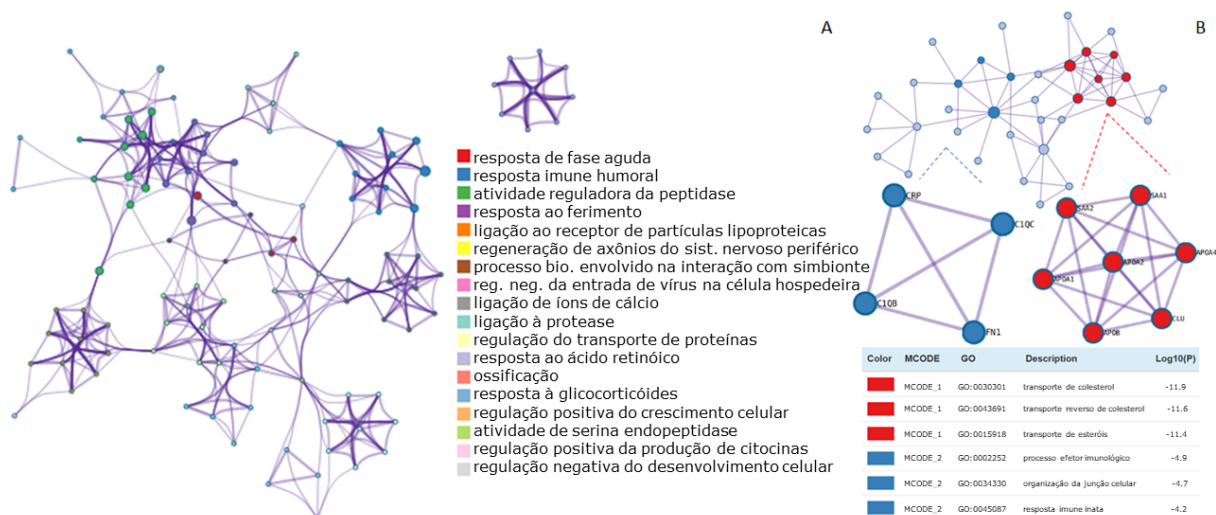


Figura 32: Anotações GO quanto ao processo biológico e função molecular das proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes com CMDNI chagásica (CCC vs. CDI).

(A) Rede de termos enriquecidos. Os termos são apresentados em ordem decrescente de significância ($p \leq 0.01$).

(B) Rede de interação proteína-proteína e componentes MCODE identificados.

Fonte: adaptado do *software* Metascape.

Em análise univariada, 8 proteínas foram consideradas estatisticamente significantes para a discriminação dos cenários, sendo 1 regulada positivamente na CCC e 7 reguladas negativamente em comparação à CDI (Tabela 10).

Tabela 10. Proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CCC e CDI

Proteínas	p-Valor Post hoc
Reguladas Positivamente na CMDNI chagásica	
<i>C1QB</i> (Complement C1Q B chain - fragment)	0.022861845
<i>ADID</i> (Adiponectin D)	0.021217745
<i>A0A8Q3SID8</i> (Complement factor H)	0.033586952
<i>ITIH3</i> (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3)	0.016328968
<i>TNC</i> (Tenascin C)	0.00933492
<i>CFI</i> (Complement factor I)	0.041559146
<i>AMBP</i> (Protein AMBP)	0.014642785
Reguladas Negativamente na CMDNI chagásica	
<i>THBS1</i> (Thrombospondin-1)	0.012785743

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Nota: (FDR) False Discovery Rate; (RSD) Relative Standard Deviation.

A intensidade relativa e inter-relação das 8 proteínas, bem como o agrupamento das amostras resultante, são demonstrados por escala de cor na Figura 33A. Segundo a rede interativa de correlação (Figura 33B), 6 proteínas estão diretamente correlacionadas e somente 1 apresenta grau de correlação negativo, com abundâncias inversamente associadas. Não foi possível identificar covariâncias significativas para 1 das proteínas (ADID).

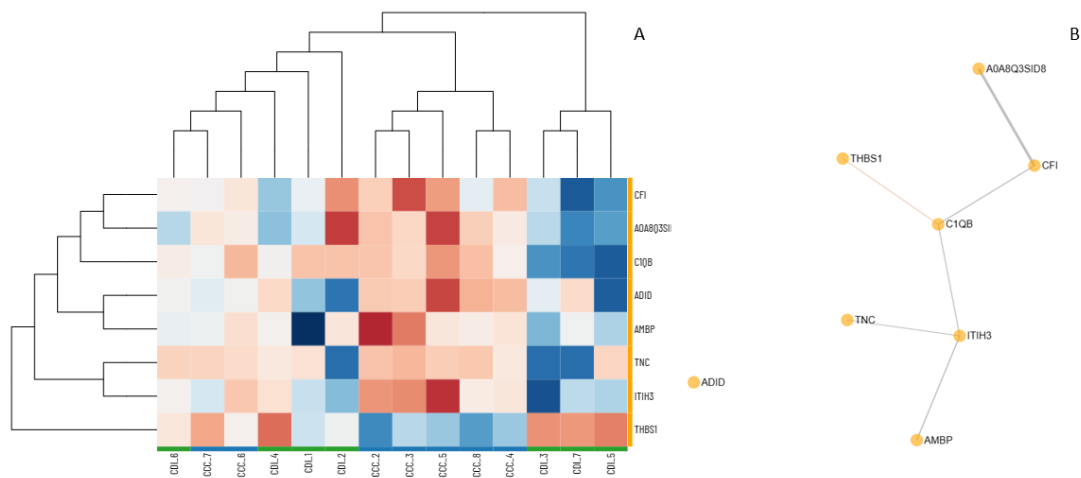


Figura 33: Inter-relação das proteínas estatisticamente significantes na discriminação de pacientes com CCC e CDI.

(A) Agrupamento hierárquico por mapa de calor. Os arranjos expressam a relação entre as proteínas ou amostras. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. (B) Rede de correlação ($r \geq 0.6$). Linhas mais espessas representam correlações mais fortes, sendo cinza para correlações positivas e laranja para correlações negativas. Fonte: adaptado do software Viime.

O estado de regulação e graus de significância e magnitude das proteínas identificadas são demonstrados na Figura 34. Em suma, 6 proteínas foram qualificadas com base nos filtros aplicados.

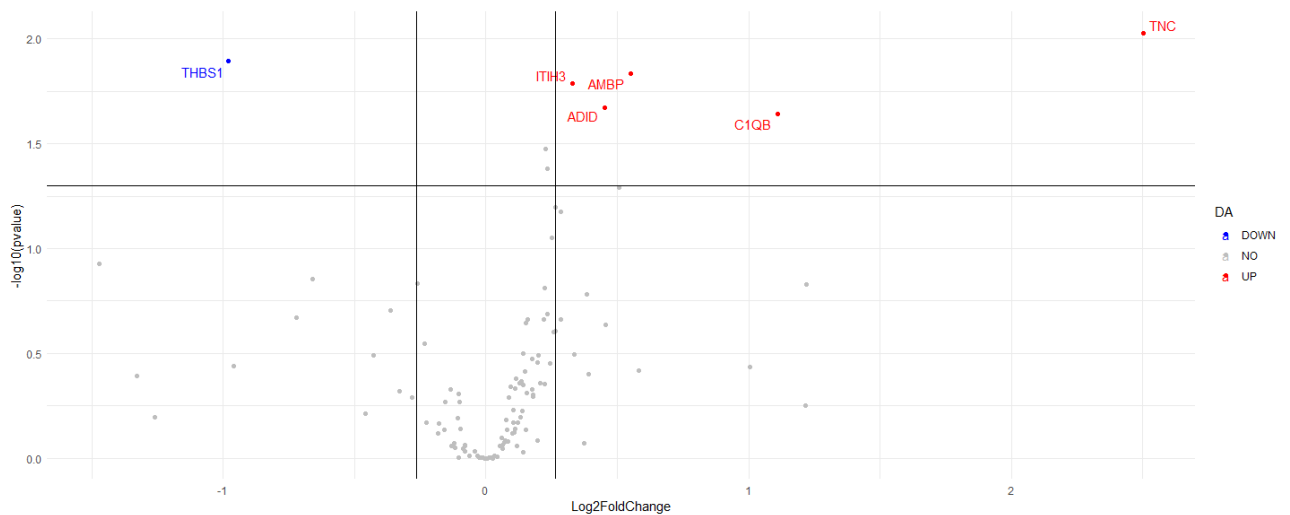


Figura 34: Volcano plot das proteínas discriminantes entre pacientes com CCC e CDI.

A linha horizontal determina o limiar de significância ($p \leq 0.05$) e as linhas verticais os limiares negativo e positivo de magnitude (fold change $\geq \pm 1.2$). Cada ponto no gráfico representa uma proteína, onde aquelas cuja abundância está reduzida em relação ao grupo CDI estão localizadas à esquerda e aquelas cuja abundância está elevada são ilustradas à direita. Proteínas estatisticamente significantes com variações de pelo menos 20% são representadas em azul e vermelho. Fonte: adaptado do software Viime.

5.6.2. Análise Metabolômica

Embora nenhum metabólito tenha sido selecionado pelos critérios *post hoc* aplicados na estatística univariada, a avaliação por OPLS-DA demonstrou uma disparidade metabólica entre as condições patológicas, com validade preditiva (Q^2) de 0,54 (Figura 35A e 35B, respectivamente).

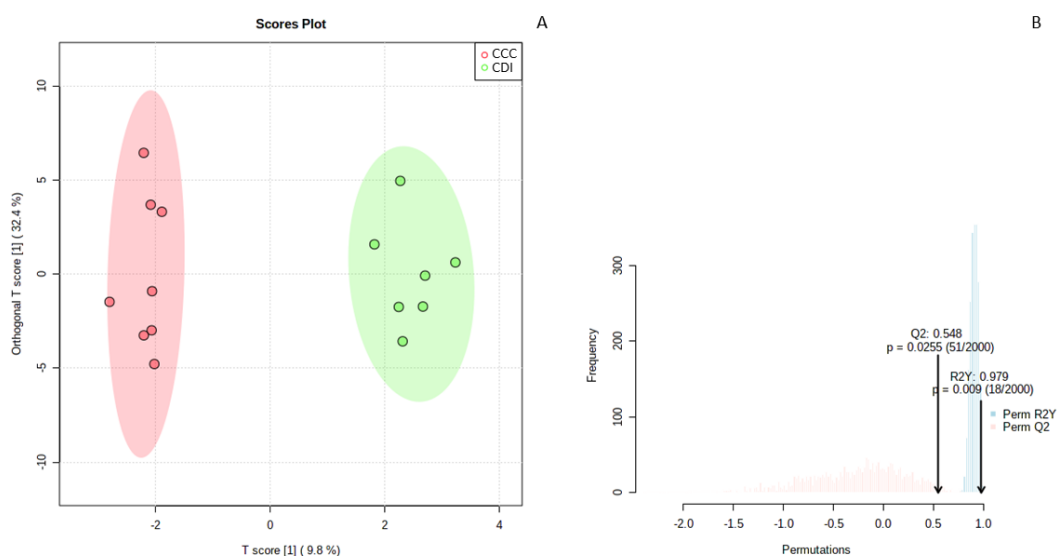


Figura 35: OPLS-DA de pacientes com CCC e pacientes com CDI.

(A) *Scores plot*. A porcentagem de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção plotada e as regiões elípticas correspondem ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada ponto no gráfico corresponde a uma amostra de paciente. (B) Validação do modelo. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

Dos 23 metabólitos de maior representatividade e contribuição para a diferenciação dos cenários no modelo multivariado ($VIP \text{ score} \geq 1.0$), 12 apresentaram maior intensidade relativa em pacientes com CCC e 11 intensidade característica da CDI (Figura 36). A variação na intensidade desses compostos em cada cenário fenotípico é detalhada na Figura 37 por *box plot*.

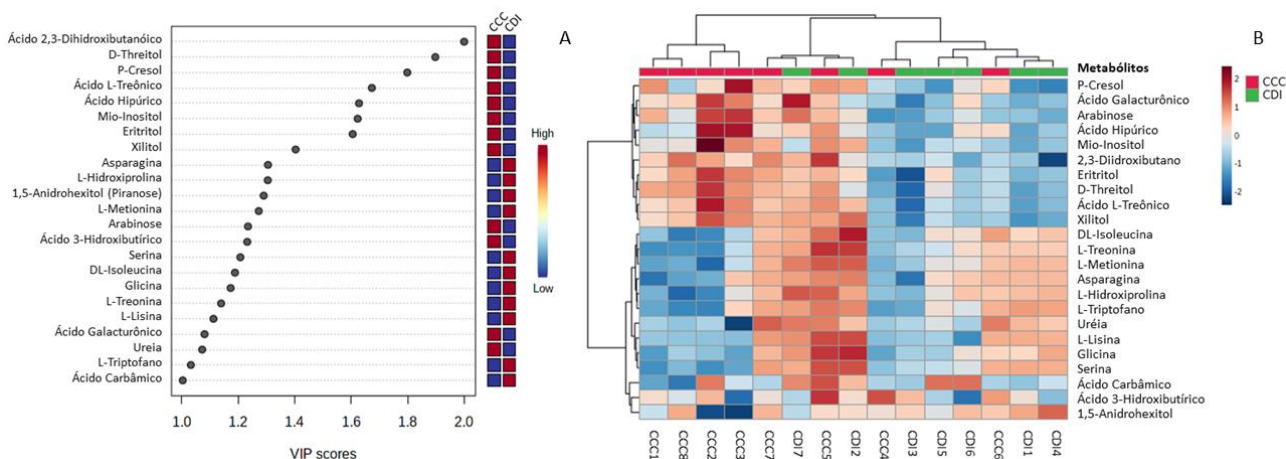


Figura 36: Metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com CCC e CDI por OPLS-DA.

(A) *VIP score*. Os metabólitos estão organizados em ordem de representatividade e as caixas coloridas à direita indicam suas intensidades relativas em cada grupo fenotípico. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. (B) Agrupamento hierárquico por mapa de calor. Os arranjos expressam a relação dos metabólitos ou das amostras e a escala colorida à direita indica a intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

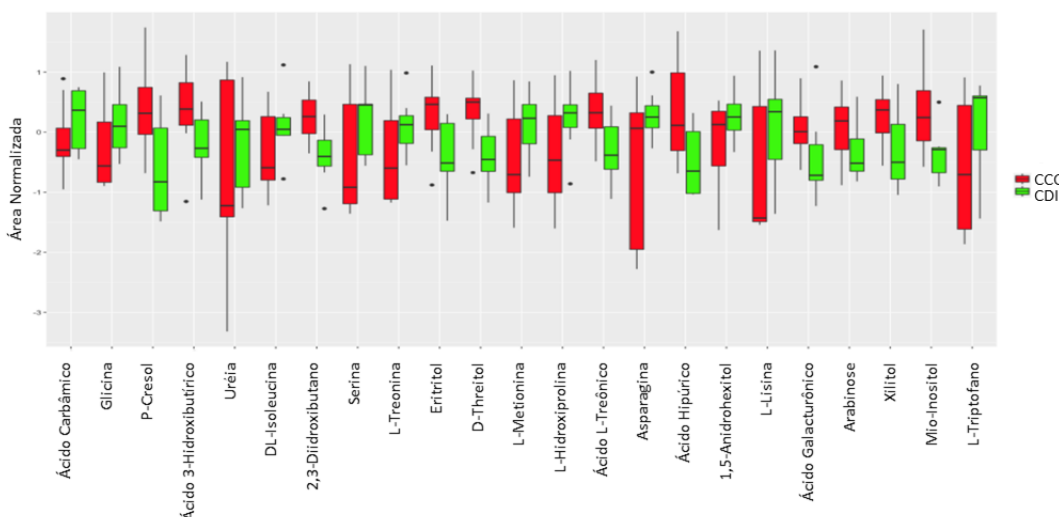


Figura 37: Boxplot dos metabólitos discriminantes na caracterização de pacientes com CCC e pacientes com CDI por OPLS-DA.

O diagrama mostra a distribuição dos compostos em quartis para cada condição. Cada ponto fora do intervalo corresponde a uma amostra *outlier*. Fonte: elaborada pela autora (2023).

Dentre os metabólitos de alta contribuição para a CCC, sete (7) pertencem à classe dos carboidratos e conjugados de carboidratos; um (1) à ácidos carbônicos orgânicos e derivados; um (1) à álcoois e polióis; um (1) a cresóis; um (1) a β hidroxiácidos e derivados; e um (1) à ácidos benzóicos e derivados, enquanto nos metabólitos característicos da CDI oito (8) pertencem à classe dos aminoácidos, peptídeos e análogos; um (1) à ácidos carbônicos orgânicos e derivados; um (1) à álcoois e polióis; e um (1) à ácidos indolil carboxílicos e

derivados (Figura 38A). A potencial rede de interação dos metabólitos característicos da CCC é demonstrada na Figura 38B.

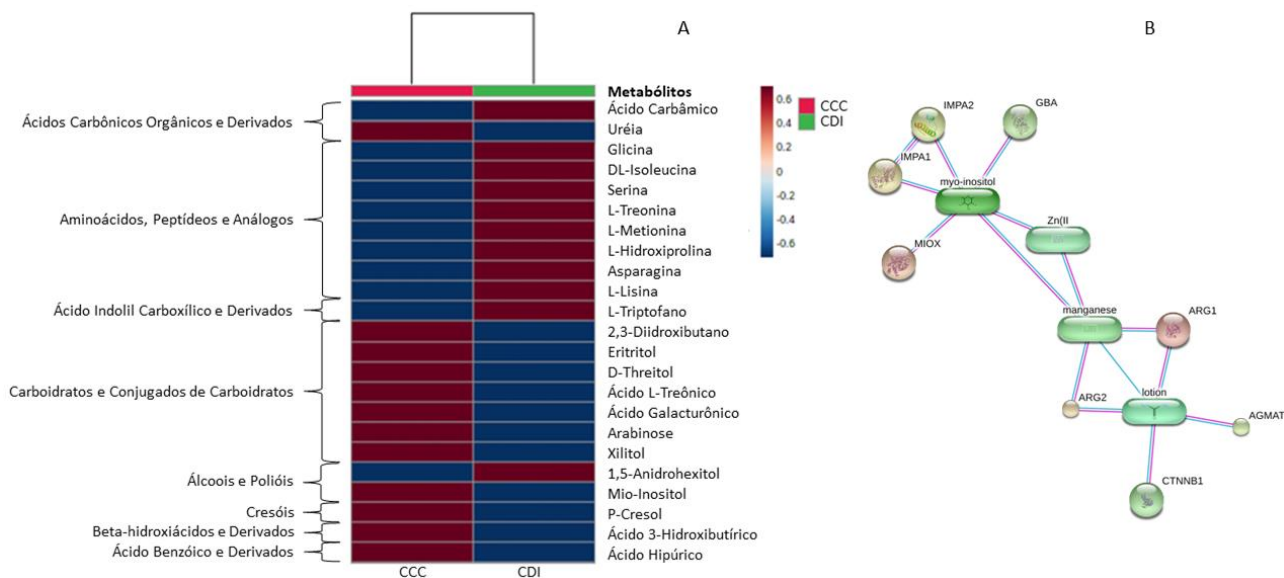


Figura 38: Rede metabólica associada à CCC de acordo com OPLS-DA (VIP score CCC vs. CDI).

(A) Agrupamento em classes bioquímicas por mapa de calor dos metabólitos discriminantes entre as condições. A escala colorida à direita indica a intensidade relativa de cada metabólito em cada grupo. Cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa. (B) Rede de interação dos metabólitos representativos para a caracterização da CCC. Os nós esféricos representam parceiros funcionais previstos e as cores das linhas indicam o tipo de evidência da interação, sendo azul para bancos de dados curados, rosa para determinados experimentalmente e roxo para homologia de proteínas. Fonte: ^A elaborada pela autora (2023) e ^B adaptado do software STITCH.

6. DISCUSSÃO

6.1. FISIOPATOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA AVANÇADA

6.1.1. Regulação Diferencial de Proteínas

Embora a evolução clínica dos pacientes com IC relacionada à DCh seja pior em comparação a pacientes não chagásicos (CARDOSO et al., 2010a), as características moleculares que diferenciam a patogênese e, conseqüentemente, o desfecho clínico da CCC e da CDI ainda não foram elucidadas. No presente estudo, pacientes com IC avançada, independentemente da etiologia, exibiram um desequilíbrio no perfil de proteínas circulante em plasma (Figura 7), com maior abundância de proteínas associadas de forma significativa à defesa antioxidante, com destaque para o catabolismo do peróxido de hidrogênio e transporte de óxido nítrico (Figura 8).

Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*) e nitrogênio (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) exercem funções de mensageiros secundários na sinalização celular, atuando na regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox, como aqueles dependentes do fator nuclear κ B (NF- κ B, *Nuclear Factor κ B*), e modulando a síntese de moléculas ativas como proteínas quinases e isoprostanos (MACHADO et al., 2005). Além disso, a diferenciação de células tronco embrionárias em cardiomiócitos requer níveis basais de ROS (JI et al., 2010), e os processos de angiogênese, regeneração cardíaca e apoptose dos cardiomiócitos são sensíveis ao balanço redox (RAMACCINI et al., 2021).

No coração, as fontes de ROS incluem células endoteliais, neutrófilos e cardiomiócitos, cuja produção de radicais superóxidos durante a respiração mitocondrial é conhecidamente elevada na IC (IDE et al., 1999). Diversos mecanismos podem contribuir para a disfunção mitocondrial e consequente produção desregulada de ROS/RNS, como ativação neuro-hormonal, sobrecarga de pressão e volume, metabolismo energético cardíaco alterado e comorbidades pró-inflamatórias como a diabetes (AIMO et al., 2020; PAULUS; TSCHÖPE, 2013; TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011). O excesso de ROS/RNS causa danos aos componentes celulares, incluindo o DNA, e peroxidação de proteínas e lipídeos, promovendo um ciclo vicioso de geração de radicais livres e potencialização do estresse oxidativo (AIMO et al., 2020).

