



# O impacto da terapêutica de ressincronização cardíaca nas células produtoras de IL-17 circulantes em doentes com insuficiência cardíaca avançada

Efeito anti-inflamatório da terapêutica de ressincronização cardíaca

Sílvia Raquel Monteiro Martins

## Orientadores

Artur Augusto Paiva

Natália Sofia Cláudia António

Cândida Ascensão Teixeira Tomaz

Trabalho de natureza profissional no âmbito da área das Tecnologias de Diagnóstico e Terapêutica, apresentado ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do título de especialista, realizada sob a orientação científica dos Professores Doutores Artur Paiva, Natália António e Cândida Tomaz.

Fevereiro de 2019



## Nota Prévia

O trabalho apresentado corresponde-se a uma publicação científica, desenvolvida no âmbito do meu projeto e tese de Doutoramento em Bioquímica: “Processo inflamatório na insuficiência cardíaca crónica: o impacto da terapêutica de ressincronização cardíaca” a ser desenvolvido na Universidade da Beira Interior em parceria com o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Foi publicado no passado dia 27 de novembro de 2018 no *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology – Springer* (doi: 10.1007/s10840-018-0491-3) incluindo a seguinte ordem de autores e afiliações:

### **O impacto da terapêutica de ressincronização cardíaca nas células produtoras de IL-17 circulantes em doentes com insuficiência cardíaca avançada**

Subtítulo: Efeito anti inflamatório da terapêutica de ressincronização cardíaca

Sílvia Martins<sup>1,2</sup>, Tiago Carvalheiro<sup>3</sup>, Paula Laranjeira<sup>2,4</sup>, António Martinho<sup>3</sup>, Luís Elvas<sup>5,6</sup>, Lino Gonçalves<sup>5,6</sup>, Cândida Tomaz<sup>1,7</sup>, Natália António<sup>5,6</sup>, Artur Paiva<sup>2,4,8</sup>

<sup>1</sup> CICS-UBI – Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>3</sup> Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra, Instituto Português do Sangue e da Transplantação, Coimbra, Portugal

<sup>4</sup> Unidade de Citometria de Fluxo, Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>5</sup> Serviço de Cardiologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>6</sup> Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

<sup>7</sup> Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>8</sup> Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, Portugal

## Agradecimentos

Agradecemos o suporte financeiro do projeto PEst-OE/SAU/UI0709/2014.



## Resumo

**OBJETIVO:** As células produtoras de IL-17 circulantes têm sido implicadas no ambiente inflamatório da insuficiência cardíaca crónica (ICC) e associadas a um mau prognóstico da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da terapêutica de ressincronização cardíaca (TRC) na frequência e atividade funcional das células Th17 e Tc17, assim como a expressão de mRNA de IL-17 em doentes com ICC.

**MÉTODOS:** Foram incluídos neste estudo 28 doentes com ICC, avaliados antes da TRC (T0) e 6 meses após (T6), e 15 controlos saudáveis. As células Th17 e Tc17 do sangue periférico foram analisadas por citometria de fluxo e a quantificação do mRNA de IL-17 por PCR em tempo-real.

**RESULTADOS:** As células Tc17 tendem a estar mais elevadas nos doentes com ICC submetidos à TRC que nos controlos (0.92% (0.24-3.32) *versus* 0.60% (0.09-3.68), sem atingir significado estatístico. Depois da TRC, a frequência de células Tc17 diminui significativamente, chegando a níveis semelhantes aos encontrados no grupo controlo (HG) (0.92% (0.24-3.32) ao T0 *versus* 0.56% (0.21-4.20) ao T6,  $p < 0.05$ ), devido, maioritariamente, aos doentes que responderam à TRC. Além disto, a expressão do mRNA de IL-17 foi apenas detetada num pequeno número de doentes respondedores ao T0 (27%) e apenas detetado num doente respondedor ao T6 (7%). Inversamente, nos doentes não-respondedores, a expressão de mRNA de IL-17 aumenta da avaliação inicial (17%) para T6 (42%).

Relativamente às células Th17 não foram encontradas diferenças significativas entre o HG e os doentes com ICC ao T0 e ao T6.

**CONCLUSÃO:** A resposta inflamatória mediada pelas células produtoras de IL-17 do SP parece ser suprimida pela TRC, particularmente nos doentes respondedores.