Maladaptações em resposta à essas condições promovem o remodelamento do miocárdio e progressão mais rápida à IC (TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011), visto que as ROS ativam quinases sinalizadoras de hipertrofia e fatores de transcrição subsequentes (SABRI; HUGHIE; LUCCHESI, 2003), estimulam a proliferação de fibroblastos cardíacos e ativam as metaloproteinases da matriz (MMPs, *Matrix Metalloproteinases*) (SPINALE et al., 1998), medeiam a apoptose (KWON et al., 2003) e podem ainda comprometer diretamente a função contráctil a partir da modulação da sinalização Ca^{2+} intracelular – modificação do receptor de rianodina para aumentar sua probabilidade de abertura, supressão do canal de cálcio tipo L gerando despolarização parcial do potencial de membrana, e interação oxidativa com Ca^{2+} ATPase para inibir a captação de Ca^{2+} (ZIMA; BLATTER, 2006).

Considerada uma ROS mais estável e com potencial para permear membranas e alcançar alvos em compartimentos distantes, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado a partir da dismutação do superóxido de maneira espontânea sob pH baixo ou catalização via enzima superóxido dismutase (SOD) (HANCOCK; DESIKAN; NEILL, 2001). Níveis elevados de H_2O_2 já foram associados ao estímulo de proteínas quinases ativadas por mitógenos, como

MAPK, JNK, p38 e Akt, a fim de induzir a apoptose (KWON et al., 2003). Em conformidade, a superexpressão da enzima catalase especificamente em cardiomiócitos, principal efetora da via catabólica de H₂O₂ – no presente estudo representada pelas proteínas APOA4, HBA1, HBA2, HBB, HBD e PRDX1 –, já foi descrita como fator de prevenção à fase de remodelação progressiva e subsequente progressão ao fenótipo final de IC em modelos murinos de CMDNI, apesar de não demonstrar efeitos sob o fenótipo inicial caracterizado por disfunção contrátil e dilatação do VE (QIN et al., 2010).

Em investigação semelhante ao presente estudo, portadores de IC refratária decorrente de CCC apresentaram níveis elevados de catalase no tecido miocárdico quando comparados aos indivíduos CTRL e portadores das etiologias idiopática e isquêmica, sugerindo um mecanismo compensatório ao estresse oxidativo potencialmente maior na CCC (TEIXEIRA et al., 2021). Embora a catalase tenha sido descrita em mitocôndrias cardíacas e esteja presente também no citoplasma das hemácias, em sua maioria encontra-se nos peroxissomos, onde decompõe o H₂O₂ gerado durante a β-oxidação de ácidos graxos (AKHMEDOV; RYBIN; MARÍN-GARCÍA, 2015). No presente estudo, a via catabólica do H₂O₂

As RNS por sua vez, são derivadas principalmente do óxido nítrico (NO), identificado como alvo de transporte pelo enriquecimento das vias interativas (Figura 8B). Implicado na formação de peroxinitrito e dióxido de nitrogênio – e consequente na oxidação/nitração de proteínas e peroxidação lipídica, respectivamente (MACHADO et al., 2005), o óxido nítrico possui alta difusibilidade e não necessita de receptores transmembranosos para atuar na sinalização a nível intracelular (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Durante a resposta inflamatória à infecção por *T. cruzi*, sua produção em excesso juntamente ao superóxido gera S-nitrosilação de cisteínas em proteínas de células mononucleares do sangue periférico, cujos níveis de modificação correlacionam-se com a severidade da DCh (ZAGO et al., 2019).

Já a baixa biodisponibilidade de NO em plasma é associada à redução da sinalização do monofosfato cíclico de guanosina (cGMP, *Cyclic Guanosine-3',5'-monophosphate*), responsável por manter a contratilidade e integridade cardíaca compensatória na IC (PREEDY; BALIGA; HOBBS, 2020). Na ICFEr, a redução de NO e consequente comprometimento dessa via resultam em diminuição da potência muscular e prejuízo da vasodilatação e capacidade de exercício aeróbio (MULKAREDDY et al., 2019). Dessa forma, considerando que a ligação à hemoglobina (Hb) ou outras proteínas contendo o grupo heme podem inibir ou preservar a atividade do NO (HELMS; KIM-SHAPIRO, 2013), e que o complexo molecular indicado pelo enriquecimento também caracteriza um fator de proteção contra os efeitos oxidantes deletérios da Hb livre via ligação à haptoglobina e à hemopexina (SMITH; MCCULLOH, 2015), é

possível que a rede de interação em destaque indique um complexo antioxidante potencialmente responsável pela modulação dos níveis de NO e conseqüentemente do equilíbrio entre estresse oxidativo e manutenção da contratilidade na IC.

6.1.2. Comprometimento Metabólico

No presente estudo, os resultados da OPLS-DA demonstraram que pacientes com IC avançada, independentemente da causa, exibem um desequilíbrio metabólico global (Figura 11) com maior abundância de 21 metabólitos identificados (Figura 12). Em condições fisiológicas, o coração adulto é metabolicamente flexível e gera ATP a partir de diversos substratos, como AGs, lactato, glicose, cetonas e aminoácidos (AAs), obtidos continuamente do sangue e direcionados à fosforilação oxidativa mitocondrial (95 %) e glicólise (5%) (KARWI et al., 2018; LOPASCHUK et al., 2021; WISNESKI et al., 1990). Até 60% da produção de ATP mitocondrial resulta da β -oxidação de AGs, no entanto, devido à sua maior necessidade de oxigênio e capacidade oxidativa mitocondrial comprometida, os corações com insuficiência tendem a aumentar o consumo de glicose via glicólise anaeróbica como um mecanismo compensatório para manter os níveis de ATP (ALLARD et al., 1994; KARWI et al., 2018; LOPASCHUK et al., 2021; RANDLE et al., 1963; YAMAMOTO; SANO, 2022).

A reprogramação metabólica na IC também inclui aumento da oxidação de corpos cetônicos e redução da oxidação de lactato, aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e glicose, prejudicando a produção geral de ATP pelo fluxo do ciclo de Krebs (KARWI et al., 2018; LOPASCHUK et al., 2021). De fato, o acúmulo de AGs, AAs e componentes do ciclo de Krebs (ácidos cítrico e succínico) observado no plasma de pacientes com IC no presente estudo (Figura 14) sugere uma importante disfunção mitocondrial e conseqüente perda de flexibilidade metabólica, o que pode contribuir para a conhecida redução de até 30% do conteúdo de ATP em corações insuficientes (KARWI et al., 2018; LOPASCHUK et al., 2021; STARLING; HAMMER; ALTSCHULD, 1998).

O esforço para sustentar a demanda de energia durante a hipertrofia patológica leva a circuitos maladaptativos, como o aumento da acetilação de proteínas mitocondriais, que gera estresse mitocondrial e, eventualmente, morte celular iniciada pela mitocôndria (ZHOU; TIAN, 2018). Do ponto de vista clínico, esse remodelamento metabólico pode ser expressado em progressão da hipertrofia do VE, visto que à medida que a complacência ventricular diminui, a pressão de enchimento aumenta e eventualmente ocasiona a dilatação, além de representar um

substrato arritmogênico em razão da desorganização da citoarquitetura tecidual (BORNSTEIN; RAO; MARWAHA, 2021).

A hiperativação neuro-humoral compensatória em resposta ao decaimento da fração de ejeção ventricular, dentre outros mecanismos, leva à secreção de catecolaminas a fim de aumentar a disponibilidade de substratos energéticos no sangue (HARTMANN et al., 2017; REICHART et al., 2019). Secretada em resposta às condições de estresse e extrema demanda, a adrenalina, assim como os peptídeos natriuréticos, atua na regulação da lipólise e consequente liberação de AGs na corrente sanguínea (DESSÌ-FULGHERI; SARZANI; RAPPELLI, 2003; KOLDITZ; LANGIN, 2010), possivelmente contribuindo para o acúmulo de AGs livres observado. Além disso, a concentração de AGs livres em plasma está associada de forma independente à incidência de IC e desfechos adversos (ØIE et al., 2011; YU et al., 2021), e o acúmulo de frações lipídicas devido à extrapolação da capacidade oxidativa mitocondrial pode resultar em lipotoxicidade e levar à disfunção miocárdica (HU et al., 2020; SHARMA et al., 2004).

6.2. FISIOPATOLOGIA DAS CARDIOMIOPATIAS CHAGÁSICA E IDIOPÁTICA

6.2.1. Regulação Diferencial de Proteínas

Apesar da diferença entre as funcionalidades das proteínas reguladas positivamente em pacientes com CCC/CDI quando comparados às amostras CTRL (Figuras 16 e 22), os perfis patológicos caracterizados demonstram que o fenótipo de IC avançada pode ser dominante (Figura 27A). Tal similaridade observada pode estar associada ao potencial sistêmico avaliado aqui em plasma, visto que em amostras de explantes de VE de pacientes com CCC, a expressão de diversos genes implicados na resposta imune, metabolismo lipídico e fosforilação oxidativa foram identificadas em estado de regulação positiva em comparação às amostras de pacientes com CDI, com destaque para genes induzíveis por interferon γ (IFN- γ) (CUNHA-NETO et al., 2005). De uma perspectiva proteômica, já foi reportado que biópsias do VE de pacientes chagásicos apresentam regulação negativa de várias proteínas do metabolismo energético mitocondrial e da β -oxidação de AGs quando comparados a pacientes com CDI e cardiomiopatia isquêmica, além de uma redução do potencial transmembranar mitocondrial possivelmente mediado por altos níveis de IFN- γ (TEIXEIRA et al., 2021).

Em conformidade, ao comparar pacientes com CCC diretamente a pacientes com CDI, um envolvimento mais significativo da via de resposta de fase aguda foi evidenciado na

etiologia chagásica, representada pelas proteínas AHSG, APCS, CRP, F2, FN1, SAA1 e SAA2 (Figura 32A). Essa manifestação é descrita como um deslocamento contínuo do perfil de citocinas para Th1 em resposta ao parasitismo tecidual na infecção aguda, com estímulo preservado de células T produtoras de IFN- γ na fase crônica, níveis plasmáticos elevados de TNF- α e supressão de citocinas Th2, como IL-4 (ABEL et al., 2001; FERREIRA et al., 2003; MARIN-NETO et al., 2007). Em pacientes com CCC, o desenvolvimento da resposta Th1 exacerbada é suportada por evidências de maior produção de IFN- γ e menor síntese de IL-10 por células mononucleares CD4⁺ em sangue periférico quando comparados à pacientes com DCh em fase indeterminada (ABEL et al., 2001; GOMES et al., 2003). Além disso, níveis plasmáticos de TNF- α elevados estão correlacionados à gravidade da cardiomiopatia chagásica e sobrevivência dos portadores (DRIGO et al., 2006; FERREIRA et al., 2003).

Quanto à resposta imune humoral (proteínas SERPING1, C1QB, C1QC, C6, CLU, DEFA1;DEFA1B, F2, CFI e FCN3), também associada significativamente à IC relacionada à DCh (Figura 32A), uma alteração no perfil de reconhecimento de IgG das proteínas tripomastigotas circulantes ao longo da progressão da DCh para a forma cardíaca foi ratificada comparando a atividade dos anticorpos de pacientes em fase indeterminada e pacientes em estágios iniciais da CCC (CAMINHA et al., 2019). Tal efeito foi atribuído a uma provável influência mútua de fatores do hospedeiro e do parasita na modulação de proteínas intracelulares e, de fato, pacientes com DCh podem passar a expressar em plasma mediadores lipídicos pró-resolução inflamatória sintetizados inicialmente pelo parasita, como a resolvina D1 (COLAS et al., 2018).

Além do complexo molecular formado por efetores da resposta imune inata, implicados especialmente no reconhecimento e eliminação de agentes patogênicos e células danificadas por fagocitose e posterior ativação da resposta Th1, o enriquecimento de vias interativas revelou também maior contribuição do transporte reverso de colesterol na CCC (Figura 32B). Com efeito, a infecção por *T. cruzi* afeta drasticamente a estrutura e funcionalidade do tecido adiposo em todas as fases da infecção (COMBS et al., 2005; NAGAJYOTHI et al., 2009, 2012), correlacionando-se inversamente em termos quantitativos com o aumento da carga parasitária cardíaca e a dilatação do ventrículo direito (VD) durante a fase aguda e com o favorecimento do dano cardíaco e da dilatação biventricular durante a fase crônica indeterminada (LIZARDO et al., 2021).

O *T. cruzi* apresenta alta afinidade pelas lipoproteínas do hospedeiro e depende especialmente da lipoproteína de densidade baixa (LDL, *Low Density Lipoprotein*) para invasão e sobrevivência, sendo possível observar um paralelo entre a queda nos níveis sorológicos de

LDL/colesterol e o acúmulo dessas moléculas intracelularmente e no tecido cardíaco em modelos murinos infectados (JOHNDROW et al., 2014; NAGAJYOTHI et al., 2011, 2014). Considerando que a modulação da homeostase intracelular de colesterol/lipídeos induzida pela infecção persiste durante a infecção crônica e que o efluxo de colesterol dos tecidos periféricos para a lipoproteína de alta densidade (HDL, *High Density Lipoprotein*) da corrente sanguínea, e da HDL para o fígado, constitui uma via essencial para a homeostase global de colesterol/lipídeos, o aumento do transporte reverso de colesterol em pacientes com CCC pode caracterizar uma maladaptação à infecção. De fato, durante o curso clínico da DCh, dietas ricas em gordura podem a princípio caracterizar um fator de proteção cardíaca (NAGAJYOTHI et al., 2014), porém a modulação do metabolismo lipídico por meio destas pode auxiliar na sobrevivência do parasita nos tecidos adiposo e hepático, e assim viabilizar a progressão às fases crônicas sintomáticas (AYYAPPAN; NAGAJYOTHI, 2017; LIZARDO et al., 2017).

Quanto às proteínas identificadas com potencial estatístico e magnitude relevantes para a caracterização da CMDNI chagásica (Figura 34), uma maior abundância relativa da cadeia B do complemento C1q (C1QB) em pacientes com CCC sugere uma maior ativação da via clássica do complemento, iniciada pelo complexo C1 em reconhecimento à anticorpos agregados a antígenos estranhos a fim de induzir a fagocitose e a resposta inflamatória. Em contrapartida, a evasão da via em seus estágios iniciais é de suma importância para a sobrevivência e invasão do *T. cruzi*, que a partir da translocação da calreticulina do seu retículo endoplasmático para o ambiente extracelular, inibe o complexo C1 do hospedeiro (RAMÍREZ-TOLOZA et al., 2020). Além disso, a regulação negativa especificamente do gene C1QB foi associada ao desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia hipertrófica (CUI et al., 2022; WU et al., 2022).

Já a adiponectina D (ADID), um hormônio proteico sintetizado pelos adipócitos também regulado positivamente em pacientes com CCC, contribui principalmente para homeostase energética, atuando na regulação da glicemia e do catabolismo de AGs (DIEZ; IGLESIAS, 2003). Apesar dos achados no presente estudo, na infecção aguda por *T. cruzi*, a ADID foi identificada em estado de regulação negativa nos tecidos adiposos de modelos murinos, fato este atribuído ao seu potencial anti-inflamatório (NAGAJYOTHI et al., 2012). Além disso, em estudo da forma crônica cardíaca, Dabarian et al. (2019) não observaram diferenças entre os níveis plasmáticos de adiponectina em pacientes com CCC, CDI e pacientes CTRL, mas destacaram uma associação positiva entre os níveis de adiponectina, índices de avaliação do sistema nervoso autônomo e a redução dos níveis de insulina na cardiomiopatia chagásica quando comparada à idiopática.

Também foi identificado maior abundância das proteínas ITIH3 e AMBP, constituintes dos inibidores inter- α -tripsina (ITI, Inter- α -Trypsin Inhibitors), em pacientes chagásicos. Considerados clássicos exemplos de complexos proteína-glicosaminoglicano-proteína presentes em plasma, os ITI são uma família de inibidores de protease envolvidos na estabilização da matriz extracelular e na regulação do sistema imune (ZHUO; HASCALL; KIMATA, 2004). Embora ainda não haja evidências diretas de sua relação com o comprometimento cardíaco ou com a DCh, a administração de ITI pode manter a estabilidade hemodinâmica e melhorar a oxigenação, coagulação e sobrevida de modelos animais durante a sepse (JOURDAIN et al., 1997; YANG et al., 2002).

Finalmente, a glicoproteína da matriz extracelular tenascina C (TNC) também contribui significativamente para a caracterização de pacientes com CCC. A expressão de TNC é conhecidamente elevada durante processos de remodelação tecidual, e apesar de ser minimamente detectada no coração adulto sob condições fisiológicas, sua reexpressão restrita às condições patológicas está associada a inflamação, podendo ser observada no infarto do miocárdio, fibrose cardíaca hipertensiva, miocardite, CMD e doença de Kawasaki (IMANAKA-YOSHIDA, 2012; IMANAKA-YOSHIDA; HIROE; YOSHIDA, 2004; IMANAKA-YOSHIDA; TAWARA; YOSHIDA, 2020). Por outro lado, a também glicoproteína da matriz extracelular trombospondina-1 (THBS1) foi identificada em maior abundância em pacientes com CDI. Ambas são expressas em níveis elevados durante a resposta à lesão e atuam na modulação das interações célula-célula e célula-matriz (CHISTIakov et al., 2017; IMANAKA-YOSHIDA; TAWARA; YOSHIDA, 2020), portanto é possível que os diferentes desfechos observados para as etiologia das CMDNIs estejam intrinsecamente associados ao processo de remodelação do miocárdio.

6.2.2. Comprometimento Metabólico

Ao comparar CCC e CDI individualmente às amostras CTRL, os resultados da PLS-DA indicam uma disparidade entre os perfis metabólicos das condições patológicas, com maior discriminação de CCC em relação à condição fisiológica (Figuras 29 e 30), corroborando as observações clínicas quanto ao desfecho e prognóstico desses pacientes (BARBOSA et al., 2011; BESTETTI; MUCCILLO, 1997; BRAGA et al., 2006). O confronto direto entre os cenários CCC e CDI revelou que, embora a validade preditiva do modelo OPLS-DA não seja tão boa quanto em outras análises – fato este que atribuímos ao desfecho fenotípico de IC avançada em comum –, pacientes com histórico de DCh apresentam uma assinatura metabólica

distinta (Figura 35 e 36), especialmente em termos de metabolismo de carboidratos e AAs (Figura 38A).

Apesar dos critérios de seleção aplicados visando minimizar os fatores de confusão, é de referir que, por se tratar de um estudo de vida real, não foi possível reduzir a influência de fatores externos como dieta e uso crônico de medicamentos, que explicam as intensidades de xilitol/eritritol e ácido galacturônico/arabinose, respectivamente. Aqui, tais achados são de natureza qualitativa e estão além do escopo do presente estudo, tornando-se aconselhável que essas características sejam consideradas em futuros estudos translacionais.

O estado hipercatabólico da IC também é marcado pela degradação de proteínas do músculo esquelético a fim de corresponder à dependência do miocárdio em AAs para manter o nível cardíaco de ATP, levando à caquexia (CARUBELLI et al., 2015; KRYSZTOFIK et al., 2020). Em estágios avançados, a redução dos níveis de AAs na IC também pode ser explicada pela hiperproliferação de microbiota intestinal patogênica, relatada em mais de três quartos dos pacientes classes II a IV. Considerado clinicamente importante, esse comprometimento intestinal pode alterar o metabolismo de proteínas, reduzindo a absorção intestinal de vitamina B12, ácido fólico e vitamina K (PASINI et al., 2016). Além disso, o remodelamento do miocárdio (LAI et al., 2014) e o consumo excessivo de BCAAs (AQUILANI et al., 2017) possivelmente contribuem para níveis baixos de AAs. Wang, Cheng e Liu (2018) observaram em estudo que os níveis plasmáticos de AAs essenciais, exceto fenilalanina, são menores em pacientes que tiveram rehospitalização ou óbito por IC se comparado àqueles que não tiveram. Dessa forma, considerando também a progressão diversa da CCC em comparação a outras etiologias da IC, a diminuição da intensidade relativa dos AAs plasmáticos nos pacientes com CCC do presente estudo pode corroborar tal indicação de gravidade da doença.

Explorando mais especificamente os AAs discriminantes entre as condições patológicas aqui analisadas, pacientes com CCC exibiram abundância mais baixa de treonina, conforme relatado anteriormente por Hennig et al. (2019). Entre outras alterações metabólicas, a abordagem *fingerprinting* aplicada pelos autores revelou que o nível de treonina em mioblastos de ratos foi completamente depletado em todas as condições analisadas, estas infectadas por *T. cruzi* e tratadas com diferentes drogas anti-*T. cruzi* ou não tratadas. Resultados semelhantes foram encontrados para a forma pró-cíclica de *T. brucei*, na qual treonina é o AA mais rapidamente metabolizado pelo parasita para a biossíntese de lipídeos (MILLERIOUX et al., 2013).

Recentemente, Saleem et al. (2021) reportaram que, em comparação a indivíduos CTRL, além da diminuição do nível plasmático de treonina em pacientes com IC, ocorre

também a redução dos níveis de metionina, isoleucina, serina e lisina. A metionina, em particular, foi ainda classificada como um preditor independente e significativo de IC em análise de regressão multivariada. No presente estudo, também foi identificada uma redução desses AAs em pacientes com CCC em comparação aos pacientes com CDI, e de acordo com Aquilani et al. (2017) tanto o número de AAs quanto os níveis arteriais reduzidos estão relacionados à gravidade da IC, corroborando assim o desfecho distinto na IC relacionada à DCh. Ademais, os autores também destacaram que os níveis de metionina diminuem progressivamente à medida que a doença piora.

O nível de triptofano (Trp) plasmático também diferiu entre as duas etiologias da IC em nossos experimentos, com menor intensidade nos pacientes com CCC. O Trp é um AA essencial, particularmente importante para a proliferação de patógenos intracelulares, como as formas amastigota de *T. cruzi* durante a fase crônica da DCh. A dependência em Trp da célula hospedeira gera uma suscetibilidade à privação de Trp por efeito da degradação mediada pela enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) como parte da defesa inata do hospedeiro (CERBÁN et al., 2020), no entanto, a carência de Trp juntamente ao acúmulo de seus produtos catabólicos ativos (quinureninas) pode inibir a proliferação ou promover anergia e morte das células T, e modular a resposta das células T auxiliares (FALLARINO et al., 2002; FRUMENTO et al., 2002; MUNN et al., 2005; TERNESS et al., 2002). Reforçando esse efeito de “espada de dois gumes”, Marañón et al. (2013) revelaram que a atividade da IDO é maior em pacientes chagásicos em comparação a indivíduos CTRL, e maior naqueles em fase cardíaca ou digestiva crônica sintomática do que em pacientes assintomáticos, estabelecendo uma correlação entre o status da atividade enzimática e a transição para infecção crônica. Os autores relataram ainda que a administração de benznidazol, um medicamento anti-*T. cruzi*, diminuiu a atividade da IDO em pacientes sintomáticos. Assim, essa redução na intensidade de Trp observada nos pacientes com CCC aqui analisados pode ser dar em virtude de seu catabolismo mediado pela atividade enzimática ascendente da IDO.

O aumento de mio-inositol na CCC em comparação a CDI também foi sugerido nos resultados aqui apresentados. O aumento da expressão de receptores IP₃ (IP₃Rs) é um mecanismo geral e fundamental na modulação da sinalização de Ca²⁺ durante a doença cardíaca, com efeito arritmogênico durante a hipertrofia ventricular (HARZHEIM et al., 2009). Considerando que os fosfatos de inositol (IPs) são derivados fosforilados do mio-inositol, o aumento nos níveis de mio-inositol aqui observado poderia ser parte de uma resposta compensatória para fornecer uma via alternativa de mobilização da liberação de Ca²⁺ intracelular em estágios avançados da IC, conforme sugerido por Deidda et al. (2015). Em

conformidade, Mijares et al. (2020) demonstraram que a exposição a agentes que fomentam a síntese ou concentração endógena de IP₃ induz maior elevação do Ca²⁺ diastólico em cardiomiócitos isolados de pacientes chagásicos em comparação àqueles não chagásicos. Além disso, os cardiomiócitos de indivíduos com DCh continham uma carga reduzida de Ca²⁺ no retículo sarcoplasmático, nível mais alto de IP₃ intracelular e também propriedades contráteis comprometidas se comparados à condição CTRL. O aumento de Ca²⁺ diastólico e a despolarização parcial do potencial de membrana em cardiomiócitos de pacientes chagásicos correlaciona-se diretamente em termos de magnitude com as classificações da NYHA (LÓPEZ et al., 2011; MIJARES et al., 2020).

Pacientes com CCC também apresentaram níveis mais elevados de uréia e ácido hipúrico quando comparados ao grupo CDI (Figura 36A). Considerando a potencial rede de interação dos metabólitos relativamente intensos nessa condição (Figura 38B), esses resultados sugerem em conjunto a hipótese de uma sobrecarga inabitual do ciclo da ureia na IC chagásica, de forma a favorecer a gravidade da doença, uma vez que a disfunção renal é considerada um preditor de desfecho independente na IC (COSTANZO, 2020; OWAN et al., 2006; TABUCANON; TANG, 2020).

Embora tal análise esteja além do escopo planejado para o presente estudo, há de fato uma inter-relação entre lesões cardíacas e renais, clinicamente descrita como síndrome cardiorrenal (SCR), leva a um acúmulo de toxinas urêmicas no organismo (FALCONI et al., 2021). Na prática do cardiologista, a SCR é comumente observada em pacientes com IC, está associada a pior prognóstico e pode ser secundária a múltiplos mecanismos fisiopatológicos, como alterações hemodinâmicas que levam à congestão venosa renal (RONCO; CICOIRA; MCCULLOUGH, 2012). Além disso, um metabolismo proteico desequilibrado e associado ao comprometimento renal pode culminar em uremia, condição na qual os níveis de uréia, mio-inositol e ácido hipúrico estão sabidamente aumentados (CLEMENTS; DEJESUS; WINEGRAD, 1973; LAU; VAZIRI, 2017).

Ainda sobre toxinas urêmicas, os dados aqui apresentados também demonstram que o nível de p-cresol – um produto final do metabolismo de proteínas – está mais elevado na CCC se comparado a CDI. Alinhado a isso, um número crescente de publicações apontam uma associação entre esse metabólito em específico, doença cardiovascular e mortalidade de pacientes renais (BARRETO et al., 2009; LIN et al., 2010). Na DCh particularmente, Gironès et al. (2014) revelaram um aumento acentuado de p-cresol tanto no tecido cardíaco quanto no plasma de camundongos infectados por *T. cruzi*, sugerindo que alterações no metabolismo desse metabólito podem estar associadas ao aumento do estresse cardíaco na miocardite aguda.

6.3. FISIOPATOLOGIA COMPARATIVA NA CARDIOMIOPATIA DILATADA NÃO ISQUÊMICA AVANÇADA

O presente estudo, em concordância com a literatura, aponta o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e a inflamação como a tríade central da fisiopatologia da IC. Independentemente da etiologia, pacientes com IC avançada apresentaram maior abundância de proteínas associadas de maneira significativa à defesa antioxidante, possivelmente em resposta a produção desregulada de ROS/RNS, e de metabólitos substratos do metabolismo mitocondrial de ATP, sugestivo de perda da flexibilidade metabólica e consequente desequilíbrio entre a demanda energética e a capacidade oxidativa mitocondrial. Circuitos maladaptativos em reflexo à essas condições promovem o remodelamento do miocárdio e a progressão mais rápida à IC.

Embora a perturbação do metabolismo mitocondrial possa ser um evento mecanicista central na predisposição à IC, resultando em um declínio da fosforilação oxidativa e aumento da produção de radicais livres e espécies reativas, a regulação diferencial de proteínas e o comprometimento metabólico associados diferem entre as populações de CCC e CDI. Neste estudo, pacientes da etiologia chagásica apresentaram maior abundância de proteínas envolvidas significativamente na resposta de fase aguda, possivelmente em detrimento do estímulo pró-inflamatório preservado de citocinas Th1 já descrito na literatura. Além disso, a influência mútua de fatores do hospedeiro e do parasita sob as proteínas intracelulares pode resultar na regulação positiva do transporte reverso de colesterol aqui observado, visto que o *T. cruzi* depende da LDL do hospedeiro para invasão e portanto o efluxo de colesterol poderia auxiliar na sobrevivência do parasita nos tecidos adiposo e hepático, viabilizando a progressão à CCC.

Dentre as proteínas identificadas com potencial estatístico e magnitude relevantes para a caracterização da IC de etiologia chagásica, as proteínas C1QB e ADID corroboram as alterações no padrão de resposta inflamatória e metabolismo energético na CCC. Já as proteínas TNC e THBS1, inversamente reguladas nas CMDNI avaliadas, sugerem que os diferentes desfechos observados para as etiologias podem de fato estar intrinsecamente associados ao processo de remodelação do miocárdio.

Quanto ao desequilíbrio metabólico aqui identificado, este difere entre as CMDNI especialmente em termos de metabolismo de AAs, cuja redução global no sangue já foi previamente vinculadas à gravidade da IC. Corroborando o desfecho distinto na IC relacionada

à DCh, os pacientes com CCC avaliados apresentaram menor abundância de 8 AA quando comparados à pacientes com CDI, dentre os quais treonina e metionina se destacam pela associação ao metabolismo do *T. cruzi* e à progressão da IC, respectivamente.

Por outro lado, o aumento de metabólitos como ureia, ácido hipúrico, p-cresol e mio-inositol na CCC levantaram a hipótese de uma sobrecarga inabitual do ciclo da ureia na IC chagásica como fator agravante da doença, visto que os mesmos são caracterizados como toxinas urêmicas na disfunção renal e esta é considerada um preditor de desfecho independente na IC. Excetuando tal investigação, que está além do escopo planejado para o presente estudo, elevados níveis de mio-inositol podem estar associados a um mecanismo compensatório de mobilização da liberação de Ca^{2+} intracelular em estágios avançados da IC, reforçando o comprometimento das propriedades contráteis na etiologia chagásica. Alterações no metabolismo do p-cresol podem estar associadas ao aumento do estresse cardíaco na DCh.

Adicionalmente, o prognóstico desfavorável na CCC pode estar associado a uma maior instabilidade hemodinâmica, visto que os pacientes chagásicos aqui avaliados, similarmente à outros estudos, apresentavam redução da pressão arterial diastólica e da frequência cardíaca se comparados aos pacientes idiopáticos. É válido mencionar que os indivíduos portadores de CDI eram majoritariamente mais jovens, fator que pode estar relacionado à hipótese da contribuição de um componente genético no desenvolvimento da doença.

Uma vez que este é um estudo de descoberta para investigação da potencial fisiopatologia molecular que diferencia desfechos específicos em pacientes com CMDNI, os perfis de proteínas e metabólitos aqui caracterizados em plasma de pacientes com IC chagásica e idiopática podem auxiliar a direcionar estudos de populações maiores no futuro esclarecimento da patogênese por trás das observações clínicas. De uma perspectiva translacional, a compreensão da funcionalidade destes efetores, especialmente na CCC, pode aprofundar nosso conhecimento sobre os aspectos moleculares que influenciam significativamente o desenvolvimento, progressão e desfecho da doença. À respeito disso, estudos futuros devem considerar a inclusão de pacientes com DCh indeterminada e CCC em estágios iniciais a fim de agregar valor prognóstico à examinação.

O presente estudo apresenta algumas limitações relacionadas ao número de pacientes em cada cenário biológico, como a possibilidade de interferências no pareamento dos pacientes com CCC e CDI participantes segundo a análise dos dados clínicos e a potência estatística obtida para os dados proteômicos – especialmente em CCC vs. CDI. Apesar de distante do ideal, o conjunto amostral resultou em diversas proteínas significantes em termos estatísticos e de magnitude para a diferenciação das condições, além de metabólitos com excelente potencial

discriminativo em 3 dos cenários propostos ($Q2 > 0,8$). Outras limitações incluem uma possível saturação dos anticorpos imobilizados para apolipoproteína A1 e haptoglobina na depleção, viabilizando a permanência dessas proteínas dentre as mais abundantes.

Por fim, a Figura 39 resume de forma interativa os principais achados aqui descritos na caracterização de pacientes com IC avançada e CCC. Embora a metabolômica comparativa já tenha sido reportada e esteja em vias de publicação (APÊNDICE B), a translação dos resultados de ambas as análises à prática clínica requer ainda a validação em uma coorte maior.

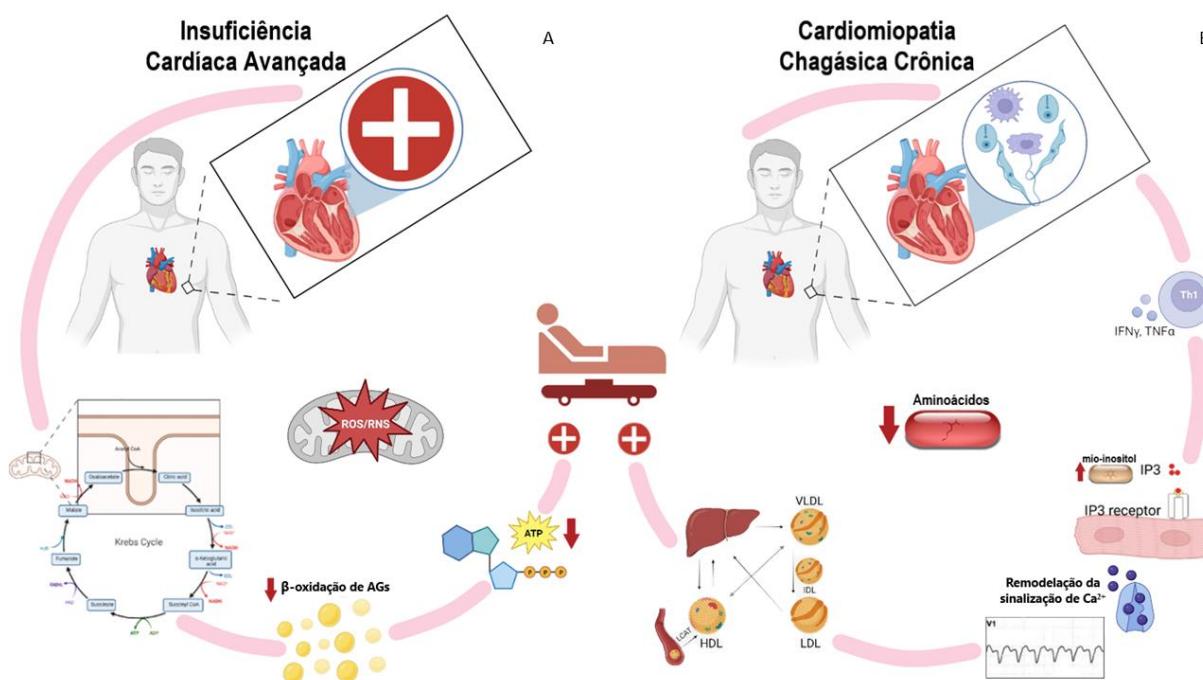


Figura 39: Fisiopatologia da IC avançada e da CCC de acordo com as análises proteômica e metabolômica. (A) Associação entre o comprometimento do metabolismo energético mitocondrial, estresse oxidativo, acúmulo de AGs, progressão da hipertrofia do VE e IC avançada. (B) Associação entre DCh, resposta Th1 exacerbada, dependência do metabolismo energético em AAs, aumento de mio-inositol na remodelação da sinalização de Ca^{2+} , transporte reverso de colesterol e IC avançada. Fonte: elaborada pela autora (2023).

7. CONCLUSÕES

O presente estudo, utilizando um abordagem de descoberta, demonstrou que as análises de proteínas e metabólitos podem ser ferramentas válidas na investigação da potencial fisiopatologia molecular que diferencia desfechos específicos em pacientes com CMDNI. Aqui, tais técnicas permitiram caracterizar as assinaturas proteômica e metabolômica de plasma de pacientes com IC avançada secundária às etiologias chagásica e idiopática.

Os perfis identificados permitiram distinguir entre pacientes com IC avançada e indivíduos controle, independentemente da causa subjacente, além de sugerir que a regulação

diferencial de proteínas e o comprometimento metabólico associados à IC avançada sejam distintos entre as populações de CCC e CDI, especialmente em termos de resposta inflamatória, transporte de colesterol e metabolismo de aminoácidos.

8. TRABALHOS PUBLICADOS

MARTINS, B.A.A.; **DE OLIVEIRA, R.M.**; MARTINS, M.M.; DE OLIVEIRA, P.G.; MARTINS, A.M.A. Identification of potential urinary protein biomarkers in colorectal cancer: a pilot study using a proteomic approach. **Journal of Coloproctology**, v. 43, n. 3, p. e171–e178, 2023 (ANEXO B).

MOURA, A.A.; BEZERRA, M.J.B.; MARTINS, A.M.A.; BORGES, D.P.; OLIVEIRA, R.T.G.; **DE OLIVEIRA, R.M.**; FARIAS, K.M.; VIANA, A.G.; CARVALHO, G.G.C.; PAIER, C.R.K.; DE SOUSA, M.V.; FONTES, W.; RICART, C.A.O.; MORAES, M.E.A.; MAGALHÃES, S.M.M.; FURTADO, C.L.M.; MORAES-FILHO, M.O.; PESSOA, C.; PINHEIRO, R.F. Global proteomics analysis of bone marrow: establishing talin-1 and centrosomal protein of 55 kDa as potential molecular signatures for myelodysplastic syndromes. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 833068, 2022 (ANEXO C).

CORONADO, B.N.L.; DA CUNHA, F.B.S; **DE OLIVEIRA, R.M.**; NÓBREGA, O.T.; RICART, C.A.O.; FONTES, W.; DE SOUSA, M.V.; DE ÁVILA, M.P.; MARTINS, A.M.A. Novel possible protein targets in neovascular age-related macular degeneration: a pilot study experiment. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 692272, 2022 (ANEXO D).

MARTINS, A.M.A.; PAIVA, M.U.B.; PAIVA, D.V.N.; **DE OLIVEIRA, R.M.**; MACHADO, H.L.; ALVES, L.J.S.R.; PICOSSI, C.R.C.; FACCIO, A.T.; TAVARES, M.F.M.; BARBAS, C.; GIRALDEZ, V.Z.R.; SANTOS, R.D.; MONTE, G.U.; ATIK, F.A. Innovative approaches to assess intermediate cardiovascular risk subjects: a review from clinical to metabolomics strategies. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. 788062, 2021 (ANEXO E).

9. REFERÊNCIAS

ABABIO, Y. et al. Prevalence and clinical burden of idiopathic dilated cardiomyopathy in the United States. **American Journal of Medicine Open**, v. 10, p. 100038, dez. 2023.

ABEL, L. C. J. et al. Chronic chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, v. 17, n. 1, p. 99–107, 2001.

AIMO, A. et al. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: from pathophysiology to therapeutic strategies. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 27, n. 5, p. 494–510, 2020.

AKHMEDOV, A. T.; RYBIN, V.; MARÍN-GARCÍA, J. Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart. **Heart Failure Reviews**, v. 20, n. 2, p. 227–49, 2015.

ALBUQUERQUE, D. C. DE et al. I Registro brasileiro de insuficiência cardíaca – aspectos clínicos, qualidade assistencial e desfechos hospitalares. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 104, n. 6, p. 433–42, 2015.

ALLARD, M. F. et al. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 267, n. 2, p. H742–H750, 1994.

ANDRADE, J. P. et al. I Diretriz latino-americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica [I Latin american guidelines for the diagnosis and treatment of chagas cardiomyopathy]. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 97, n. 2 supl.3, p. 1–48, 2011.

ANGHEBEN, A. et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. **Blood Transfusion**, v. 13, n. 4, p. 540–550, out. 2015.

AQUILANI, R. et al. Plasma amino acid abnormalities in chronic heart failure: mechanisms, potential risks and targets in human myocardium metabolism. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1251, 2017.

ARBELO, E. et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. **European Heart Journal**, v. 00, p. 1–124, 2023.

AYYAPPAN, J. P.; NAGAJYOTHI, J. F. Diet modulates adipose tissue oxidative stress in a murine acute chagas model. **JSM Atherosclerosis**, v. 2, n. 3, p. 1030, 2017.

AZEVEDO, P. S. et al. Remodelação cardíaca: conceitos, impacto clínico, mecanismos fisiopatológicos e tratamento farmacológico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, n. 1, p. 62–69, 2016.

BACAL, F. et al. III Diretriz brasileira de transplante cardíaco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 2, p. 230–289, 2018.

BALOG, J. et al. Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 194, p. 194ra93, 2013.

BARBOSA, A. P. et al. Comparison of outcome between chagas cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 97, n. 6, p. 517–525, 2011.

BARRETO, F. C. et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, n. 10, p. 1551–1558, 2009.

BEHZADNIA, N. et al. Evaluation of cardiomyopathy diagnosis in heart transplant recipients: comparison of echocardiographic and pathologic classification. **The Egyptian Heart Journal**, v. 73, n. 1, p. 29, 2021.

BERTOLINO, N. D. et al. Prognostic impact of chagas' disease in patients awaiting heart transplantation. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 29, n. 4, p. 449–453, 2010.

BESTETTI, R. B. et al. Noninvasive predictors of mortality for patients with chagas' heart disease: a multivariate stepwise logistic regression study. **Cardiology**, v. 84, n. 4–5, p. 261–267, 1994.

BESTETTI, R. B.; DANIEL, R. A. F. The treatment of chronic heart failure secondary to chagas cardiomyopathy in the contemporary era. **International Cardiovascular Forum Journal**, v. 7, p. 19–25, 24 jul. 2016.

BESTETTI, R. B.; MUCCILLO, G. Clinical course of chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, v. 60, n. 2, p. 187–193, 1997.

BESTETTI, R. B.; THEODOROPOULOS, T. A. D. A systematic review of studies on heart transplantation for patients with end-stage chagas' heart disease. **Journal of Cardiac Failure**, v. 15, n. 3, p. 249–255, 2009.

BOCCHI, E. A.; FIORELLI, A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by trypanosoma cruzi. First guidelines group for heart transplantation of the Brazilian Society of Cardiology. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 71, n. 6, p. 1833–1838, 2001.

BORNSTEIN, A. B.; RAO, S. S.; MARWAHA, K. Left Ventricular Hypertrophy. In: **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL)**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2021.

BOZKURT, B. et al. Current diagnostic and treatment strategies for specific dilated cardiomyopathies: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 134, n. 23, p. e579–e646, 6 dez. 2016.

BRAGA, J. C. V. et al. Clinical and therapeutics aspects of heart failure due to Chagas

disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 86, n. 4, p. 297–302, 2006.

BROCH, K. et al. Contemporary outcome in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **The American Journal of Cardiology**, v. 116, n. 6, p. 952–959, 2015.

CAMINHA, M. A. et al. Trypanosoma cruzi immunoproteome: calpain-like CAP5.5 differentially detected throughout distinct stages of human chagas disease cardiomyopathy. **Journal of Proteomics**, v. 194, p. 179–190, 2019.

CAO, T. H. et al. Plasma proteomic approach in patients with heart failure: insights into pathogenesis of disease progression and potential novel treatment targets. **European journal of heart failure**, v. 22, n. 1, p. 70–80, 2020.

CARDINALLI-NETO, A. et al. Predictors of all-cause mortality for patients with chronic chagas' heart disease receiving implantable cardioverter defibrillator therapy. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 18, n. 12, p. 1236–1240, 2007.

CARDOSO, J. et al. Chagas' cardiomyopathy: prognosis in clinical and hemodynamic profile C. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 4, p. 518–523, 2010a.

CARDOSO, J. et al. Cardiomiopatia chagásica: prognóstico no perfil clínico-hemodinâmico C. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 4, p. 518–523, 2010b.

CARLIER, Y. et al. Congenital chagas disease: an update. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 363–368, 2015.