## Palavras chave

Insuficiência cardíaca crónica; Terapêutica de ressincronização cardíaca; Células Th17; Células Tc17; Citocinas



## Abstract

**PURPOSE:** IL-17-producing T cells have been implicated in the inflammatory milieu of chronic heart failure (CHF), which implies a dismal prognosis in affected patients. The aim of this study was to evaluate the impact of cardiac resynchronization therapy (CRT) on the frequency and functional activity of Th17 and Tc17 cells, as well as, on IL-17 mRNA expression in patients with CHF.

**METHODS:** 28 patients with CHF, analysed before CRT (T0) and 6 months later (T6), and 15 healthy controls (HG) were enrolled in this study. Circulating Th17 and Tc17 cells were evaluated by flow cytometry. The quantification of IL-17A mRNA expression was performed by real-time PCR.

**RESULTS:** Circulating Tc17 cells tended to be higher in CHF patients submitted to CRT than in HG (0.92% (0.24-3.32) *versus* 0.60% (0.09-3.68), although not reaching statistical significance. The frequency of Tc17 cells in CHF patients significantly decreases after CRT reaching levels similar to those of HG (0.92% (0.24-3.32) at T0 *versus* 0.56% (0.21-4.20) at T6,  $p < 0.05$ ), mainly due to responders to CRT. Additionally, the expression of IL-17 mRNA was detected in a few number of responder patients at T0 (27%) and only detected in one responder at T6 (7%). Conversely, in non-responders, the proportion of patients exhibiting IL-17 mRNA expression increases from baseline (17%) to T6 (42%).

No significant differences were observed in Th17 cells between HG, CHF patients in T0 and patients in T6.

**CONCLUSION:** The inflammatory response mediated by circulating IL-17 producing cells seems to be suppressed by CRT, particularly in responders.

## Keywords

Chronic heart failure; Cardiac resynchronization therapy; Th17 cell; Tc17 cell; Cytokines





# Índice geral

Nota Prévia .....	III
Resumo .....	V
Abstract.....	VII
Índice geral.....	IX
Índice de figuras .....	XI
Lista de tabelas.....	XIII
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	XV
<b>1 Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Métodos .....</b>	<b>3</b>
2.1 População de doentes.....	3
2.1.1 Avaliação Ecocardiográfica.....	4
2.1.2 Definição da resposta à TRC.....	4
2.2 Grupo Controlo .....	4
2.3 Amostras de sangue.....	4
2.3.1 Estudos imunofenotípicos das subpopulações Th17 e Tc17 através de citometria de fluxo multiparamétrica .....	5
2.3.2 Aquisição e análise de resultados por citometria de fluxo .....	5
2.3.3 Análise da expressão genética .....	6
2.4 Análise estatística .....	6
<b>3 Resultados.....</b>	<b>7</b>
3.1 Evolução clínica.....	7
3.2 Frequência das células Th17 e Tc17 do sangue periférico nos doentes com insuficiência cardíaca	8
3.3 Caraterização funcional das células Th17 e Tc17 do sangue periférico em doentes com insuficiência cardíaca.....	10
3.4 Expressão de mRNA de IL-17 em células do sangue periférico em doentes com insuficiência cardíaca.....	11
<b>4 Discussão.....</b>	<b>13</b>
4.1 Limitações do estudo .....	15
<b>5. Referencias.....</b>	<b>17</b>



## Índice de figuras

**Figura 1** – Frequência de células Th17 e Tc17 produtoras de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  intracelulares..... 10

**Figura 2** – **A:** expressão de mRNA de IL-17 em células de sangue periférico (sangue total) de indivíduos saudáveis e doentes com insuficiência cardíaca, distribuídos de acordo com a resposta à terapêutica de ressincronização cardíaca. **B:** expressão de mRNA de IL-17 em células de sangue periférico (sangue total) de doentes com insuficiência cardíaca distribuídas de acordo com a resposta à terapêutica de ressincronização cardíaca ..... 11



## Lista de tabelas

**Tabela I** - Características dos doentes com IC envolvidos no estudo..... 7

**Tabela II** - Frequência de células Th17 entre células T CD4+ e de Tc17 entre células T CD8+, e quantidade de IL-17 per célula (MFI) nos diferentes grupos, após estimulação in vitro com PMA e Ionomicina ..... 9



## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

APC: alofocianina

BNP: peptídeo natriurético tipo B

CD: marcador de diferenciação (*cluster differentiation*)

FITC: isotiocianato de fluoresceína

G-CSF: fator estimulador de colónias de granulócitos

HFP: doentes com insuficiência cardíaca (*heart failure patients*)