CARLOS PINTO DIAS, J. et al. II Consenso brasileiro em doença de chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 7–86, 2016.

CARUBELLI, V. et al. Amino acids and derivatives, a new treatment of chronic heart failure? **Heart Failure Reviews**, v. 20, n. 1, p. 39–51, 2015.

CERBÁN, F. M. et al. Signaling pathways that regulate Trypanosoma cruzi infection and immune response. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, p. 165707, 2020.

CHENG, M.-L. et al. Metabolic disturbances identified in plasma are associated with outcomes in patients with heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 15, p. 1509–1520, 2015.

CHISTIAKOV, D. et al. Thrombospondins: a role in cardiovascular disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1540, 2017.

CHONG, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W486–W494, jul. 2018.

CHOUDHURY, R. et al. Viime: visualization and integration of metabolomics experiments. **Journal of Open Source Software**, v. 5, n. 54, p. 2410, 18 out. 2020.

CLELAND, J. G. F. et al. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 15, p. 1539–1549, 2005.

CLEMENTS, R. S.; DEJESUS, P. V; WINEGRAD, A. I. Raised plasma-myoinositol levels in uraemia and experimental neuropathy. **Lancet**, v. 1, n. 7813, p. 1137–1141, 1973.

CODD, M. B. et al. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. **Circulation**, v. 80, n. 3, p. 564–572, 1989.

COLAS, R. A. et al. Trypanosoma cruzi produces the specialized proresolving mediators resolvin D1, resolvin D5, and resolvin E2. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 4, p. e00688-17, 2018.

COLVIN, M. et al. OPTN/SRTR 2020 Annual data report: heart. **American Journal of Transplantation**, v. 22, n. S2, p. 350–437, 2022.

COMBS, T. P. et al. The adipocyte as an important target cell for Trypanosoma cruzi infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 24085–24094, 2005.

COSTANZO, M. R. The cardiorenal syndrome in heart failure. **Heart Failure Clinics**, v. 16, n. 1, p. 81–97, 2020.

COUGHLIN, S. S.; LABENBERG, J. R.; TEFFT, M. C. Black-white differences in idiopathic dilated cardiomyopathy: the Washington DC dilated cardiomyopathy study. **Epidemiology**, v. 4, n. 2, p. 165–172, 1993.

CUI, Y. et al. Dysfunctional network and mutation genes of hypertrophic cardiomyopathy. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2022, n. 4, p. 8680178, 28 jan. 2022.

CUNHA-NETO, E. et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in chagas' disease cardiomyopathy. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 2, p. 305–313, 2005.

DABARIAN, A. L. et al. Dysregulation of insulin levels in chagas heart disease is associated with altered adipocytokine levels. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 97, n. 2, p. 140–145, fev. 2019.

DADSON, K.; HAUCK, L.; BILLIA, F. Molecular mechanisms in cardiomyopathy. **Clinical Science**, v. 131, n. 13, p. 1375–1392, 2017.

DANIELS, L. B. et al. How obesity affects the cut-points for B-type natriuretic peptide in the diagnosis of acute heart failure. **American Heart Journal**, v. 151, n. 5, p. 999–1005, 2006.

DEAN, D. A. et al. Spatial metabolomics identifies localized chemical changes in heart

tissue during chronic cardiac chagas disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 10, p. e0009819, 2021.

DEIDDA, M. et al. Metabolomic approach to profile functional and metabolic changes in heart failure. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 297, 2015.

DESSÌ-FULGHERI, P.; SARZANI, R.; RAPPELLI, A. Role of the natriuretic peptide system in lipogenesis/lipolysis. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 13, n. 4, p. 244–249, 2003.

DIEZ, J.; IGLESIAS, P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. **European Journal of Endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 293–300, 2003.

DRIGO, S. A. et al. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe chagas' disease cardiomyopathy patients. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 3, p. 598–603, 2006.

EBERLIN, L. S. et al. Classifying human brain tumors by lipid imaging with mass spectrometry. **Cancer Research**, v. 72, n. 3, p. 645–654, 2012.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American trypanosomiasis (chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 119–134, 2019.

ELLIOTT, P. et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. **European Heart Journal**, v. 29, n. 2, p. 270–276, 2007.

FALCHETTO, E. B.; COSTA, S. C. S.; ROCHITTE, C. E. Diagnostic challenges of chagas cardiomyopathy and CMR imaging. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 181–187, 2015.

FALCONI, C. A. et al. Uremic toxins: an alarming danger concerning the cardiovascular system. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 686249, 14 maio 2021.

FALLARINO, F. et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. **Cell Death & Differentiation**, v. 9, n. 10, p. 1069–1077, 2002.

FELKER, G. M. et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 15, p. 1077–1084, 2000.

FENN, J. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.

FERREIRA, R. C. et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and chagas disease cardiomyopathy patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 407–412, 2003.

FIEHN, O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: combined

targeted and untargeted profiling. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 114, n. 1, p. 30.4.1-30.4.32, 2016.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265–271, set. 2000.

FREITAS, H. F. G. et al. Risk stratification in a brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 102, n. 2, p. 239–247, 2005.

FRUMENTO, G. et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 4, p. 459–468, 2002.

GIRONÈS, N. et al. Global metabolomic profiling of acute myocarditis caused by trypanosoma cruzi infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, p. e3337, 2014.

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003.

GONÇALVES, J. G. F. et al. Mortality indicators among chronic chagas patients living in an endemic area. **International Journal of Cardiology**, v. 143, n. 3, p. 235–242, 2010.

GROOM, Z. C.; PROTOPAPAS, A. D.; ZOCHIOS, V. Tropical diseases of the myocardium: a review. **International Journal of General Medicine**, v. 10, p. 101–111, 2017.

GRUPO DE ESPECIALISTAS EM BIOMARCADORES. Biomarcadores em cardiologia – parte 1 – na insuficiência cardíaca e nas cardiomiopatias específicas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 103, n. 6, p. 451–459, 2014.

HAAS, J. et al. Energy metabolites as biomarkers in ischemic and dilated cardiomyopathy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1999, 2021.

HAGE, C. et al. Metabolomic profile in HFpEF vs HFrEF patients. **Journal of Cardiac Failure**, v. 26, n. 12, p. 1050–1059, 2020.

HAMMERSLEY, D. J.; HALLIDAY, B. P. Sudden cardiac death prediction in non-ischemic dilated cardiomyopathy: a multiparametric and dynamic approach. **Current Cardiology Reports**, v. 22, n. 9, p. 85, set. 2020.

HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEILL, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, n. 2, p. 345, 2001.

HARTMANN, C. et al. Non-hemodynamic effects of catecholamines. **Shock**, v. 48, n. 4, p. 390–400, 2017.

HARZHEIM, D. et al. Increased InsP3Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca²⁺ transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 27, p. 11406–11411, 2009.

HELMS, C.; KIM-SHAPIRO, D. B. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 61, p. 464–472, ago. 2013.

HENNIG, K. et al. Metabolomics, lipidomics and proteomics profiling of myoblasts infected with *Trypanosoma cruzi* after treatment with different drugs against chagas disease. **Metabolomics**, v. 15, n. 9, p. 117, 2019.

HERMAN, D. S. et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 7, p. 619–628, 2012.

HERSHBERGER, R. E.; HEDGES, D. J.; MORALES, A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. **Nature Reviews Cardiology**, v. 10, n. 9, p. 531–547, 2013.

HOGENHUIS, J. et al. Anaemia and renal dysfunction are independently associated with BNP and NT-proBNP levels in patients with heart failure. **European Journal of Heart Failure**, v. 9, n. 8, p. 787–794, 2007.

HOTEZ, P. J. et al. An unfolding tragedy of chagas disease in North America. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2300, 2013.

HU, Q. et al. Increased Drp1 acetylation by lipid overload induces cardiomyocyte death and heart dysfunction. **Circulation Research**, v. 126, n. 4, p. 456–470, fev. 2020.

HUNT, S. A. et al. 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 15, p. e1–e90, 2009.

IDE, T. et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. **Circulation Research**, v. 85, n. 4, p. 357–363, 1999.

IMANAKA-YOSHIDA, K. Tenascin-C in cardiovascular tissue remodeling: from development to inflammation and repair. **Circulation Journal**, v. 76, n. 11, p. 2513–2520, 2012.

IMANAKA-YOSHIDA, K.; HIROE, M.; YOSHIDA, T. Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. **Histology and Histopathology**, v. 19, n. 2, p. 517–25, abr. 2004.

IMANAKA-YOSHIDA, K.; TAWARA, I.; YOSHIDA, T. Tenascin-C in cardiac disease: a sophisticated controller of inflammation, repair, and fibrosis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 319, n. 5, p. C781–C796, 2020.

Ji, A.-R. et al. Reactive oxygen species enhance differentiation of human embryonic stem cells into mesendodermal lineage. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 42, n. 3, p. 175, 2010.

JOHNDROW, C. et al. Trypanosoma cruzi infection results in an increase in intracellular cholesterol. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 4, p. 337–344, 2014.

JOURDAIN, M. et al. Effects of inter- α -inhibitor in experimental endotoxic shock and disseminated intravascular coagulation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 6, p. 1825–1833, 1997.

KARWI, Q. G. et al. Loss of metabolic flexibility in the failing heart. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 5, p. 68, 2018.

KINNAMON, D. D. et al. Toward genetics-driven early intervention in dilated cardiomyopathy. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 10, n. 6, p. 1–9, 2017.

KOLDITZ, C.-I.; LANGIN, D. Adipose tissue lipolysis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 13, n. 4, p. 377–381, 2010.

KRYSZTOFIK, H. et al. Cardiac cachexia: a well-known but challenging complication of heart failure. **Clinical Interventions in Aging**, v. 15, p. 2041–2051, nov. 2020.

KUHN, M. et al. STITCH 2: an interaction network database for small molecules and proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl_1, p. D552–D556, jan. 2010.

KWON, S. H. et al. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, n. 6, p. 615–21, jun. 2003.

LAI, L. et al. Energy metabolic reprogramming in the hypertrophied and early stage failing heart. **Circulation: Heart Failure**, v. 7, n. 6, p. 1022–1031, 2014.

LAU, W. L.; VAZIRI, N. D. Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back. **Clinical Science**, v. 131, n. 1, p. 3–12, jan. 2017.

LI, M. et al. Core functional nodes and sex-specific pathways in human ischaemic and dilated cardiomyopathy. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2843, dez. 2020.

LIN, C.-J. et al. Serum protein-bound uraemic toxins and clinical outcomes in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 11, p. 3693–3700, 2010.

LIZARDO, K. et al. Diet regulates liver autophagy differentially in murine acute Trypanosoma cruzi infection. **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 711–723, 2017.

LIZARDO, K. et al. Diet alters serum metabolomic profiling in the mouse model of chronic chagas cardiomyopathy. **Disease Markers**, v. 2019, p. 4956016, 2019.

LIZARDO, K. et al. Fat tissue regulates the pathogenesis and severity of cardiomyopathy in murine chagas disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. e0008964, 7 abr. 2021.

LOPASCHUK, G. D. et al. Cardiac energy metabolism in heart failure. **Circulation Research**, v. 128, n. 10, p. 1487–1513, maio 2021.

LÓPEZ, J. R. et al. Dysfunction of diastolic $[Ca^{2+}]$ in cardiomyocytes isolated from chagasic patients. **Revista Espanola de Cardiologia**, v. 64, n. 6, p. 456–62, 2011.

MACHADO, S. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.

MADY, C. et al. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to chagas' cardiomyopathy. **Circulation**, v. 90, n. 6, p. 3098–3102, 1994.

MAGARAKIS, M. et al. Cardiac surgery for chagas disease. **Journal of Cardiac Surgery**, v. 33, n. 10, p. 597–602, 2018.

MANGINI, S. et al. Transplante cardíaco: revisão. **Einstein**, v. 13, n. 2, p. 310–318, 2015.

MARAÑÓN, C. et al. Benznidazole treatment reduces the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzymatic activity in chagas disease symptomatic patients. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 5–6, p. 180–187, 2013.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 2007.

MARTINELLI FILHO, M. et al. Terapia de ressincronização cardíaca na cardiomiopatia chagásica crônica: boa resposta clínica e pior prognóstico. **Relampa**, v. 26, n. 1, p. 33–38, 2013.

MASTRANGELO, A. et al. From sample treatment to biomarker discovery: a tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 900, p. 21–35, 2015.

MCCALL, L.-I. et al. Mass spectrometry-based chemical cartography of a cardiac parasitic infection. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 19, p. 10414–10421, out. 2017.

MCCULLOUGH, P. A. et al. B-type natriuretic peptide and renal function in the diagnosis of heart failure: an analysis from the Breathing Not Properly Multinational Study. **American Journal of Kidney Diseases: the Official Journal of the National Kidney Foundation**, v. 41, n. 3, p. 571–579, 2003.

MIJARES, A. et al. Increases in $[IP3]_i$ aggravates diastolic $[Ca^{2+}]_i$ and contractile dysfunction in chagas' human cardiomyocytes. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4,

p. e0008162, 10 abr. 2020.

MILLERIOUX, Y. et al. The threonine degradation pathway of the *Trypanosoma brucei* procyclic form: the main carbon source for lipid biosynthesis is under metabolic control. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 114–129, 2013.

MIURA, K. et al. Epidemiology of idiopathic cardiomyopathy in Japan: results from a nationwide survey. **Heart**, v. 87, n. 2, p. 126–30, fev. 2002.

MOCELIN, A. O. et al. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. **European Journal of Heart Failure**, v. 7, n. 5, p. 869–873, 2005.

MOSS, A. J. et al. Cardiac-resynchronization therapy for the prevention of heart-failure events. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 14, p. 1329–1338, 2009.

MULKAREDDY, V. et al. Dietary nitrate's effects on exercise performance in heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 4, p. 735–740, 2019.

MUNN, D. H. et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and energy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 633–642, 2005.

MURASHIGE, D. et al. Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart. **Science**, v. 370, n. 6514, p. 364–368, out. 2020.

NAGAJYOTHI, F. et al. Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl 1, p. 219–225, 2009.

NAGAJYOTHI, F. et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 2, p. e953, 2011.

NAGAJYOTHI, F. et al. Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 5, p. 830–840, 2012.

NAGAJYOTHI, F. et al. High fat diet modulates *Trypanosoma cruzi* infection associated myocarditis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3118, 2014.

NEW YORK HEART ASSOCIATION. CRITERIA COMMITTEE. **Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels**. 9th Editio ed. [s.l.] Little, Brown & Co, 1994.

ØIE, E. et al. Fatty acid composition in chronic heart failure: low circulating levels of eicosatetraenoic acid and high levels of vaccenic acid are associated with disease severity and

mortality. **Journal of Internal Medicine**, v. 270, n. 3, p. 263–272, 2011.

OWAN, T. E. et al. Secular trends in renal dysfunction and outcomes in hospitalized heart failure patients. **Journal of Cardiac Failure**, v. 12, n. 4, p. 257–262, 2006.

PASINI, E. et al. Pathogenic gut flora in patients with chronic heart failure. **JACC: Heart Failure**, v. 4, n. 3, p. 220–227, 2016.

PAULUS, W. J.; TSCHÖPE, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 4, p. 263–271, 2013.

PETRETTA, M. et al. Review and metaanalysis of the frequency of familial dilated cardiomyopathy. **The American Journal of Cardiology**, v. 108, n. 8, p. 1171–1176, 2011.

PETTI, M. A. et al. Predictors of heart failure in chronic chagasic cardiomyopathy with asymptomatic left ventricular dysfunction. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 61, n. 2, p. 116–122, 2008.

PINTO, Y. M. et al. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. **European Heart Journal**, v. 37, n. 23, p. 1850–1858, jun. 2016.

PREEDY, M. E. J.; BALIGA, R. S.; HOBBS, A. J. Multiplicity of nitric oxide and natriuretic peptide signaling in heart failure. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 75, n. 5, p. 370–384, 2020.

QIN, F. et al. Cardiac-specific overexpression of catalase identifies hydrogen peroxide-dependent and -independent phases of myocardial remodeling and prevents the progression to overt heart failure in *Gαq*-overexpressing transgenic mice. **Circulation: Heart Failure**, v. 3, n. 2, p. 306–313, 2010.

RAMACCINI, D. et al. Mitochondrial function and dysfunction in dilated cardiomyopathy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 624216, 12 jan. 2021.

RAMÍREZ-TOLOZA, G. et al. The interactions of parasite calreticulin with initial complement components: consequences in immunity and virulence. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1561, 23 jul. 2020.

RANDLE, P. J. et al. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **The Lancet**, v. 281, n. 7285, p. 785–789, 1963.

RASSI, A. et al. Development and validation of a risk score for predicting death in chagas' heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 8, p. 799–808, 24 ago.

2006.

RASSI, S. et al. Sobrevida e fatores prognósticos na insuficiência cardíaca sistólica com início recente dos sintomas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 4, p. 309–313, 2005.

REDFIELD, M. M. et al. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 5, p. 976–982, 2002.

REICHART, D. et al. Dilated cardiomyopathy: from epidemiologic to genetic phenotypes. **Journal of Internal Medicine**, v. 286, n. 4, p. 362–372, 29 out. 2019.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Prevalence of chagas disease in latin-american migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–16, 2015.

ROBERTS, E. et al. The diagnostic accuracy of the natriuretic peptides in heart failure: systematic review and diagnostic meta-analysis in the acute care setting. **BMJ**, v. 350, p. h910, 4 mar. 2015.

ROHDE, L. E. P. et al. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 3, p. 436–539, 2018.

RONCO, C.; CICOIRA, M.; MCCULLOUGH, P. A. Cardiorenal syndrome type 1. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, n. 12, p. 1031–1042, 2012.

ROSCOE, A. et al. Chagas cardiomyopathy: a comprehensive perioperative review. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 32, n. 6, p. 2780–2788, 2018.

SABRI, A.; HUGHIE, H. H.; LUCCHESI, P. A. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 6, p. 731–740, 2003.

SALEEM, T. H. et al. Plasma amino acid metabolomic pattern in heart failure patients with either preserved or reduced ejection fraction: the relation to established risk variables and prognosis. **Biomedical Chromatography**, v. 35, n. 7, p. e5012, jul. 2021.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de chagas aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 2, p. 1–10, 2019.

SEGER, C.; SALZMANN, L. After another decade: LC–MS/MS became routine in clinical diagnostics. **Clinical Biochemistry**, v. 82, p. 2–11, 2020.

SEGURO, L. F. et al. Profile of heart transplant recipients in a brazilian center: comparison with international registry. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 33, n. 4, p. S264, 2014.

SENGENÈS, C. et al. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 10, p. 1345–1351, 2000.

SHARMA, S. et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 14, p. 1692–1700, 2004.

SHEN, L. et al. Contemporary characteristics and outcomes in chagasic heart failure compared with other nonischemic and ischemic cardiomyopathy. **Circulation: Heart Failure**, v. 10, n. 11, p. 1–9, nov. 2017.

SILVA, C. P. et al. Why do patients with chagasic cardiomyopathy have worse outcomes than those with non-chagasic cardiomyopathy? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 6, p. 358–362, 2008.

SMITH, A.; MCCULLOH, R. J. Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 187, 30 jun. 2015.

SPINALE, F. G. et al. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure. **Circulation Research**, v. 82, n. 4, p. 482–495, 1998.

ST JOHN, E. R. et al. Rapid evaporative ionisation mass spectrometry of electrosurgical vapours for the identification of breast pathology: towards an intelligent knife for breast cancer surgery. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 59, 2017.

STARLING, R. C.; HAMMER, D. F.; ALTSCHULD, R. A. Human myocardial ATP content and in vivo contractile function. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 180, n. 1–2, p. 171–177, mar. 1998.

STRASEN, J. et al. Epidemiology of chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. **Clinical Research in Cardiology: Official Journal of the German Cardiac Society**, v. 103, n. 1, p. 1–10, 2014.

SUN, H. et al. Catabolic defect of branched-chain amino acids promotes heart failure. **Circulation**, v. 133, n. 21, p. 2038–2049, 2016.

TABUCANON, T.; TANG, W. H. W. Right heart failure and cardiorenal syndrome. **Cardiology Clinics**, v. 38, n. 2, p. 185–202, 2020.

TEIXEIRA, P. C. et al. Impairment of multiple mitochondrial energy metabolism pathways in the heart of chagas disease cardiomyopathy patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 755782, 12 nov. 2021.

TERNESS, P. et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 4, p. 447–457, 2002.

TSUTAMOTO, T. et al. Relationship between renal function and plasma brain natriuretic peptide in patients with heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 3, p. 582–586, 2006.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 6, p. H2181–H2190, 2011.

VALERO-MUÑOZ, M. et al. Proteomic and phosphoproteomic profiling in heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 9, p. 966968, 2022.

VIEIRA, J. L. et al. Chagas cardiomyopathy in Latin America review. **Current Cardiology Reports**, v. 21, n. 2, p. 8, 2019.

VILAS BOAS, L. G. C. et al. Outcome of chagas cardiomyopathy in comparison to ischemic cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, v. 167, n. 2, p. 486–490, 2013.

VOLPE, M.; CARNOVALI, M.; MASTROMARINO, V. The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment. **Clinical Science**, v. 130, n. 2, p. 57–77, 2015.

WANG, C.-H.; CHENG, M.-L.; LIU, M.-H. Simplified plasma essential amino acid-based profiling provides metabolic information and prognostic value additive to traditional risk factors in heart failure. **Amino Acids**, v. 50, n. 12, p. 1739–1748, 2018.

WANG, J. et al. Metabolomic identification of diagnostic plasma biomarkers in humans with chronic heart failure. **Molecular Biosystems**, v. 9, n. 11, p. 2618–2626, 2013.

WISNESKI, J. A. et al. Effects of acute hyperglycemia on myocardial glycolytic activity in humans. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 5, p. 1648–56, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates** *Weekly epidemiological record*. [s.l.: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: [s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **What is Chagas disease?** Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/disease/en/>>. Acesso em: 1 fev. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1>. Acesso em: 8 abr. 2022.

WU, S. et al. Dysfunctional network of hub genes in hypertrophic cardiomyopathy patients. **American Journal of Translational Research**, v. 14, n. 12, p. 8918–8933, 2022.

XAVIER, S. S.; SOUSA, A. S.; HASSLOCHER-MORENO, A. Aplicação da nova classificação da insuficiência cardíaca (ACC/AHA) na cardiopatia chagásica crônica: análise crítica das curvas de sobrevida. **Revista da SOCERJ**, v. 18, n. 3, p. 227–232, 2005.

YAMAMOTO, T.; SANO, M. Deranged myocardial fatty acid metabolism in heart failure. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 996, 2022.

YANG, S. et al. Administration of human inter-alpha-inhibitors maintains hemodynamic stability and improves survival during sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 3, p. 617–22, mar. 2002.

YU, Y. et al. Serum free fatty acids independently predict adverse outcomes in acute heart failure patients. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. 761537, 22 dez. 2021.

ZAGO, M. P. et al. Potential utility of protein targets of cysteine-S-nitrosylation in identifying clinical disease status in human chagas disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 3320, 2019.

ZHANG, J. et al. Will ambient ionization mass spectrometry become an integral technology in the operating room of the future? **Clinical Chemistry**, v. 62, n. 9, p. 1172–1174, 2016.

ZHANG, J. et al. Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 406, p. eaan3968, 2017.

ZHAO, H. et al. Quantitative metabolomics reveals heart failure with midrange ejection fraction as a distinct phenotype of heart failure. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 37, n. 2, p. 300–309, 2021.

ZHAO, J. et al. Plasma metabolomic profiles differentiate patients with dilated cardiomyopathy and ischemic cardiomyopathy. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 7, p. 597546, 2020.

ZHOU, B.; TIAN, R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 9, p. 3716–3726, 2018.

ZHOU, Y. et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1523, 2019.

ZHUO, L.; HASCALL, V. C.; KIMATA, K. Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38079–38082, 2004.

ZIMA, A. V; BLATTER, L. A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. **Cardiovascular research**, v. 71, n. 2, p. 310–21, 15 jul. 2006.

ZORNOFF, L. A. M. et al. Remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio: conceitos e implicações clínicas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, n. 2, p. 157–164, 2009.

10. APÊNDICES

APÊNDICE A – Proteínas identificadas na análise label-free por LC-MS/MS

Accession	Gene Symbol	Description	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down
			IC x CTRL	CTRL	CCC x CTRL	CTRL	CDI x CTRL	CTRL	CCC x CDI x CTRL	CTRL	CCC x CDI	CTRL
A0A024R3E3	APOA1	Epididymis secretory sperm binding protein	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
A0A087WXI2	FCGBP	Fc γ binding protein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
A0A096LPE2	SAA2-SAA4	SAA2-SAA4 readthrough	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
A0A0A0MRQ5	PRDX1	Peroxiredoxin 1	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
A0A0A0MSV6	C1QB	Complement C1q B chain (Fragment)	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
A0A0S2Z3D5	APOE	Apolipoprotein E isoform 1 (Fragment)	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
A0A140TA29	C4B	Complement C4-B	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
A0A1B1CYC5	Gc	Vitamin D binding protein (Fragment)	IC	CTRL	CCC	CTRL	CTRL	CDI	CCC	CDI	CCC	CDI
A0A384MDQ7	A0A384MDQ7	Epididymis secretory sperm binding protein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
A0A384N669	LUM	Epididymis secretory sperm binding protein	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
A0A3B0J0F2	ADID	Adiponectin D	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
A0A3B3ISJ1	PROS1	Protein S	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
A0A5F9ZH15	BTD	Biotinidase (Fragment)	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
A0A7H0TJC6	A0A7H0TJC6	Heparin cofactor II splice isoform	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
A0A7P0Z441	AGT	Angiotensinogen	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
A0A8Q3SI37	A0A8Q3SI37	Complement C9	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
A0A8Q3SI77	A0A8Q3SI77	C1q domain-containing protein (Fragment)	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
A0A8Q3SID8	A0A8Q3SID8	Complement factor H	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
A0A8Q3SIZ0	A0A8Q3SIZ0	Complement C1q C chain	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
A0A8Q3WKT7	A0A8Q3WKT7	Complement C8 alpha chain	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
A0A8Q3WL25	A0A8Q3WL25	Coagulation factor XII	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
A0A8Q3WM97	A0A8Q3WM97	Complement C8 β chain	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
A0N071	HBD	Delta globin	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC

A5PL27	CP	CP protein	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
A6XGL1	A6XGL1	Transthyretin	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
A8K5J8	A8K5J8	cDNA, FLJ75066, highly similar to Homo sapiens complement component 1, r subcomponent (C1R), mRNA	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
A8K7G6	REG1A	cDNA, FLJ75763, highly similar to Homo sapiens regenerating islet-derived 1 alpha (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein) (REG1A), mRNA	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
B2R6W1	B2R6W1	cDNA, FLJ93143, highly similar to Homo sapiens complement component 7 (C7), mRNA	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
B2R7F8	B2R7F8	Plasminogen	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
B2R8I2	B2R8I2	cDNA, FLJ93914, highly similar to Homo sapiens histidine-rich glycoprotein (HRG), mRNA	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
B2RBS8	B2RBS8	cDNA, FLJ95666, highly similar to Homo sapiens albumin (ALB), mRNA	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
B3KS79	B3KS79	cDNA, FLJ35730 fis, clone TEST2003131, highly similar to ALPHA-1-ANTICHYMOTRYPSIN	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
B4DF70	B4DF70	cDNA, FLJ60461, highly similar to Peroxiredoxin-2	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
B4DMX2	KLKB1	cDNA, FLJ51250, highly similar to Plasma kallikrein	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
B4DPN0	B4DPN0	β -2-glycoprotein 1	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
B4DVQ0	B4DVQ0	cDNA, FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2	CTRL	IC	CTRL	CCC	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI	CCC
B4E1C2	KNG1	Kininogen 1, isoform CRA_b	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
B4E1I8	B4E1I8	cDNA, FLJ54228, highly similar to Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
B4E1Z4	B4E1Z4	Complement C2	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
B7Z8Q5	B7Z8Q5	cDNA, FLJ56762, highly similar to Hyaluronan-binding protein 2	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
B7ZKJ8	ITIH4	ITIH4 protein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
C0JYY2	APOB	Apolipoprotein B (Including Ag(X) antigen)	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
C0JYZ2	TTN	Titin	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
C8CHS3	ECM1	Truncated extracellular matrix protein 1	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
C9J6H2	IGFBP1	Insulin-like growth factor-binding protein 1	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
C9JC84	FGG	Fibrinogen γ chain	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
D3JV41	D3JV41	C-X-C motif chemokine (Fragment)	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
D6RF35	GC	Vitamin D-binding protein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
D9YZU5	HBB	β -globin	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC

D9ZGG2	VTN	Vitronectin	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
E1A689	E1A689	Mutant Apo B 100	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
E7ET33	ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
E9PHK0	CLEC3B	C-type lectin domain family 3 member B	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
F5H7V9	TNC	Tenascin C	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
G3XAM2	CFI	Complement factor I	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
O75636	FCN3	Ficolin-3	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
O75882	ATRN	Attractin	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
P00734	F2	Prothrombin	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P00738	HP	Haptoglobin	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P01008	SERPINC1	Antithrombin-III	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
P01023	A2M	Alpha-2-macroglobulin	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
P01024	C3	Complement C3	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P01031	C5	Complement C5	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P01877	IGHA2	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P02549	SPTA1	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
P02671	FGA	Fibrinogen alpha chain	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P02675	FGB	Fibrinogen β chain	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P02730	SLC4A1	Band 3 anion transport protein	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
P02741	CRP	C-reactive protein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P02743	APCS	Serum amyloid P-component	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P02751	FN1	Fibronectin	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P02760	AMBP	Protein AMBP	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P02765	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
P02790	HPX	Hemopexin	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
P04003	C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P04275	VWF	von Willebrand factor	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P05090	APOD	Apolipoprotein D	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
P05109	S100A8	Protein S100-A8	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC

P06396	GSN	Gelsolin	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
P06702	S100A9	Protein S100-A9	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P06727	APOA4	Apolipoprotein A-IV	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
P08697	SERPINF2	Alpha-2-antiplasmin	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P09871	C1S	Complement C1s subcomponent	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P0DJ18	SAA1	Serum amyloid A-1 protein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P0DJ19	SAA2	Serum amyloid A-2 protein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P10909	CLU	Clusterin	IC	CTRL	CCC	CTRL	CTRL	CDI	CCC	CDI	CCC	CDI
P13671	C6	Complement component C6	CTRL	IC	CCC	CTRL	CTRL	CDI	CCC	CDI	CCC	CDI
P15169	CPN1	Carboxypeptidase N catalytic chain	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P19652	ORM2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P19827	ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	IC	CTRL	CTRL	CCC	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI	CCC
P22792	CPN2	Carboxypeptidase N subunit 2	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
P23142	FBLN1	Fibulin-1	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
P25311	AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P36955	SERPINF1	Pigment epithelium-derived factor	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P43652	AFM	Afamin	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
P59665	DEFA1B; DEFA1	Neutrophil defensin 1	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
P69905	HBA1; HBA2	Hemoglobin subunit alpha	IC	CTRL	CTRL	CCC	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI	CCC
Q04756	HGFAC	Hepatocyte growth factor activator	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
Q15166	PON3	Serum paraoxonase/lactonase 3	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
Q4JLR8	HBB	Hemoglobin β chain (Fragment)	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
Q53GN8	MST1	Macrophage stimulating 1 (Hepatocyte growth factor-like) variant (Fragment)	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
Q53H26	Q53H26	Serotransferrin (Fragment)	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
Q5JVE7	F10	Coagulation factor X	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI
Q5T985	ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
Q5UGI6	SERPING1	Serine/cysteine proteinase inhibitor clade G member 1 splice variant 2 (Fragment)	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC	CDI

Q5VY30	RBP4	Retinol-binding protein	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
Q6GMX0	Q6GMX0	Ig-like domain-containing protein	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
Q6P5S8	IGK@	IGK@ protein	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
Q7Z351	DKFZp686N02209	Uncharacterized protein DKFZp686N02209	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
Q8TCF0	LBP	Lipopolysaccharide-binding protein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
Q92954	PRG4	Proteoglycan 4	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
Q96PD5	PGLYRP2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
Q9UK55	SERPINA10	Protein Z-dependent protease inhibitor	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC
V9GYG9	APOA2	Apolipoprotein A-II (Fragment)	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
V9HWD8	HEL-S-163pA	Epididymis secretory sperm binding protein Li 163pA	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CTRL	CCC	CDI
V9HWE3	HEL-S-11	Carbonic anhydrase	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CTRL	CDI	CCC
V9HWF6	HEL-S-153w	Alpha-1-acid glycoprotein	CTRL	IC	CTRL	CCC	CTRL	CDI	CTRL	CCC	CDI	CCC

APÊNDICE B – DE OLIVEIRA, R.M. et al. Metabolomic Insights in Advanced
Cardiomyopathy of Chronic Chagasic and Idiopathic Patients that Underwent Heart
Transplant. **Scientific Reports**, 2024 (aceito).

Metabolomic Insights in Advanced Cardiomyopathy of Chronic Chagasic and Idiopathic Patients that Underwent Heart Transplant

1 **Raphaella M. de Oliveira^{1,2}, Mariana U. B. Paiva¹, Carolina R. C. Picossi³, Diego V. N. Paiva¹,**
2 **Carlos A. O. Ricart², Francisco J. Ruperez³, Coral Barbas³, Fernando A. Atik^{1,4}, Aline M. A.**
3 **Martins^{1,3*}**

4 ¹School of Medicine, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

5 ²Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

6 ³Center of Excellence in Metabolomics and Bioanalysis, University of San Pablo CEU, Madrid, Spain.

7 ⁴Institute of Cardiology and Transplantation of the Federal District, Brasilia, Brazil.

8 ***Correspondence:**
9 **Corresponding Author**
10 **alin3.m4rtins@gmail.com**

11 **Abstract**

12 Heart failure (HF) studies typically focus on ischemic and idiopathic heart diseases. Chronic chagasic
13 cardiomyopathy (CCC) is a progressive degenerative inflammatory condition highly prevalent in Latin
14 America that leads to a disturbance of cardiac conduction system. Despite its clinical and
15 epidemiological importance, CCC molecular pathogenesis is poorly understood. Here we characterize
16 and discriminate the plasma metabolomic profile of 15 patients with advanced HF referred for heart
17 transplantation – 8 patients with CCC and 7 with idiopathic dilated cardiomyopathy (IDC) – using gas
18 chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Compared to the 12 heart donor
19 individuals, also included to represent the control (CTRL) scenario, patients with advanced HF
20 exhibited a metabolic imbalance with 21 discriminating metabolites, mostly indicative of accumulation
21 of fatty acids, amino acids and important components of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. CCC vs.
22 IDC analyses revealed a metabolic disparity between conditions, with 12 CCC distinctive metabolites
23 vs. 11 IDC representative metabolites. Disturbances were mainly related to amino acid metabolism
24 profile. Although mitochondrial dysfunction and loss of metabolic flexibility may be a central
25 mechanistic event in advanced HF, metabolic imbalance differs between CCC and IDC populations,
26 possibly explaining the dissimilar clinical course of Chagas' patients.

27 1 Introduction

28 Heart failure (HF) is a clinical syndrome associated with alterations in cardiac energy metabolism, such
29 as imbalanced anabolic-catabolic signaling and defects in energy production¹, and significant
30 phenotypic heterogeneity. One of the predisposing causes is non-ischemic dilated cardiomyopathy
31 (DCM), which usually starts with a long preclinical phase that, regardless of etiology, progresses to
32 hypertrophic remodeling and dilation and systolic dysfunction of the left or both ventricles². Attributed
33 to genetic or non-genetic causes, as in idiopathic dilated cardiomyopathy (IDC) or myocarditis, the
34 molecular spectrum common to DCM subtypes includes a stimulation of the sympathetic adrenergic
35 and renin-angiotensin-aldosterone (RAAS) systems and mobilization of natriuretic peptides to increase
36 vascular tone, inotropism and sodium and water retention³.

37 Among non-ischemic DCM etiologies, chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) is highly prevalent in
38 Latin America⁴. As a progressive degenerative inflammatory condition that primarily causes collagen
39 accumulation in myocardial interstitium and disturbance of cardiac conduction system⁵, cardiac
40 muscle involvement in CCC is complex. Heart remodeling occurs as a result of the synergistic effect
41 between immunological and inflammatory factors, cardiac dysautonomia and microvascular
42 disturbances⁵. A recent study also found that cardiomyocytes isolated from Chagas' patients have
43 higher levels of intracellular inositol 1,4,5 trisphosphate (IP₃), a metabolite that stimulates a
44 significantly increase in diastolic calcium ions (Ca²⁺) concentration and consequently aggravates the
45 contractile disorder⁶.

46 In this context, metabolic fingerprints have great potential to improve the understanding and molecular
47 signature of chagasic HF previously investigated by other omics⁷⁻⁹. However, most reports focus on
48 ischemic and idiopathic heart diseases, excluding patients with CCC despite their clinical and
49 epidemiological importance. Thus, the aim of our study was to characterize and discriminate possible
50 molecular mechanistic events that drives the phenotypical result of non-ischemic HF and CCC patients
51 using a metabolomics approach.

52 2 Results

53 2.1 Advanced HF vs. Control (CTRL)

54 The baseline demographic and clinical characteristics of patients with advanced HF are shown in Table
55 1. With exception of age ($p = 0.03$), diastolic blood pressure ($p = 0.042$) and heart rate ($p = 0.02$), no
56 significant differences were found between CCC and IDC patients. In multivariate statistics, the
57 analytical reproducibility was confirmed by quality control (QC) samples clustering in principal
58 component analysis (PCA) (Figure 1A). Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-
59 DA) revealed a differential metabolic profile in cardiac compromise, with $Q^2 = 0.83$ (Figure 1B) and
60 21 HF discriminating metabolites (Figure 1C). Differences in intensity and distribution of these
61 compounds were demonstrated by heatmap (Figure 1D) and box plot (Figure 1E). Most of them belong
62 to the class of fatty acids and conjugates or amino acids, peptides and analogues (Figure 2A). Their
63 interaction network indicated an interactome pathway potentially implicated in the pathophysiology of
64 advanced non-ischemic HF (Figure 2B). OPLS-DA results for each pathological scenario vs. CTRL
65 subjects are shown in Supplemental Figure 1 and the univariate findings in Supplemental Table 1.

66 2.2 CCC vs. IDC vs. CTRL

67 QC samples clustering attested the consistency of the experimental method in PCA (Figure 3A). OPLS-
68 DA identified distinct profiles for each condition, with greater distance between CCC and CTRL

69 groups, with $Q^2 = 0.85$ (Figure 3B). Variations in the relative intensity of 18 metabolites were crucial
70 in characterizing the scenarios (Figure 3C). The results of univariate analysis are shown in
71 Supplemental Table 2.

72 2.3 CCC vs. IDC

73 The method's reliability was ratified by QC samples clustering in PCA (Figure 4A). OPLS-DA revealed
74 a metabolic discrimination between the pathological conditions, with $Q^2 = 0.54$ (Figure 4B) and 12
75 CCC distinctive metabolites vs. 11 IDC representative metabolites (Figure 4C). Differences in intensity
76 and distribution of these compounds were confirmed by heatmap (Figure 4D) and box plot (Figure 4E).
77 The majority of CCC relatively intense metabolites belong to the class of carbohydrates and
78 carbohydrate conjugates, while those important for IDC characterization mostly belong to the class of
79 amino acids, peptides and analogues (Figure 2C). CCC's metabolites interaction network suggested a
80 possible pathway particularly associated with the pathophysiology of Chagas Disease (ChD)-related
81 HF (Figure 2D).

82 3 Discussion

83 3.1 Metabolite impairment in advanced HF pathophysiology

84 Although the clinical evolution of patients with ChD-related HF is worse compared to non-Chagas'
85 patients¹⁰, the molecular features that differentiate the pathogenesis and, consequently, the clinical
86 outcome of CCC and IDC have not yet been elucidated. Here, OPLS-DA results demonstrated that
87 patients with advanced HF, regardless of the cause, exhibit a global metabolic disturbance (Figure 1B)
88 with higher abundance of 21 identified metabolites (Figure 1C-E).

89 Under physiological conditions, the adult heart is metabolically flexible and generates adenosine
90 triphosphate (ATP) from several substrates, such as fatty acids (FAs), lactate, glucose, ketones and
91 amino acids (AAs), obtained continuously from the blood and directed to mitochondrial oxidative
92 phosphorylation (95%) and glycolysis (5%)¹¹⁻¹³. Up to 60% of mitochondrial ATP production results
93 from FA oxidation, however due to its greater need for oxygen and compromised mitochondrial
94 oxidative capacity, failing hearts tend to increase glucose consumption via anaerobic glycolysis as a
95 compensatory mechanism for maintaining ATP levels^{11,13-16}. Metabolic reprogramming in HF also
96 includes increased oxidation of ketone bodies and reduced oxidation of lactate, branched-chain amino
97 acids (BCAA) and glucose, impairing overall ATP production by the tricarboxylic acid (TCA) cycle
98 flux^{11,13}.

99 Indeed, the accumulation of FAs, AAs and important TCA cycle components (citric and succinic acids)
100 observed in plasma of HF patients in the present study (Figure 2A) suggests an important mitochondrial
101 dysfunction and consequent loss of metabolic flexibility, which may contribute to the known reduction
102 of up to 30% of ATP content in failing hearts^{11,13,17}. As channeled by HF's relatively intense
103 metabolites network, these two major pathways may interact along as shown in Figure 2B.

104 The effort to sustain energy demand during pathological hypertrophy leads to maladaptive circuits,
105 such as increased mitochondrial protein acetylation, which produce mitochondrial stress and eventually
106 mitochondria-initiated cell death¹⁸. From a clinical perspective, this metabolic remodeling may be
107 expressed in left ventricle (LV) hypertrophy progression, as it decreases ventricular compliance and
108 consequently increases filling pressure, in addition to constituting an arrhythmogenic substrate by
109 disorganizing tissue cytoarchitecture¹⁹. Furthermore, free FAs concentration in plasma is
110 independently associated with HF incidence and adverse outcome^{20,21}, and lipid moieties accumulation

111 due to extrapolation of mitochondrial oxidative capacity may result in lipotoxicity and lead to
112 myocardial dysfunction^{22,23}.

113 3.2 Metabolite impairment in CCC and IDC pathophysiology

114 Comparing CCC and IDC individually to CTRL samples, OPLS-DA results indicates a metabolic
115 profile disparity between the pathological settings, with greater discrimination of CCC in relation to
116 the physiological condition (Figure 3B and 3C), corroborating the clinical observations on the outcome
117 and prognosis of these patients²⁴⁻²⁶. Other omics studies have also identified differences among HF
118 etiologies. Cunha-Neto *et al.*²⁷ characterizing gene expression profiles of CCC and IDC myocardial
119 tissues, reported that several immune response, lipid metabolism and mitochondrial oxidative
120 phosphorylation genes were specifically up-regulated in CCC, with a prominence for interferon-
121 gamma (IFN- γ)-inducible genes. Teixeira *et al.*²⁸ performing a comparative proteomic study on CCC,
122 IDC and ischemic cardiomyopathy myocardial tissue samples, found that patients with CCC had the
123 lowest expression of several mitochondrial energy metabolism and FA beta-oxidation proteins, and
124 that high levels of IFN- γ in CCC cardiomyocytes reduce mitochondrial transmembrane potential.

125 The direct confrontation between CCC and IDC scenarios revealed that, although the predictive ability
126 of OPLS-DA was not as good as the other scenarios – a fact that we attribute to the HF phenotype as a
127 common outcome –, patients with a history of ChD display a distinct metabolic signature (Figure 4B-
128 E), especially in terms of carbohydrate and AA metabolism (Figure 2C). Although the selection criteria
129 applied were aimed to minimize the confounding factors, the fact that this was a real-life study did not
130 allow us to reduce the influence of other external factors, such as diet and chronic use of medication,
131 that explain the intensities of xylitol/erythritol and galacturonic acid/arabinose, respectively. Here,
132 such findings are qualitative in nature and were beyond the scope of the present study, but it is advisable
133 that these characteristics be considered in future translational studies.