HFP-T0: doentes com insuficiência cardíaca – avaliação inicial

HFP-T6 doentes com insuficiência cardíaca – avaliação após a TRC (*follow-up*)

hsCRP: proteína C-reativa de alta sensibilidade

IC: insuficiência cardíaca

ICC: insuficiência cardíaca crónica

IFN: interferão

IL: interleucina

LVEF: fração de ejeção do ventrículo esquerdo

LVEDV: o volume diastólico final do VE

LVESV: volume sistólico final do VE

MFI: intensidade média de fluorescência

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR: *real-time polymerase chain reaction*

RTqPCR: *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

NYHA: *New York Heart Association*

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PE: ficoeritrina

PerCP-Cy5.5: peridinina-clorofila-cianina 5.5

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato

RNA: ácido ribonucleico

ROR- $\gamma$ t: *RAR-related orphan receptor gamma- $\gamma$ t*

SP: sangue periférico

Tc: células T citotóxicas

Th: células T *helper*

T0: avaliação inicial

T6: avaliação após a TRC (*follow-up*)

TNF: fator de necrose tumoral

Treg: T regulador

TRC: terapêutica de ressincronização cardíaca

VE: ventrículo esquerdo



## 1 Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome fisiopatológica clínica complexa com um grande impacto na sociedade moderna devido à sua alta taxa de mortalidade e morbidade.[1, 2] As características histológicas da IC incluem a perda de células do miocárdio e a reestruturação da matriz extracelular. A fibrose do miocárdio pode ser provocada por vários fatores humorais tais como citocinas, fatores de crescimento e hormonas, sugerindo que a resposta imunológica e inflamatória desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão da IC.[3-7] As citocinas pró-inflamatórias podem ter um impacto adverso na função ventricular esquerda devido ao efeito inotrópico negativo e à indução da remodelação ventricular.[8]

As células mononucleares do sangue periférico (SP), tais como as células T e os monócitos, têm sido sugeridas como uma fonte importante na produção extensa e sistémica de citocinas.[7, 9] Tal como as células T *helper* (Th) 1, as células Th17 foram recentemente implicadas na origem de doenças inflamatórias crónicas e autoimunes, incluindo artrite reumatoide, esclerose múltipla, psoríase, e doença inflamatória intestinal.[10] Além disso, as células Th17 parecem possuir habilidades mais potentes na indução de doenças inflamatórias, comparando com as células Th1, estando descrito que a interleucina (IL) 17 tem uma participação importante na coordenação do processo inflamatório tecidual e no desencadeamento da ação de vários mediadores pró inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e matriz de metaloproteinases.[10, 11]

Atualmente já foi aceite o efeito patogénico do desequilíbrio Th1/Th2 no desenvolvimento da ICC, no entanto, a função das células Th17 e outras células produtoras de IL-17 permanece incerto e os resultados reportados têm sido contraditórios.[12-14] Foi descrito um desequilíbrio Th17/Tregulador (Treg) na ICC, caracterizado por aumento da frequência de células Th17 e diminuição da frequência de células Treg, sugerindo o envolvimento dessas células na patogénese da doença.[13] Pelo contrário, outro estudo não mostrou diferenças nas células Th17 circulantes entre doentes com ICC e indivíduos saudáveis.[15]

Semelhante às células Th17, uma nova subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IL-17 (Tc17) demonstrou estar aumentada em várias doenças crónicas, como urticária espontânea, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistémico.[16-18] No sangue periférico humano, as células Tc17 são co-reguladas com células Th17 durante a sua diferenciação [19, 20] e parece existir uma função cooperativa ou sinérgica entre células Th17 e Tc17 na imunidade mediada pelas células T.[19] Estas observações suportam a hipótese da participação das células Tc17 no ambiente inflamatório da ICC; no entanto, a função destas células na ICC ainda é desconhecida.

A terapêutica de ressincronização cardíaca (TRC) é um tratamento altamente reconhecido e altamente eficaz em doentes com ICC avançada, baseado em

dispositivos com o objetivo de restaurar a sincronia mecânica.[21, 22] Contudo, pelo menos 30% dos doentes submetidos à TRC não respondem a esta terapia.[23-25] Mais, alguns estudos mostraram uma redução nos mediadores inflamatórios em doentes com IC tratados com a TRC [26-28] e, em pequenos e médios estudos, essas observações foram encontradas principalmente em doentes que responderam ao tratamento.[29-31] Porém, o impacto da TRC nas células Th17 e Tc17 em doentes com ICC ainda é desconhecido. Desta forma, o nosso objetivo foi estudar o impacto da TRC nas células T produtoras de IL-17, avaliando a frequência e a atividade funcional das células Th17 e Tc17 em doentes com ICC submetidos à TRC, bem como a expressão de RNAm da IL-17 em leucócitos circulantes.