134 HF hypercatabolic status is also marked by degradation of skeletal muscle proteins to measure up
135 myocardium dependence on AAs to maintain cardiac ATP levels, leading to cachexia^{29,30}. In HF
136 advanced stages, the reduction of AA levels can also be explained by the development of pathogenic
137 gut flora, reported in more than three quarters of class II to IV patients. Clinically important, this
138 intestinal impairment may alter protein metabolism by reducing intestinal absorptions of vitamin B12,
139 folic acid, and vitamin K³¹. In addition, myocardium remodeling³² and BCAA overconsumption³³
140 possibly contribute to low AA levels. Wang *et al.*³⁴ observed that essential AAs plasma levels, except
141 phenylalanine, were lower in patients that had experienced HF-related re-hospitalization or death in
142 comparison to those who did not. Therefore, considering the diverse course of CCC progression
143 compared to other HF etiologies as well, the decrease in the relative intensity of plasma AAs in patients
144 with CCC of the present study may corroborate such indication of disease severity.

145 More specifically looking at AAs that have been observed as discriminant between the pathological
146 conditions in our work, CCC patients exhibited lower levels of threonine, previously reported by
147 Hennig *et al.*³⁵. Among other metabolic changes, their fingerprinting approach revealed that threonine
148 levels of rat myoblast were completely depleted in all *T. cruzi* infected conditions, treated with different
149 anti-chagasic drugs or untreated. Similar results were found for *T. brucei procyclic* form, in which
150 threonine is the AA most rapidly metabolized by the parasite for lipid biosynthesis³⁶.

151 Recently, Saleem *et al.*³⁷ found that not only plasma levels of threonine were decreased in HF patients
152 compared to CTRL subjects, but methionine, isoleucine, serine and lysine as well. Methionine in
153 particular, was also classified as an independent and significant predictor of HF in their multivariate
154 regression analysis. In our study, these AAs were also reduced in CCC patients compared to IDC, and

155 according to Aquilani *et al.*³³ both AAs number and reduced arterial rates are related to HF severity,
156 thus corroborating the distinct outcome in ChD-related HF. Likewise, the authors also highlighted that
157 methionine levels progressively decrease as the disease worsens.

158 Tryptophan (Trp) levels also differed between the two HF etiologies in our experiments, with lower
159 intensity in CCC patients. Trp is an essential AA particularly important for proliferation of intracellular
160 pathogens, such as *T. cruzi* amastigotes during the chronic phase of ChD. Host cell dependence on Trp
161 leads to a susceptibility to Trp deprivation by indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO)-mediated
162 degradation³⁸. However, Trp starvation together with the accumulation of its active catabolite products
163 (kynurenines) can inhibit proliferation, or promote T cell anergy and death, and modulate helper T cell
164 response³⁹⁻⁴². Reinforcing this double-edged sword effect. Marañón *et al.*⁴³ revealed that IDO activity
165 is higher in patients with ChD compared to CTRL subjects and higher in those in symptomatic chronic
166 cardiac or digestive phase than in asymptomatic patients, establishing a correlation between the enzyme
167 activity status and the transition to chronic infection. They also reported that administration of
168 benznidazole, an anti-chagasic medication, decreased IDO activity in symptomatic patients. Thus, this
169 reduced intensity of Trp observed in CCC patients of our study may be a consequence of its catabolism
170 mediated by the ascending enzymatic activity of IDO.

171 An increase in CCC myo-inositol levels compared to IDC was also evident in our study. Increased
172 expression of IP₃ receptors (IP₃Rs) is a general and key mechanism in the remodeling of Ca²⁺ signaling
173 during heart disease, with an arrhythmogenic effect during ventricular hypertrophy⁴⁴. Considering that
174 inositol phosphates (IPs) are phosphorylated derivatives of myo-inositol, the increase in myo-inositol
175 levels could be part of a compensatory response to provide an alternative pathway for mobilizing
176 intracellular Ca²⁺ release in advanced stages of HF, as suggested by Deidda *et al.*⁴⁵. In compliance,
177 Mijares *et al.*⁶ showed that IP₃R activators induced a greater elevation of diastolic Ca²⁺ in Chagas'
178 cardiomyocytes compared to those of non-chagasic individuals. Furthermore, Chagas' cardiomyocytes
179 had a reduced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ loading, higher level of intracellular IP₃, and compromised
180 contractile properties as well, correlating to (New York Heart Association) NYHA classifications.

181 CCC patients also had increased levels of urea and hippuric acid compared to the IDC group (Figure
182 2C and 4C). Together with our complementary investigations on CCC relatively intense metabolites
183 interaction network (Figure 2D), these results suggest the hypothesis that the urea cycle of
184 detoxification may be unusually overloaded in ChD-related HF, thereby contributing to the severity of
185 the condition as renal dysfunction is considered an independent outcome predictor in HF⁴⁶⁻⁴⁸.
186 Although such research is beyond the planned scope of the present study, there is indeed an
187 interrelationship between heart and kidney injuries clinically described as cardiorenal syndrome
188 (CRS), which leads to an accumulation of uremic toxins in the body⁴⁹. Applied to the cardiologist's
189 practice, CRS is common in HF patients, associated with worse prognosis and secondary to multiple
190 pathophysiological mechanisms, such as hemodynamic changes leading to venous renal congestion⁵⁰.
191 Moreover, unbalanced protein metabolism in association to kidneys impairment may also culminate in
192 uremia, condition in which levels of urea, myo-inositol and hippuric acid are knowingly increased^{51,52}.

193 Still on uremic toxins, our data show that p-cresol levels, which is an end product of protein
194 metabolism, were increased in CCC patients compared to the IDC group. In line with our findings, a
195 growing number of publications have confirmed that renal patients revealed an emerging role for this
196 specific metabolite in cardiovascular disease and mortality^{53,54}. In ChD particularly, Gironès *et al.*⁵⁵
197 revealed a marked increase of p-cresol in both heart tissue and plasma of *T. cruzi* infected mice,
198 suggesting that alterations in p-cresol metabolism may be associated with increased cardiac stress in
199 acute myocarditis.

200 In summary, our data reveal novel metabolomic insights into HF molecular events that drive the distinct
201 clinical course of CCC patients from those with non-ischemic DCM. Although impairment of
202 mitochondrial oxidative capacity may be a central mechanistic event in predisposing to HF (Figure
203 5A), the associated metabolic imbalance differs between CCC and IDC populations especially in terms
204 of AA metabolism. Tryptophan, methionine, isoleucine, serine and lysine had lower abundance in CCC
205 samples compared to IDC. On the other hand, some uremic toxins, such as urea, hippuric acid and p-
206 cresol were more intense in CCC, possibly indicating an overload of the urea detoxification cycle.
207 Myo-inositol, also known to be implicated in the intracellular remodeling of Ca²⁺ signaling and
208 arrhythmias occurrence, was also more intense in ChD-related advanced HF (Figure 5B).

209 From a translational perspective, understanding the functionality of these effector-metabolites in CCC
210 may deepen our knowledge on the metabolic changes that significantly influence the cardiomyopathy
211 development, progression and outcome. We recognize that the number of patients in each biological
212 scenario is not ideal, which may have impacted the analysis of clinical data and pairing of participating
213 patients. Nonetheless, the variables analyzed in this pilot work (metabolites) are excellent discriminant
214 in two of the proposed scenarios (Q2 > 0.8). We also acknowledge that a validation of these findings
215 with a larger cohort is needed, in order to translate these important findings into clinics. Future studies
216 should consider including patients with ChD and CCC at various stages to add prognostic value to this
217 matter.

218 4 Patients and Methods

219 4.1 Study Population and Experimental Design

220 The present investigation was carried out as a prospective pilot study designed in a real-life context to
221 test the adequacy of plasma metabolomic profiling for differentiating advanced non-ischemic and ChD-
222 related HF. Patients enrolled in the specialized HF program at the Institute of Cardiology and
223 Transplantation of the Federal District (ICTDF) in Brasilia, Brazil, between July 2017 and July 2019
224 were recruited. Those with advanced HF secondary to non-ischemic DCM referred for heart
225 transplantation (HT) were eligible after chagasic and idiopathic etiologies confirmation. All patients
226 were in stage D (refractory to clinical treatment)⁵⁶, had HF with reduced ejection fraction (HFrEF),
227 and belonged to NYHA classes III or IV⁵⁷. Those undergoing retransplantation, aged > 70 years, with
228 significant hypertension, history of acute myocardial infarction, or coronary, valvular, cerebrovascular,
229 peripheral vascular, hepatic and severe pulmonary diseases were excluded. In total, 15 patients with
230 advanced HF were enrolled – 8 patients with CCC and 7 with IDC.

231 Twelve heart donors representing the CTRL scenario were also included to experimentally reproduce
232 physiological conditions and ultimately discriminate the molecular characteristics particularly
233 associated with non-ischemic HF, CCC and IDC advanced stages. To preserve the sample collection
234 method, CTRL enrollment criteria included not only the absence of previous or current heart disease,
235 but also referral for evaluation with the same clinical team responsible for HF patients at HT. Heart
236 donors with positive and confirmatory serological tests for ChD, hepatitis B, hepatitis C, syphilis,
237 toxoplasmosis, cytomegalovirus, HIV and/or HTLV I and II were excluded. The study inclusion and
238 exclusion criteria for both HT recipient and donors were based on the recommendations of the
239 International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) guideline⁵⁸, 3rd Brazilian Heart
240 Transplant Directive⁵⁹ and Ordinance MS-GM n° 2.600 (October 21, 2009). The selected number of
241 samples included together with the sensitivity of the analytical technique and the complementary
242 assessment of clinical aspects represent, to a lesser extent, a necessary initial step for a larger
243 translational experiment.

244 4.2 Ethics Statement

245 This research was approved by the Ethical Review Committee of the ICTDF, Brasilia, Brazil
246 (13158619.7.0000.0026). Written informed consent was obtained from all participants and all methods
247 were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

248 4.3 Sample Collection and Preparation

249 Peripheral blood samples were collected from the central venous access intraoperatively before
250 heparinization and sternotomy. Following centrifuge-induced fractionation in ethylenediamine
251 tetraacetic acid (EDTA) tubes, 50µL aliquots of plasma were diluted in 150µL of cold acetonitrile
252 containing 4-nitrobenzoic acid as internal standard. Supernatants aliquots (100µL) were lyophilized,
253 reconstituted in 10µL of o-methoxyamine hydrochloride in pyridine solution and then added 10µL of
254 O-bistrifluoroacetamide (BSTFA) containing 1% chlorotrimethylsilane (TMCS), for derivatization. 4
255 blank samples, using 50µL of Milli-Q® water, and 3 QC samples, consisting of a pool of 100µL of
256 each plasma, were also prepared randomly. All sample preparation steps are described in detail in the
257 Supporting Information.

258 4.4 GC-MS/MS Analysis

259 Samples were randomly analyzed by a gas chromatograph (GC 7890A, Agilent Technologies, CA, US)
260 equipped with an automatic liquid sampler (ALS 7693, Agilent Technologies, CA, US) coupled to a
261 quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF 7200, Agilent Technologies, CA, US). The
262 analysis was performed using a previously developed method⁶⁰ with the analytical conditions
263 described in detail in the Supporting Information.

264 4.5 Data Processing and Analysis

265 After spectral deconvolution in Unknowns Analysis software (Agilent Technologies, CA, US), all GC-
266 MS raw data were checked using MassHunter Qualitative software (version 10.0) to determine the data
267 quality, the system mass accuracy, and the reproducibility of the QC sample, IS injections and data
268 integration. Putative identification was performed using MassHunter Qualitative software (version
269 B.10.00, Agilent Technologies, CA, US), NIST MS Search (Gaithersburg, MD, US), an in-house
270 library (PCDL) and the Fiehn 2013 and NIST17 databases. Univariate analyzes were conducted using
271 the R statistical language (version 4.1.0) following the packages Nortest, Stats, Onewaytests and
272 Ggplot2^{61,62}. Data normality was assessed by Shapiro-Wilk's test and those with parametric
273 distribution were tested for heteroscedasticity (F test) and by an appropriate analysis of variance
274 (ANOVA). Non-parametric data were compared by Kruskal-Wallis test. Tukey's and Dunn's post hoc
275 tests, for parametric and non-parametric data, respectively, examined the differences between all paired
276 combinations of groups. Multivariate statistics were conducted in parallel in MetaboAnalyst 4.0⁶³
277 using the same normalized data matrix. Metabolites of greater contribution to OPLS-DA scenarios
278 were also evaluated by STITCH⁶⁴ targeting the highest confidence score (0.900) in neighborhood. All
279 the data processing steps are described in detail in the Supporting Information.

280 5 References

- 281 1. Ikegami, R., Shimizu, I., Yoshida, Y. & Minamino, T. Metabolomic analysis in heart failure.
282 *Circ. J.* **82**, 10–16 (2018).
- 283 2. Pinto, Y. M. *et al.* Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-
284 dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the

- 285 ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur. Heart J.* **37**, 1850–1858
286 (2016).
- 287 3. Dadson, K., Hauck, L. & Billia, F. Molecular mechanisms in cardiomyopathy. *Clin. Sci.* **131**,
288 1375–1392 (2017).
- 289 4. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). *World Health*
290 *Organization* https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1 (2022).
- 291 5. Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C. & Simões, M. V. Pathogenesis of chronic
292 chagas heart disease. *Circulation* **115**, 1109–1123 (2007).
- 293 6. Mijares, A., Espinosa, R., Adams, J. & Lopez, J. R. Increases in [IP3]i aggravates diastolic
294 [Ca2+] and contractile dysfunction in chagas' human cardiomyocytes. *PLoS Negl. Trop. Dis.*
295 **14**, e0008162 (2020).
- 296 7. Casares-Marfil, D. *et al.* A genome-wide association study identifies novel susceptibility loci in
297 chronic Chagas cardiomyopathy. *Clin. Infect. Dis.* **11**, 617–64 (2021).
- 298 8. Ferreira, L. R. P. *et al.* Blood gene signatures of Chagas cardiomyopathy with or without
299 ventricular dysfunction. *J. Infect. Dis.* **215**, 387–395 (2017).
- 300 9. Cunha-Neto, E., Teixeira, P. C., Fonseca, S. G., Bilate, A. M. & Kalil, J. Myocardial gene and
301 protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy.
302 *Autoimmun. Rev.* **10**, 163–5 (2011).
- 303 10. Cardoso, J. *et al.* Chagas' cardiomyopathy: prognosis in clinical and hemodynamic profile C.
304 *Arq. Bras. Cardiol.* **95**, 518–523 (2010).
- 305 11. Lopaschuk, G. D., Karwi, Q. G., Tian, R., Wende, A. R. & Abel, E. D. Cardiac energy
306 metabolism in heart failure. *Circ. Res.* **128**, 1487–1513 (2021).
- 307 12. Wisneski, J. A., Stanley, W. C., Neese, R. A. & Gertz, E. W. Effects of acute hyperglycemia on
308 myocardial glycolytic activity in humans. *J. Clin. Invest.* **85**, 1648–56 (1990).
- 309 13. Karwi, Q. G., Uddin, G. M., Ho, K. L. & Lopaschuk, G. D. Loss of metabolic flexibility in the
310 failing heart. *Front. Cardiovasc. Med.* **5**, 68 (2018).
- 311 14. Yamamoto, T. & Sano, M. Deranged myocardial fatty acid metabolism in heart failure. *Int. J.*
312 *Mol. Sci.* **23**, 996 (2022).
- 313 15. Allard, M. F., Schonekess, B. O., Henning, S. L., English, D. R. & Lopaschuk, G. D.
314 Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts.
315 *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **267**, H742–H750 (1994).
- 316 16. Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. & Newsholme, E. A. The glucose fatty-acid cycle: its
317 role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **281**, 785–
318 789 (1963).
- 319 17. Starling, R. C., Hammer, D. F. & Altschuld, R. A. Human myocardial ATP content and in vivo
320 contractile function. *Mol. Cell. Biochem.* **180**, 171–177 (1998).

- 321 18. Zhou, B. & Tian, R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J. Clin.*
322 *Invest.* **128**, 3716–3726 (2018).
- 323 19. Bornstein, A. B., Rao, S. S. & Marwaha, K. Left Ventricular Hypertrophy. in *StatPearls*
324 *[Internet]. Treasure Island (FL)* (StatPearls Publishing, 2021).
- 325 20. Øie, E. *et al.* Fatty acid composition in chronic heart failure: low circulating levels of
326 eicosatetraenoic acid and high levels of vaccenic acid are associated with disease severity and
327 mortality. *J. Intern. Med.* **270**, 263–272 (2011).
- 328 21. Yu, Y. *et al.* Serum free fatty acids independently predict adverse outcomes in acute heart failure
329 patients. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 761537 (2021).
- 330 22. Hu, Q. *et al.* Increased Drp1 acetylation by lipid overload induces cardiomyocyte death and
331 heart dysfunction. *Circ. Res.* **126**, 456–470 (2020).
- 332 23. Sharma, S. *et al.* Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the
333 lipotoxic rat heart. *FASEB J.* **18**, 1692–1700 (2004).
- 334 24. Barbosa, A. P., Cardinalli Neto, A., Otaviano, A. P., Rocha, B. F. & Bestetti, R. B. Comparison
335 of outcome between chagas cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Arq. Bras.*
336 *Cardiol.* **97**, 517–525 (2011).
- 337 25. Bestetti, R. B. & Muccillo, G. Clinical course of chagas' heart disease: a comparison with dilated
338 cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* **60**, 187–193 (1997).
- 339 26. Braga, J. C. V. *et al.* Clinical and therapeutics aspects of heart failure due to Chagas disease.
340 *Arq. Bras. Cardiol.* **86**, 297–302 (2006).
- 341 27. Cunha-Neto, E. *et al.* Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as
342 a molecular mechanism in chagas' disease cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* **167**, 305–313
343 (2005).
- 344 28. Teixeira, P. C. *et al.* Impairment of multiple mitochondrial energy metabolism pathways in the
345 heart of chagas disease cardiomyopathy patients. *Front. Immunol.* **12**, 755782 (2021).
- 346 29. Carubelli, V. *et al.* Amino acids and derivatives, a new treatment of chronic heart failure? *Heart*
347 *Fail. Rev.* **20**, 39–51 (2015).
- 348 30. Krysztofiak, H. *et al.* Cardiac cachexia: a well-known but challenging complication of heart
349 failure. *Clin. Interv. Aging* **15**, 2041–2051 (2020).
- 350 31. Pasini, E. *et al.* Pathogenic gut flora in patients with chronic heart failure. *JACC Hear. Fail.* **4**,
351 220–227 (2016).
- 352 32. Lai, L. *et al.* Energy metabolic reprogramming in the hypertrophied and early stage failing heart.
353 *Circ. Hear. Fail.* **7**, 1022–1031 (2014).
- 354 33. Aquilani, R. *et al.* Plasma amino acid abnormalities in chronic heart failure: mechanisms,
355 potential risks and targets in human myocardium metabolism. *Nutrients* **9**, 1251 (2017).

- 356 34. Wang, C.-H., Cheng, M.-L. & Liu, M.-H. Simplified plasma essential amino acid-based
357 profiling provides metabolic information and prognostic value additive to traditional risk factors
358 in heart failure. *Amino Acids* 50, 1739–1748 (2018).
- 359 35. Hennig, K. *et al.* Metabolomics, lipidomics and proteomics profiling of myoblasts infected with
360 *Trypanosoma cruzi* after treatment with different drugs against chagas disease. *Metabolomics*
361 15, 117 (2019).
- 362 36. Millerioux, Y. *et al.* The threonine degradation pathway of the *Trypanosoma brucei* procyclic
363 form: the main carbon source for lipid biosynthesis is under metabolic control. *Mol. Microbiol.*
364 90, 114–129 (2013).
- 365 37. Saleem, T. H., Algowhary, M., Kamel, F. E. M. & El-Mahdy, R. I. Plasma amino acid
366 metabolomic pattern in heart failure patients with either preserved or reduced ejection fraction:
367 the relation to established risk variables and prognosis. *Biomed. Chromatogr.* 35, e5012 (2021).
- 368 38. Cerbán, F. M. *et al.* Signaling pathways that regulate *Trypanosoma cruzi* infection and immune
369 response. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866, 165707 (2020).
- 370 39. Fallarino, F. *et al.* T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 9, 1069–1077
371 (2002).
- 372 40. Munn, D. H. *et al.* GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in
373 response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 22, 633–642 (2005).
- 374 41. Frumento, G. *et al.* Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural
375 killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* 196, 459–468
376 (2002).
- 377 42. Terness, P. *et al.* Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-
378 expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 196, 447–457 (2002).
- 379 43. Marañón, C. *et al.* Benznidazole treatment reduces the induction of indoleamine 2,3-
380 dioxygenase (IDO) enzymatic activity in chagas disease symptomatic patients. *Parasite*
381 *Immunol.* 35, 180–187 (2013).
- 382 44. Harzheim, D. *et al.* Increased InsP3Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca²⁺
383 transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106,
384 11406–11411 (2009).
- 385 45. Deidda, M. *et al.* Metabolomic approach to profile functional and metabolic changes in heart
386 failure. *J. Transl. Med.* 13, 297 (2015).
- 387 46. Costanzo, M. R. The cardiorenal syndrome in heart failure. *Heart Fail. Clin.* 16, 81–97 (2020).
- 388 47. Tabucanon, T. & Tang, W. H. W. Right heart failure and cardiorenal syndrome. *Cardiol. Clin.*
389 38, 185–202 (2020).
- 390 48. Owan, T. E. *et al.* Secular trends in renal dysfunction and outcomes in hospitalized heart failure
391 patients. *J. Card. Fail.* 12, 257–262 (2006).

- 392 49. Falconi, C. A. *et al.* Uremic toxins: an alarming danger concerning the cardiovascular system.
393 *Front. Physiol.* **12**, 686249 (2021).
- 394 50. Ronco, C., Cicoira, M. & McCullough, P. A. Cardiorenal syndrome type 1. *J. Am. Coll. Cardiol.*
395 **60**, 1031–1042 (2012).
- 396 51. Lau, W. L. & Vaziri, N. D. Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back. *Clin. Sci.* **131**, 3–
397 12 (2017).
- 398 52. Clements, R. S., DeJesus, P. V & Winegrad, A. I. Raised plasma-myoinositol levels in uraemia
399 and experimental neuropathy. *Lancet* **1**, 1137–1141 (1973).
- 400 53. Barreto, F. C. *et al.* Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in
401 chronic kidney disease patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4**, 1551–1558 (2009).
- 402 54. Lin, C.-J. *et al.* Serum protein-bound uraemic toxins and clinical outcomes in haemodialysis
403 patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 3693–3700 (2010).
- 404 55. Gironès, N. *et al.* Global metabolomic profiling of acute myocarditis caused by trypanosoma
405 cruzi infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3337 (2014).
- 406 56. Hunt, S. A. *et al.* 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 guidelines for the
407 diagnosis and management of heart failure in adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, e1–e90 (2009).
- 408 57. New York Heart Association. Criteria Committee. *Nomenclature and criteria for diagnosis of*
409 *diseases of the heart and great vessels. Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of*
410 *the Heart and Great Vessels* (Little, Brown & Co, 1994).
- 411 58. Mehra, M. R. *et al.* The 2016 International Society for Heart Lung Transplantation listing criteria
412 for heart transplantation: a 10-year update. *J. Hear. Lung Transplant.* **35**, 1–23 (2016).
- 413 59. Bacal, F. *et al.* III Diretriz brasileira de transplante cardíaco. *Arq. Bras. Cardiol.* **111**, 230–289
414 (2018).
- 415 60. Raczowska, B. A. *et al.* Gas chromatography–mass spectroscopy-based metabolomics analysis
416 reveals potential biochemical markers for diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Front.*
417 *Pharmacol.* **12**, 770240 (2021).
- 418 61. Dag, O., Dolgun, A. & Konar, N. M. onewaytests: an R package for one-way tests in
419 independent groups designs. *R.J.* **10**, 175–199 (2018).
- 420 62. Wickham, H. ggplot2. *WIREs Comput. Stat.* **3**, 180–185 (2011).
- 421 63. Chong, J. *et al.* MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics
422 analysis. *Nucleic Acids Res.* **46**, W486–W494 (2018).
- 423 64. Kuhn, M. *et al.* STITCH 2: an interaction network database for small molecules and proteins.
424 *Nucleic Acids Res.* **38**, D552–D556 (2010).
- 425 **6 Acknowledgments**

426 Authors acknowledge University of San Pablo CEU and CEMBIO staff, especially Vanesa A Herranz,
427 the Cardiac Surgery Service team at ICTDF and financial support from Airbus (scientific agreement
428 EADS CASA 002/DCTA-COPAC/2014).

429 **7 Author Contributions**

430 Study conception: M.U.B.P., F.A.A., A.M.A.M.; infrastructure support: C.B., F.J.R., F.A.A.; funding
431 support: C.B., F.J.R.; sample collection: R.M.O., D.V.N.P., F.A.A.; patients' data collection: R.M.O.,
432 M.U.B.P.; experiment development: C.R.C.P., A.M.A.M., C.B., F.J.R.; data interpretation: R.M.O.,
433 M.U.B.P., C.R.C.P., D.V.N.P., C.A.O.R., F.A.A., A.M.A.M.; manuscript preparation: R.M.O.,
434 M.U.B.P.; figures conception: A.M.A.M.; final revision: R.M.O., M.U.B.P., C.R.C.P., C.A.O.R.,
435 C.B., F.J.R., F.A.A., A.M.A.M.; supervision: F.A.A., A.M.A.M.

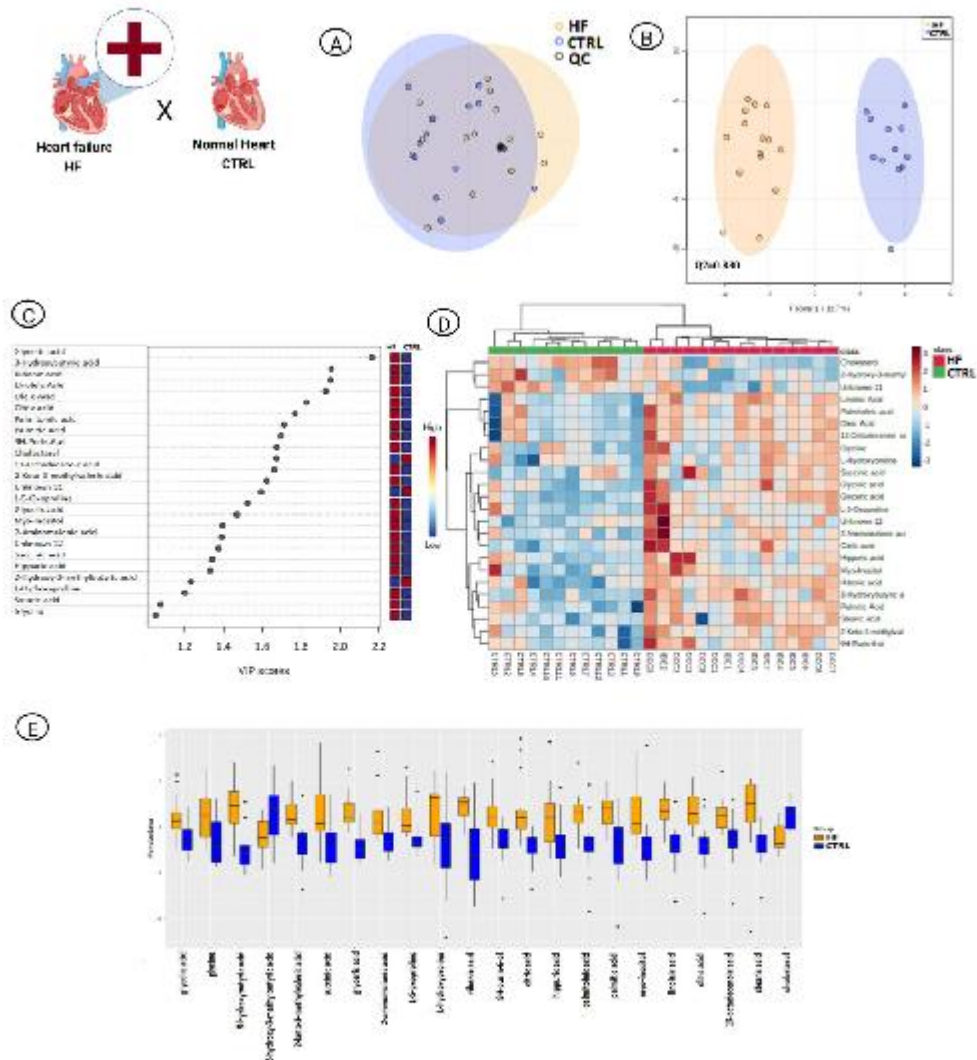
436 **8 Data Availability Statement**

437 The dataset generated for this study can be found in the MassIVE repository under the link
438 <https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/dataset.jsp?task=b30335722ed249afa57e600941f560aa>.

439 **9 Competing Interests**

440 The authors declare no competing interests.

441 10 Figures

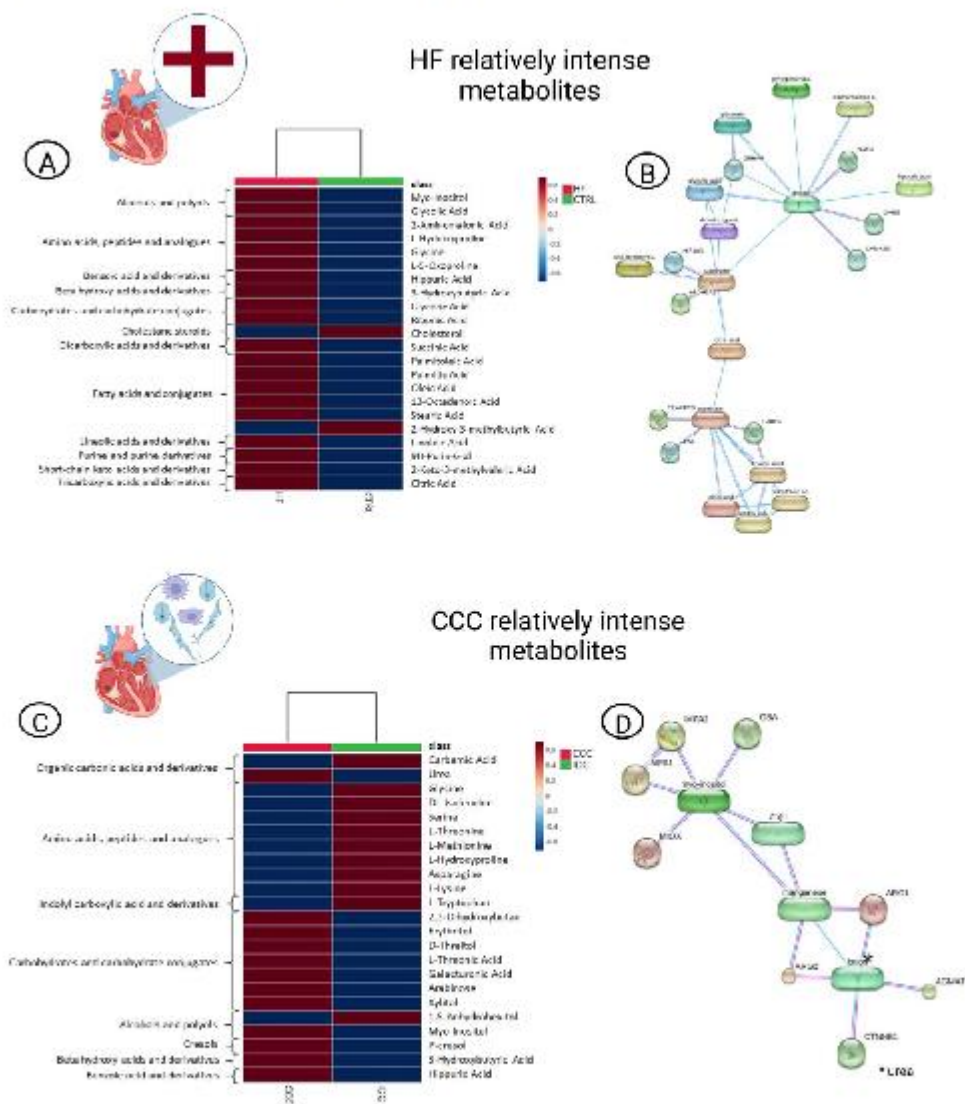


442

443 **Figure 1.** Multivariate analysis of advanced HF (^{CCC+IDC}) and CTRL patients. (A) PCA scores plot to
 444 evaluate analytical (QC) reproducibility. (B) OPLS-DA scores plot (95% confidence; $p < 0.05$). Each
 445 point corresponds to a patient's sample. (C) OPLS-DA VIP scores. The colored boxes on the right
 446 indicate the relative intensities of the metabolites in each phenotypic group. (D) Heatmap hierarchical
 447 clustering of the OPLS-DA discriminant metabolites (VIP score ≥ 1.0). Arrays express samples or
 448 metabolites relationship. (E) Whiskers box plot of OPLS-DA discriminant metabolites (VIP score \geq
 449 1.0). The diagram shows the compounds distribution in quartiles for each condition and each point

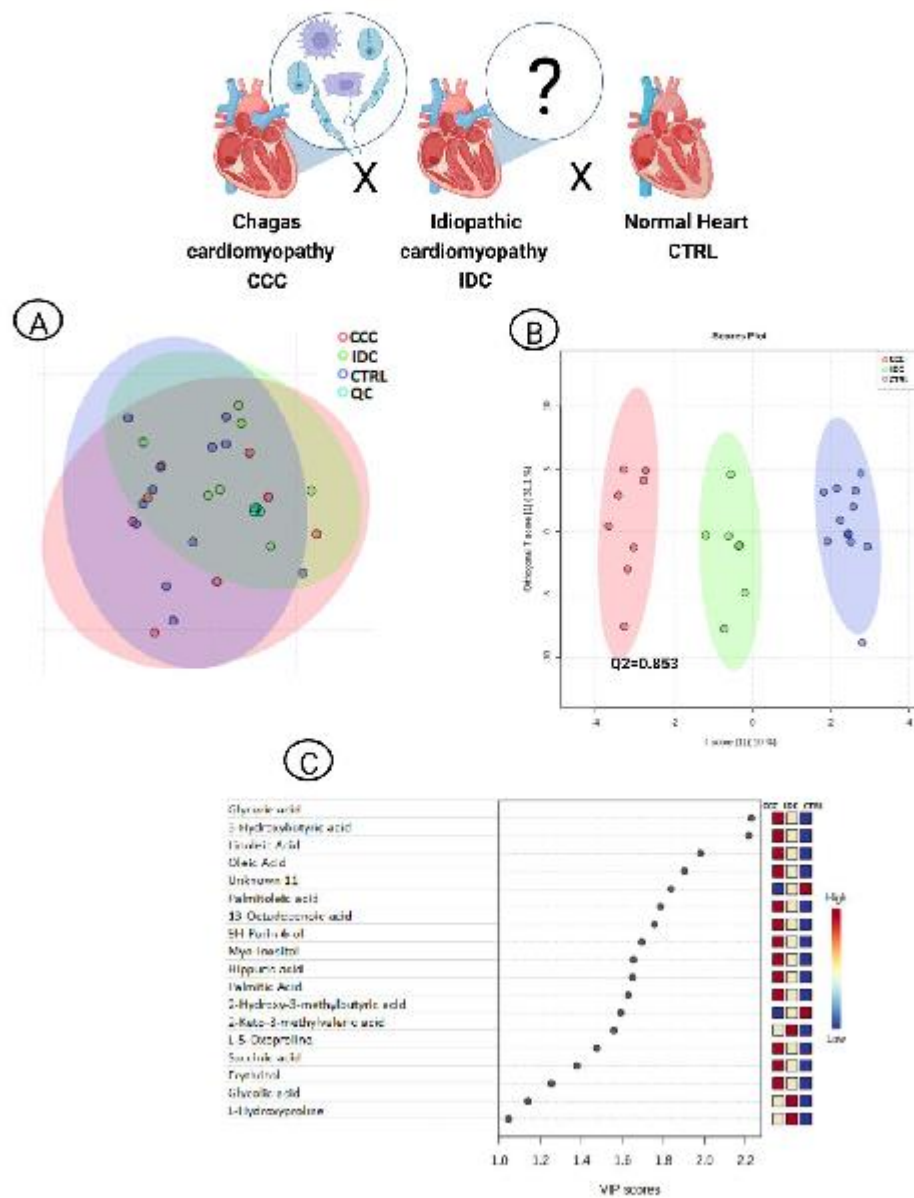
13

450 outside the range corresponds to an outlier sample. CTRL – control; HF – heart failure; OPLS-DA –
 451 orthogonal partial least square discriminant analysis; PCA – principal component analysis; QC –
 452 quality control; VIP – variable importance in projection.



453
 454 **Figure 2. Metabolite network associated with advanced HF (CCC+HDC) and CCC. (A) Heatmap class**
 455 **clustering of HF-discriminating metabolites in OPLS-DA (VIP score ≥ 1.0 , HF vs. CTRL). (B) HF-**
 456 **discriminating metabolites network. (C) Heatmap class clustering of CCC-discriminating metabolites**
 457 **in OPLS-DA (VIP score ≥ 1.0 , CCC vs. IDC). (D) CCC-discriminating metabolites network. Spherical**

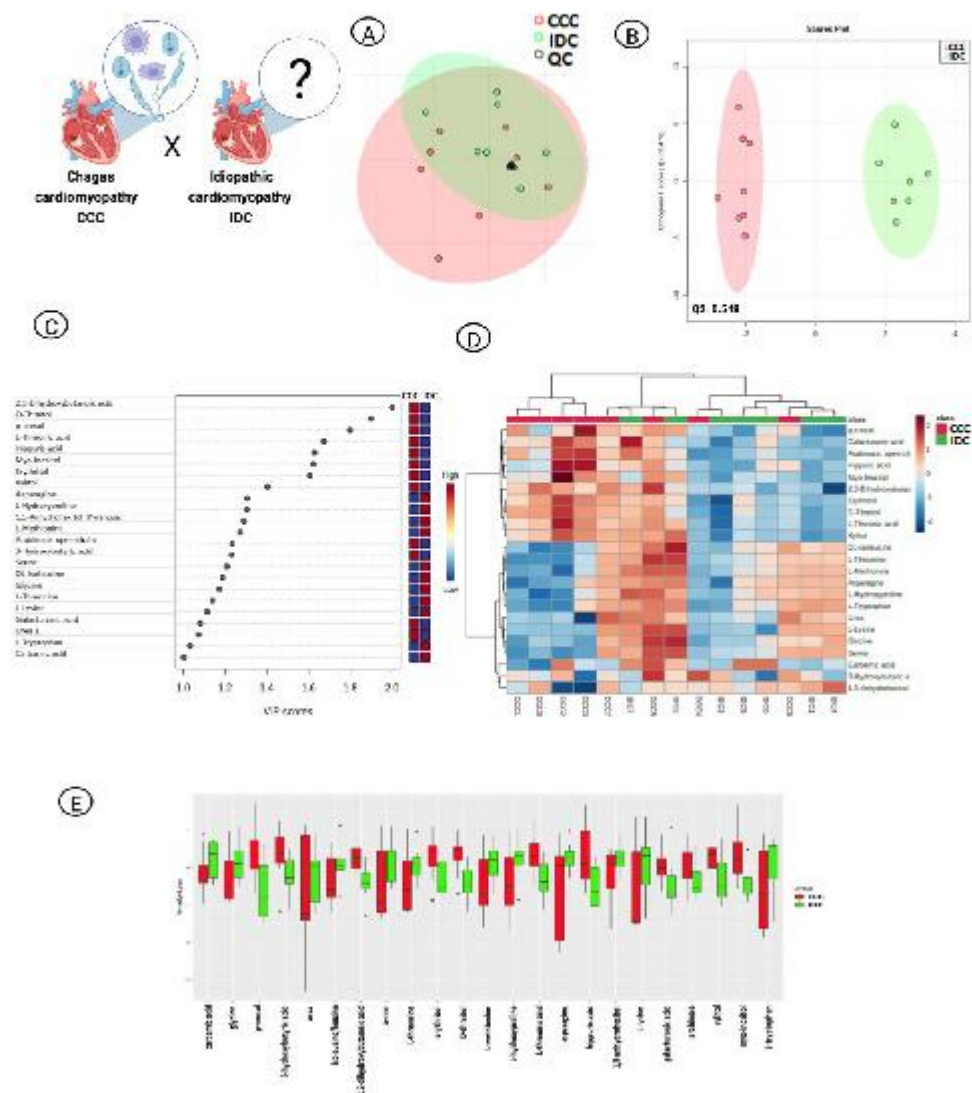
458 nodes represent predicted functional partners and line colors indicate the type of interaction evidence,
 459 meaning blue for curated databases, pink for experimentally determined and purple for protein
 460 homology. CCC – chronic chagasic cardiomyopathy; CTRL – control; HF – heart failure; OPLS-DA
 461 – orthogonal partial least square discriminant analysis; VIP – variable importance in projection.



462

15

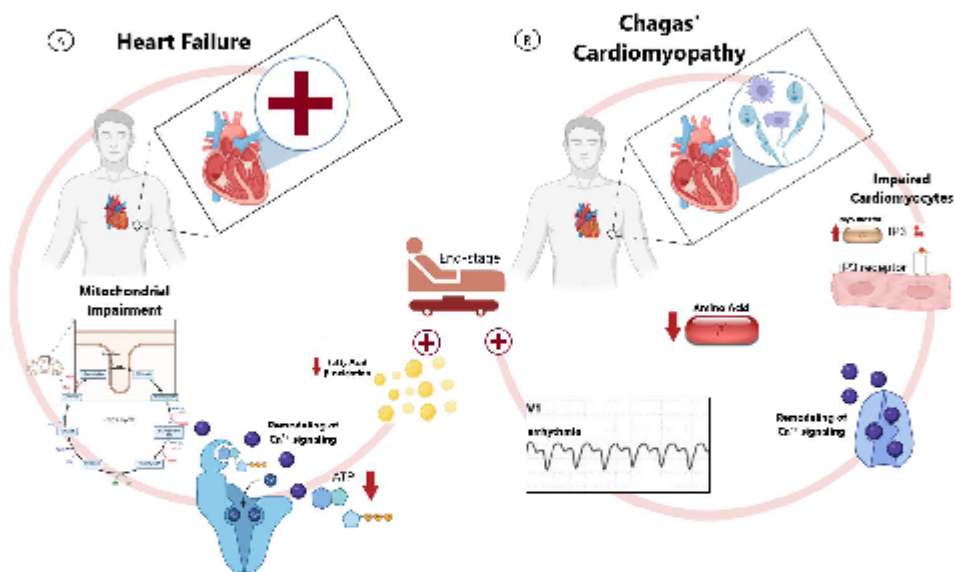
463 **Figure 3.** Multivariate analysis of CCC, IDC and CTRL patients. (A) PCA scores plot to evaluate
 464 analytical (QC) reproducibility. (B) OPLS-DA scores plot (95% confidence; $p < 0.05$). Each point
 465 corresponds to a patient's sample. (C) OPLS-DA VIP scores. The colored boxes on the right indicate
 466 the relative intensities of the metabolites in each phenotypic group. CCC – chronic chagasic
 467 cardiomyopathy; CTRL – control; IDC – idiopathic dilated cardiomyopathy; OPLS-DA – orthogonal
 468 partial least square discriminant analysis; PCA – principal component analysis; QC – quality control;
 469 VIP – variable importance in projection.