## 2 Métodos

### 2.1 População de doentes

Foram, prospectivamente, incluídos neste estudo vinte e oito doentes com insuficiência cardíaca avançada, marcados para TRC, entre 2010 e 2013; a média de idade foi de  $60,3 \pm 10,5$  anos, 18 doentes eram do sexo masculino e 10 do sexo feminino (Tabela 1). Os doentes foram assistidos e acompanhados no Serviço de Cardiologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

No momento da inclusão, todos os doentes estavam sob terapia farmacológica ótima e estável para ICC, que inclui um inibidor da enzima conversora da angiotensina ou bloqueador do recetor da angiotensina,  $\beta$ -bloqueador e antagonista da aldosterona, a menos que seja contra indicado ou não tolerado. Os critérios de inclusão foram: classe III ou IV de acordo com a NYHA (*New York Heart Association*); disfunção do ventrículo esquerdo (VE) com fração de ejeção do VE (LVEF)  $\leq 35\%$ ; QRS  $\geq 120$  ms com bloqueio do ramo esquerdo; e ritmo sinusal normal.[24, 25, 32, 33] Os critérios de exclusão incluíram condições que pudessem influenciar a resposta inflamatória: manifestação clínica ou bioquímica da presença de doença inflamatória concomitante; doentes sob medicamentos anti-inflamatórios não esteroides regularmente ou sob anticoagulantes; infeções ativas; doenças autoimunes ou malignas conhecidas; doença valvular grave ou cardiopatia congénita; choque cardiogénico; terapêutica inotrópica intravenosa contínua ou intermitente; gravidez; trombose venosa profunda ou embolia pulmonar; doença arterial periférica oclusiva grave; hipertensão arterial grave e não controlada (pressão arterial sistólica  $>180$  mmHg ou diastólica  $>110$  mmHg); co-morbidades associadas a uma expectativa de vida menor que 1 ano; trauma recente ou cirurgia ( $<1$  mês); hemorragia importante recente ( $<6$  meses) requerendo transfusão sanguínea; insuficiência renal (creatinina  $>2,0$  mg/dl); anemia (hemoglobina  $<8,5$  g/dl) ou trombocitopenia ( $<100000/l$ ); fibrilação atrial; cirurgia de revascularização coronária prévia; síndrome coronário agudo ou intervenção coronária percutânea em 3 meses; sistema TRC previamente implantado; consumo excessivo de álcool ou abuso de drogas ilícitas.

A elegibilidade do candidato foi garantida através da realização de uma avaliação inicial dos doentes com insuficiência cardíaca, programados para TRC, antes da implantação do dispositivo (T0).

Seis meses após a TRC (T6), os doentes foram reavaliados para as mesmas variáveis.

### 2.1.1 Avaliação Ecocardiográfica

Cada doente foi submetido a avaliação ecocardiográfica em T0 e T6. A ecocardiografia padrão foi realizada com transdutor harmónico de tecido *Vivid 7* (*GE Healthcare*, Oslo, Noruega) e 1,7/3,4-MHz. Loops e três ciclos cardíacos foram armazenados digitalmente e analisados *offline* usando um pacote de *software* personalizado (*EchoPAC*, *GE Healthcare*). O volume diastólico final do VE (LVEDV), o volume sistólico final do VE (LVESV) e a LVEF foram avaliados pela equação de *Simpson* biplano em vistas apicais de quatro-câmaras e duas-câmaras.

### 2.1.2 Definição da resposta à TRC

Classificámos como respondedores à TRC os doentes permaneceram vivos e que mostraram uma redução de pelo menos 15% no LVESV no seguimento de 6 meses (T6) em comparação com a linha de base (T0).[34-37]

## 2.2 Grupo Controlo

O grupo controlo foi composto por 15 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade (idade:  $54 \pm 12$  anos; sexo: 7 mulheres e 8 homens). Os critérios de inclusão envolvidos: perfil lipídico normal; massa corporal normal; e avaliação cardíaca normal. Os critérios de exclusão foram: história familiar de cardiopatia e/ou miocardiopatia; infeções ativas ou processo inflamatório; consumo de qualquer droga e/ou álcool; e incapacidade de compreender o consentimento informado.

## 2.3 Amostras de sangue

Na admissão, imediatamente antes do implante do dispositivo, foram colhidas amostras de sangue periférico aos doentes (em jejum) para análises bioquímicas (incluindo glicémia, creatinina, peptídeo natriurético tipo B (BNP), proteína C reativa de alta sensibilidade (hsCRP)) e parâmetros hematológicos. Foi também colhido sangue periférico a cada indivíduo em tubos de heparina e *Paxgene*, ao T0 e T6, para analisar os parâmetros inflamatórios e expressão de RNAm de IL-17.

### 2.3.1 Estudos imunofenotípicos das subpopulações Th17 e Tc17 através de citometria de fluxo multiparamétrica

A estimulação *in vitro* de células T do SP foi realizada como descrito por outros.[18]

Resumidamente, a partir do tubo de heparina, foram diluídos 500 µL de cada amostra de SP 1:1 (vol/vol), em meio RPMI-1640 (*Gibco, Life Technologies, Paisley, Escócia, Reino Unido*), suplementado com L-glutamina 2 mM. As células T foram estimuladas com 50 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (*Sigma, Saint Louis, MO, EUA*) e 1 µg/mL de ionomicina (*Sigma*); após a adição de 10 µg/mL de Brefeldin A (*Sigma*). As amostras foram incubadas durante 4 horas a 37°C, numa incubadora humidificada com 5% de concentração de CO<sub>2</sub>. De cada amostra de SP estimulada foram feitas alíquotas em três tubos diferentes (200 µL/tubo) e incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais: proteínas anti-CD3 peridínina-clorofila-cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5) (clone SK7; *Becton Dickinson Biosciences (BD), San Jose, CA, EUA*) e alofocianina anti-CD8 (APC) (clone B9.11; *Beckman Coulter - Immunotech, Marselha, França*). Em seguida, seguiu-se um protocolo de permeabilização celular, com *IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA)* e um protocolo de marcação intracitoplasmática, de acordo com as instruções do fabricante, com o objetivo de analisar a expressão intracelular de IL-17 conjugada com a ficoeritrina (PE) (clone 41802; *R & amp; D Systems, McKinley Place, MN, EUA*). As alíquotas de células foram também marcadas separadamente com IL-2 (clone MQ1-17H12; *BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA*), TNF-α (clone MAb11; *BD Pharmingen*) e interferon (IFN) -γ (clone 4S.B3 *BD Pharmingen*), todos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Finalmente, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (*Gibco BRL, Life Technologies, Viena, Áustria*) e depois adquiridas num citómetro de fluxo.

### 2.3.2 Aquisição e análise de resultados por citometria de fluxo

A aquisição de dados foi realizada num citómetro de fluxo *FACSCalibur (BD)* equipado com um laser de iões de argon e um laser de díodo vermelho.

Entre as células CD3 positivas, as células T positivas para CD4 foram identificadas pela ausência de CD8; e as células T positivas para CD8 foram identificadas pela co-expressão de CD3 e CD8. A produção de citocinas (IL-2, TNF-α e IFN-γ) foi avaliada em células positivas para IL-17, em células T CD4 + e CD8 +, em gate eletrónico CD3+ com pelo menos 20.000 eventos, após uma primeira etapa de aquisição no total de 20.000 eventos.

Os resultados ilustram a percentagem de células positivas dentro de cada subconjunto de células ou/e a sua intensidade de fluorescência média (MFI).

Os dados foram analisados usando o *software Infinicyt™, V.1.5 (Cytognos SL, Salamanca, Espanha)*.

### 2.3.3 Análise da expressão genética

A análise da expressão de mRNA de IL-17A em sangue total foi realizada a partir de uma amostra de SP colhida num tubo *PAXgene Blood RNA (PreAnalytiX GmbH, Suíça)* com purificação automática de RNA em *QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemanha)*. Um micrograma de RNA foi transcrito reversamente com o *iScript™ Supermix de Transcrição Reversa para RTqPCR (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA)*, de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação relativa da expressão génica por PCR em tempo real foi realizada usando um termociclador (*LightCycler 480 II; Roche, Basel, Suíça*). A normalização para a quantificação da expressão génica foi realizada com um kit humano *GeNorm Housekeeping Gene Selection (Primer Design, Southampton, Reino Unido)* e *software geNorm (Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Ghent, Bélgica)* de forma a selecionar os genes *housekeeping* ideais para este estudo.[38]

## 2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney U* para variáveis independentes. O teste *Wilcoxon signed-rank* foi usado para comparar T0 vs T6. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ou mediana. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas estatísticos *Statistical Package for the Social Sciences IBM SPSS 20 (IBM, Armonk, NY, EUA)* e *Graphpad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA)*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi <0,05.