470

16

471 **Figure 4.** Multivariate analysis of CCC and IDC patients. (A) PCA scores plot to evaluate analytical
 472 (QC) reproducibility. (B) OPLS-DA scores plot (95% confidence; $p < 0.05$). Each point corresponds
 473 to a patient's sample. (C) OPLS-DA VIP scores. The colored boxes on the right indicate the relative
 474 intensities of the metabolites in each phenotypic group. (D) Heatmap hierarchical clustering of the
 475 OPLS-DA discriminant metabolites (VIP score ≥ 1.0). Arrays express samples or metabolites
 476 relationship. (E) Whiskers box plot of OPLS-DA discriminant metabolites (VIP score ≥ 1.0). The
 477 diagram shows the compounds distribution in quartiles for each condition and each point outside the
 478 range corresponds to an outlier sample. CCC – chronic chagasic cardiomyopathy; IDC – idiopathic
 479 dilated cardiomyopathy; OPLS-DA – orthogonal partial least square discriminant analysis; PCA –
 480 principal component analysis; QC – quality control; VIP – variable importance in projection.



481

482 **Figure 5.** Pathophysiology of advanced HF and CCC from a translational metabolomics basis. (A)
 483 Link between impaired mitochondrial energy metabolism, FAs and TCA cycle AAs accumulation, LV
 484 hypertrophy progression and end-stage HF. (B) Link between ChD, impaired cardiomyocytes, higher
 485 levels of myo-inositol and intracellular IP₃, remodeling of Ca²⁺ signaling, arrhythmia and end-stage
 486 HF. AA – amino acid; Ca²⁺ – calcium; CCC – chronic chagasic cardiomyopathy; ChD – chagas'
 487 disease; CTRL – control; FA – fatty acid; HF – heart failure; IP₃ – inositol 1,4,5 trisphosphate; LV –
 488 left ventricle; TCA – tricarboxylic acid.

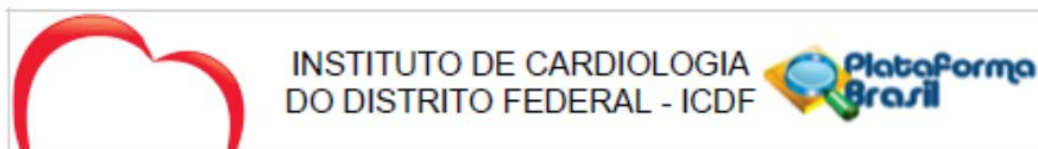
Table 1. Baseline characteristics of CCC and IDC patients

Characteristics	CCC (n = 8)	IDC (n = 7)	p-Value
<i>Male sex</i>	6 (75%)	4 (57.14%)	0.855
<i>Age, y</i>	56.6 (±10.6)	29.3 (±21.9)	0.03
<i>Weight, kg</i>	57.5 (±12.5)	61.1 (±20.9)	1
<i>BMI, kg/m²</i>	21.2 (±4.81)	22.7 (±7.93)	1
NYHA functional class^a	-	-	0.232
<i>I/II</i>	0(0%)	1 (14.29%)	-
<i>III</i>	4(50%)	2 (28.57%)	-
<i>IV</i>	4(50%)	4 (57.14%)	-
Hemodynamic profile^b	-	-	0.935
<i>A</i>	1 (12.5%)	1 (14.29%)	-
<i>B</i>	4 (50%)	4 (57.14%)	-
<i>C</i>	3 (37.5%)	2 (28.57%)	-
History	-	-	-
<i>Hypertension</i>	1 (12.5%)	1 (14.29%)	1
<i>Dyslipidemia</i>	4 (50%)	1 (14.29%)	0.36
<i>Myocardial infarction</i>	0 (0%)	0 (0%)	-
<i>Stroke</i>	3 (37.5%)	1 (14.29%)	0.506
<i>Current smoking</i>	0 (0%)	1 (14.29%)	1
<i>Atrial fibrillation</i>	2 (25%)	2 (28.57%)	0.506
Physical examination	-	-	-
<i>Systolic BP, mmHg</i>	95.4 (±16.8)	105 (±12.8)	0.152
<i>Diastolic BP, mmHg</i>	58.4 (±9.2)	71.9 (±13)	0.042
<i>Heart rate, beats/min</i>	64.2 (±11)	83.1 (±18.6)	0.02
<i>O₂ saturation, %</i>	99 (±1)	99 (±0.9)	0.7
Echocardiography	-	-	-
<i>LVEF, %</i>	26 (±7)	25 (±8)	0.955
<i>LVDD, mm</i>	69.4(±7.76)	64 (±9.19)	0.473
<i>Diastolic dysfunction</i>	6 (75%)	7 (100%)	0.344
<i>Right ventricular dysfunction</i>	8 (100%)	7 (100%)	-
Laboratory	-	-	-
<i>Hemoglobin, g/dL</i>	12.7 (±2.29)	12.1 (±2.11)	0.601
<i>Urea, mg/dL</i>	80.5 (±29.9)	64.4 (±51.9)	0.281
<i>Creatinine, mg/dL</i>	2.2 (±2.14)	1.21 (±0.815)	0.129
<i>Sodium, mEq/L</i>	138 (±1.85)	137 (±1.99)	1
<i>AST, units/L</i>	35.6 (±28.1)	18.7 (±5.38)	0.145
<i>ALT, units/L</i>	30.3 (±26.5)	17 (±8.49)	0.442
<i>Bilirubin, mg. dL</i>	1.0 (±0.92)	1.21 (±0.85)	0.52
<i>Alkaline phosphatase, units/L</i>	106 (±43.9)	76 (±8.28)	0.127
<i>γ-GT, units</i>	97.6 (±68.7)	98.7 (±62.8)	0.897
Drugs	-	-	-
<i>ACEI</i>	2 (25%)	1 (14.29%)	0.4
<i>ARB</i>	2 (25%)	3 (42.86%)	0.175
<i>β-blocker</i>	8 (100%)	4 (57.16%)	0.155
<i>Spirolactone</i>	6 (75%)	7 (100%)	0.509
<i>Loop diuretic</i>	6 (75%)	6 (85.71%)	1
<i>Thiazide diuretic</i>	1 (12.5%)	1 (14.29%)	1
<i>Hydralazine/nitrate</i>	4 (50%)	1 (14.29%)	0.36
<i>Digoxin</i>	2 (25%)	0 (0%)	0.509
<i>Amiodarone</i>	5 (62.5%)	1 (14.29%)	0.17
Rassi Score^c	14.8 (±2.2)	-	-
Cardiac Devices^d	5 (62.5%)	2 (28.58%)	0.23

491 ^aFunctional classification according to symptom severity. ^bStratification by degree of congestion and
492 adequacy of perfusion. ^cRisk score for predicting death in patients with CCC. ^dImplantable cardioverter
493 defibrillators, pacemakers and cardiac resynchronization therapy (biventricular pacing). ACEI –
494 angiotensin-converting-enzyme inhibitors; ALT – alanine aminotransferase; ARB – angiotensin II
495 receptor blockers; AST – aspartate transaminase; BMI – body mass index; CCC – chronic chagasic
496 cardiomyopathy; GT – glutamyl transferase; IDC – idiopathic dilated cardiomyopathy; LVDD – left
497 ventricular diastolic diameter; LVEF – left ventricular ejection fraction; NYHA – New York Heart
498 Association; O₂ – oxygen. Data are expressed as mean (± standard deviation) or as number (%).

11. ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Cardiologia e Transplantes do Distrito Federal (Parecer Consubstanciado 3.385.202)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Metabolômica e proteômica em portadores de cardiomiopatia chagásica crônica pré e pós-transplante cardíaco e como marcador de rejeição do enxerto e reativação de doença.

Pesquisador: FERNANDO ANTIBAS ATIK

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13158619.7.0000.0028

Instituição Proponente: Instituto de Cardiologia do Distrito Federal - IC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.385.202

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Estrada Contorno do Bosque, S/N HFA
Bairro: CRUZEIRO NOVO **CEP:** 70.658-700
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3403-5552 **Fax:** (61)3403-5431 **E-mail:** cep@icdf.org.br

ANEXO B - MARTINS, B.A.A. et al. Identification of potential urinary protein biomarkers in colorectal cancer: a pilot study using a proteomic approach. **Journal of Coloproctology**, v. 43, n. 3, p. e171–e178, 2023.

Article published online: 2023-09-21



Original Article 171

Identification of Potential Urinary Protein Biomarkers in Colorectal Cancer: A Pilot Study Using a Proteomic Approach

Bruno Augusto Alves Martins¹ Raphaella Menezes de Oliveira² Mickaella Michelson Martins²
Paulo Gonçalves de Oliveira¹ Aline Maria Araújo Martins³

¹Department of Colorectal Surgery, School of Medicine, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

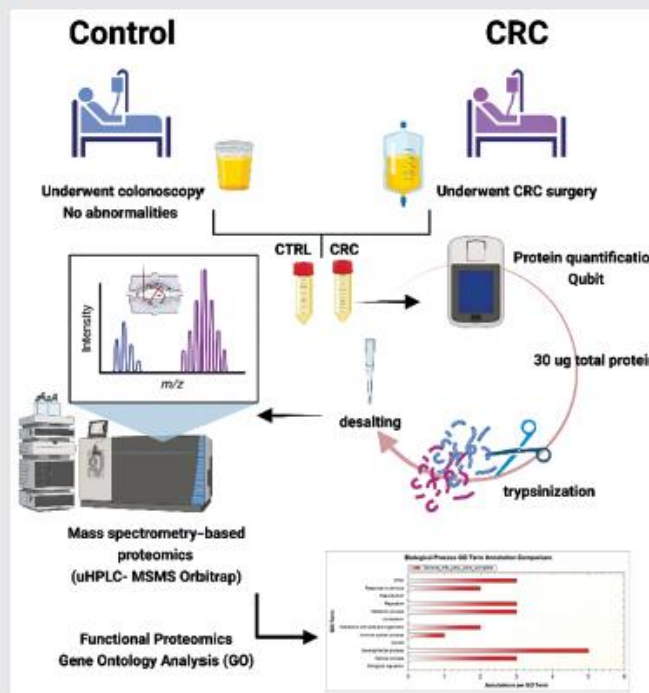
²Cell Biology Department, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

³Medical Science Graduate Program, School of Medicine, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

Address for correspondence: Bruno Augusto Alves Martins, MSc, SQN 212, block B, ap 205, Brasilia, Federal District, 70864-020, Brazil (e-mail: brunomartins.coloprocto@gmail.com).

J Coloproctol 2023;43(3):e171–e178.

Graphical Abstract



received
March 13, 2023
accepted after revision
June 21, 2023

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0043-1772784>
ISSN 2237-9363

© 2023, Sociedade Brasileira de Coloproctologia. All rights reserved.

This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution-NonDerivative-NonCommercial License, permitting copying and reproduction so long as the original work is given appropriate credit. Contents may not be used for commercial purposes, or adapted, remixed, transformed or built upon. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/>)

Thieme Revinter Publicações Ltda., Rua do Matoso 170, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20270-135, Brazil

ANEXO C - MOURA, A.A. et al. Global proteomics analysis of bone marrow: establishing talin-1 and centrosomal protein of 55 kDa as potential molecular signatures for myelodysplastic syndromes. **Frontiers in Oncology**, v.12, p. 833068, 2022.



OPEN ACCESS

Edited by:

Dawen Zhao,
Wake Forest Baptist Medical Center,
United States

Reviewed by:

Diego A. Pereira-Martins,
University of Groningen, Netherlands
Dapel Wu,
The First Affiliated Hospital of Soochow

*Correspondence:

Arlindo A. Moura
arlindo.moura@gmail.com
Claudia Pessoa
cpessoa@ufc.br
Ronald F. Pinheiro
pinheiroreitosa@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 10 December 2021

Accepted: 18 May 2022

Published: 22 June 2022

Citation:

Moura AA, Bezerra MJB,
Martins AMA, Borges DP,
Oliveira RTG, Oliveira RM, Farias KM,
Viana AG, Carvalho GGC, Paier CRK,
Sousa MV, Fontes W, Ricart CAO,
Moraes MEA, Magalhães SMM,
Furtado CLM, Moraes-Filho MO,
Pessoa C and Pinheiro RF (2022)
Global Proteomics Analysis of Bone
Marrow: Establishing Talin-1 and
Centrosomal Protein of 55 kDa as
Potential Molecular Signatures for
Myelodysplastic Syndromes.
Front. Oncol. 12:833068.
doi: 10.3389/fonc.2022.833068

Global Proteomics Analysis of Bone Marrow: Establishing Talin-1 and Centrosomal Protein of 55 kDa as Potential Molecular Signatures for Myelodysplastic Syndromes

Arlindo A. Moura^{1,2,3*}, Maria Julia B. Bezerra^{1,2}, Aline M. A. Martins⁴, Daniela P. Borges^{2,5}, Roberta T. G. Oliveira^{2,5}, Raphaela M. Oliveira⁴, Kaio M. Farias^{2,3}, Arabela G. Viana¹, Guilherme G. C. Carvalho^{2,6}, Carlos R. K. Paier^{2,7}, Marcelo V. Sousa⁴, Wagner Fontes⁴, Carlos A. O. Ricart⁴, Maria Elisabete A. Moraes^{2,7}, Sílvia M. M. Magalhães^{2,5}, Cristiana L. M. Furtado^{2,7,8}, Manoel O. Moraes-Filho^{2,7}, Claudia Pessoa^{2,3,6*} and Ronald F. Pinheiro^{2,5*}

¹ Graduate Program in Animal Science, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ² Drug Research and Development Center (NPDM), The School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ³ Graduate Program in Biotechnology (Fiorbio), Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ⁴ Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, The University of Brasília, Brasília, Brazil, ⁵ Graduate Program in Medical Sciences, The School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ⁶ Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ⁷ Graduate Program in Translational Medicine, The School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ⁸ Experimental Biology Center, NUBEX, The University of Fortaleza (Unifor), Fortaleza, Brazil

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a hematological disorder characterized by abnormal stem cell differentiation and a high risk of acute myeloid leukemia transformation. Treatment options for MDS are still limited, making the identification of molecular signatures for MDS progression a vital task. Thus, we evaluated the proteome of bone marrow plasma from patients (n = 28) diagnosed with MDS with ring sideroblasts (MDS-RS) and MDS with blasts in the bone marrow (MDS-EB) using label-free mass spectrometry. This strategy allowed the identification of 1,194 proteins in the bone marrow plasma samples. Polyubiquitin-C (UBC), moesin (MSN), and Talin-1 (TLN1) showed the highest abundances in MDS-EB, and centrosomal protein of 55 kDa (CEP55) showed the highest relative abundance in the bone marrow plasma of MDS-RS patients. In a follow-up, in the second phase of the study, expressions of *UBC*, *MSN*, *TLN1*, and *CEP55* genes were evaluated in bone marrow mononuclear cells from 45 patients by using qPCR. This second cohort included only seven patients from the first study. *CEP55*, *MSN*, and *UBC* expressions were similar in mononuclear cells from MDS-RS and MDS-EB individuals. However, *TLN1* gene expression was greater in mononuclear cells from MDS-RS (p = 0.049) as compared to MDS-EB patients. Irrespective of the MDS subtype, *CEP55* expression was higher (p = 0.045) in MDS patients with abnormal karyotypes, while *MSN*, *UBC*, and *TALIN1* transcripts were similar in MDS with normal vs. abnormal karyotypes. In conclusion, proteomic and gene



Novel Possible Protein Targets in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Pilot Study Experiment

Bruno Nobre Lins Coronado^{1,2*}, Felipe Bruno Santos da Cunha³,
Raphaela Menezes de Oliveira⁴, Otávio de Toledo Nóbrega¹,
Carlos André Ornelas Ricart⁴, Wagner Fontes⁴, Marcelo Valle de Sousa⁴,
Marcos Pereira de Ávila⁵ and Aline Maria Araújo Martins^{1,3*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Jodhbir Mehta,
Singapore National Eye
Center, Singapore

Reviewed by:

Jaya P. Gnana-Prakasam,
Saint Louis University, United States
Folami Powell,
Augusta University, United States

*Correspondence:

Bruno Nobre Lins Coronado
brunobrelins@gmail.com
Aline Maria Araújo Martins
alin3.m4rtins@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Ophthalmology,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 08 April 2021

Accepted: 14 December 2021

Published: 27 January 2022

Citation:

Coronado BNL, da Cunha FBS, de
Oliveira RM, Nóbrega OdT,
Ricart CAO, Fontes W, de Sousa MV,
de Ávila MP and Martins AMA (2022)
Novel Possible Protein Targets in
Neovascular Age-Related Macular
Degeneration: A Pilot Study
Experiment. *Front. Med.* 8:692272.
doi: 10.3389/fmed.2021.692272

¹ Department of Medical Science, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil, ² Faculty of Medicine, CESMAC University Center, Maceio, Brazil, ³ Department of Health Science, School of Medicine, University Center of Brasília (UnICEUB), Brasília, Brazil, ⁴ Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil, ⁵ Faculty of Medicine, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

Age-related macular degeneration (AMD) is among the world's leading causes of blindness. In its neovascular form (nAMD), around 25% of patients present further anatomical and visual deterioration due to persistence of neovascular activity, despite gold-standard treatment protocols using intravitreal anti-VEGF medications. Thus, to comprehend, the molecular pathways that drive choroidal neovascularization, associated with the vascular endothelial growth factor (VEGF), are important steps to elucidate the mechanistic events underneath the disease development. This is a pilot study, a prospective, translational experiment, in a real-life context aiming to evaluate the protein profiles of the aqueous humor of 15 patients divided into three groups: group 1, composed of patients with nAMD, who demonstrated a good response to anti-VEGF intravitreal injections during follow-up (good responsive); group 2, composed of patients with anti-VEGF-resistant nAMD, who demonstrated choroidal neovascularization activity during follow-up (poor/non-responsive); and group 3, composed of control patients without systemic diseases or signs of retinopathy. For proteomic characterization of the groups, mass spectrometry (label-free LC-MS/MS) was used. A total of 2,336 proteins were identified, of which 185 were distinctly regulated and allowed the differentiation of the clinical conditions analyzed. Among those, 39 proteins, including some novel ones, were analyzed as potential disease effectors through their pathophysiological implications in lipid metabolism, oxidative stress, complement system, inflammatory pathways, and angiogenesis. So, this study suggests the participation of other promising biomarkers in neovascular AMD, in addition to the known VEGF.

Keywords: AMD (age-related macular degeneration), resistance, proteomics, mass spectrometry (MS), biomarkers, choroidal neo vascularization



Innovative Approaches to Assess Intermediate Cardiovascular Risk Subjects: A Review From Clinical to Metabolomics Strategies

OPEN ACCESS

Edited by:

Turgay Celik,
VM Medical Park Ankara
(Kecioren), Turkey

Reviewed by:

Pompiio Faggiolo,
Fondazione Poliambulanza Istituto
Ospedaliero, Italy
Irene R. Degano,
Centro de Investigación Biomédica en
Red en Enfermedades
Cardiovasculares (CIBERCV), Spain

*Correspondence:

Aline M. A. Martins
alin3.m4rtins@gmail.com
Mariana U. B. Paiva
mubp2505@gmail.com

[†] These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Coronary Artery Disease,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

Received: 01 October 2021
Accepted: 22 November 2021
Published: 22 December 2021

Citation:

Martins AMA, Paiva MUB, Paiva DVN,
de Oliveira RM, Machado HL,
Alves LJSR, Picossi CRC, Faccio AT,
Tavares MFM, Barbas C,
Giraldez VZR, Santos RD, Monte GU
and Atik FA (2021) Innovative
Approaches to Assess Intermediate
Cardiovascular Risk Subjects: A
Review From Clinical to Metabolomics
Strategies.

Front. Cardiovasc. Med. 8:788062.
doi: 10.3389/fcvm.2021.788062

Aline M. A. Martins^{1,2,3*†}, Mariana U. B. Paiva^{2*†}, Diego V. N. Paiva²,
Raphaela M. de Oliveira², Henrique L. Machado³, Leonardo J. S. R. Alves³,
Carolina R. C. Picossi^{1,4}, Andréa T. Faccio⁴, Marina F. M. Tavares⁴, Coral Barbas¹,
Viviane Z. R. Giraldez⁵, Raul D. Santos⁵, Guilherme U. Monte⁶ and Fernando A. Atik^{2,6}

¹ Centre of Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO), San Pablo CEU University, Madrid, Spain, ² School of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil, ³ School of Medicine, University Center of Brasília (UniCeub), Brasília, Brazil, ⁴ Center for Multiparameter Metabolomics Studies (CEMM), University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil, ⁵ Lipid Clinic, Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School, São Paulo, Brazil, ⁶ Department of Heart Transplant, Federal District Institute of Cardiology (CDF), Brasília, Brazil

Current risk stratification strategies for coronary artery disease (CAD) have low predictive value in asymptomatic subjects classified as intermediate cardiovascular risk. This is relevant because not all coronary events occur in individuals with traditional multiple risk factors. Most importantly, the first manifestation of the disease may be either sudden cardiac death or acute coronary syndrome, after rupture and thrombosis of an unstable non-obstructive atherosclerotic plaque, which was previously silent. The inaccurate stratification using the current models may ultimately subject the individual to excessive or insufficient preventive therapies. A breakthrough in the comprehension of the molecular mechanisms governing the atherosclerosis pathology has driven many researches toward the necessity for a better risk stratification. In this Review, we discuss how metabolomics screening integrated with traditional risk assessments becomes a powerful approach to improve non-invasive CAD subclinical diagnostics. In addition, this Review highlights the findings of metabolomics studies performed by two relevant analytical platforms in current use—mass spectrometry (MS) hyphenated to separation techniques and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)—and evaluates critically the challenges for further clinical implementation of metabolomics data. We also discuss the modern understanding of the pathophysiology of atherosclerosis and the limitations of traditional analytical methods. Our aim is to show how discriminant metabolites originated from metabolomics approaches may become promising candidate molecules to aid intermediate risk patient stratification for cardiovascular events and how these tools could successfully meet the demands to translate cardiovascular metabolic biomarkers into clinical settings.

Keywords: risk stratification, coronary artery disease (CAD), metabolomics, atherosclerosis, cardiovascular prevention