## 3 Resultados

### 3.1 Evolução clínica

As características da população estudada na avaliação basal estão descritas na Tabela 1. Antes da TRC, 14,3% dos doentes (n=4) estavam na classe funcional IV segundo a NYHA e 85,7% (n=24) na classe III. No seguimento de 6 meses, a proporção de respondedores à TRC, segundo a definição ecocardiográfica, foi de 55,6%.

Tabela I - Características dos doentes com IC envolvidos no estudo

	População Global Média ± Desvio Padrão (n=28)	Respondedores Média ± Desvio Padrão (n=15)	Não-respondedores Média ± Desvio Padrão (n=13)	Valor p
<b>Avaliação de base (T0)</b>				
Idade (anos)	61.3 ± 10.5	65.2 ± 9.6	56.8 ± 9.8	0.011
Género (Masculino/Feminino)	18 / 10	9 / 6	9 / 4	0.989
Etiologia (Não-Isquémico/Isquémico)	22 / 6	12 / 3	10 / 3	0.308
NYHA (III/IV)	24 / 4	14 / 1	10 / 3	0.426
LVEF (%)	25.6 ± 7.0	24.9 ± 6.4	25.5 ± 7.6	0.274
LVESV (mL)	183.6 ± 95.8	178.4 ± 62.1	215.3 ± 124.6	0.465
LVEDV (mL)	235.5 ± 94.0	230.5 ± 64.0	264.1 ± 121.7	0.419
QRS	144.5 ± 31.0	138.8 ± 14.6	148.3 ± 38.6	0.447
hsCRP (mg/L)	5.8 ± 6.2	4.7 ± 4.3	7.0 ± 8.8	0.408
BNP (pg/mL)	262.9 ± 188.2	207.3 ± 126.1	324.2 ± 230.5	0.160
Colesterol (mg/dL)	184.6 ± 58.9	191.1 ± 60.0	171.1 ± 45.3	0.338
Triglicéridos (mg/dL)	134.5 ± 55.8	118.7 ± 51.0	143.1 ± 61.6	0.230
Ácido Úrico (mg/dL)	6.2 ± 1.7	5.7 ± 1.6	6.7 ± 1.9	0.149
<b>Depois da TRC (T6)</b>				
hsCRP (mg/L)	4.0 ± 4.6	2.7 ± 1.8	5.9 ± 6.7	0.118
BNP (pg/mL)	189.9 ± 295.0	80.3 ± 118.3	336.0 ± 395.3	<b>0.033</b>

NYHA: *New York Heart Association*; LVEF: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo; LVESV: Volume Sistólico Final do Ventriculo Esquerdo; LVEDV: Volume Diastólico Final do Ventriculo Esquerdo; hsCRP: Proteína C-Reativa de Alta Sensibilidade; BNP: Peptídeo Natriurético tipo-B.

Como demonstrado na Tabela 1, relativamente às características na avaliação basal, não houve diferenças estatisticamente significativas entre respondedores e não respondedores à TRC. Apesar da duração do QRS mais longa e dos níveis aumentados da hsCRP e BNP nos doentes não-respondedores, essas diferenças não foram estatisticamente significativas na avaliação basal, quando comparados com os respondedores. Após a TRC, os respondedores mostraram níveis de BNP significativamente menores em comparação com os não-respondedores. Durante os 6 meses de *follow-up*, um doente morreu (devido à IC) e nenhum foi transplantado.

### **3.2 Frequência das células Th17 e Tc17 do sangue periférico nos doentes com insuficiência cardíaca**

Como mostrado na Tabela 2, considerando todos os doentes com IC (HFP) em conjunto, a frequência de células Tc17 no início do estudo (HFP-T0) encontra-se tendencialmente aumentada em comparação com o grupo saudável (HG). A percentagem de células Tc17 também foi significativamente maior no HFP-T0 em comparação aos 6 meses após a TRC. Notavelmente, ao T6, a frequência do Tc17 diminuiu para os mesmos níveis observados no HG. No mesmo seguimento, um pequeno aumento na quantidade de IL-17 produzida no nível de célula única (MFI) nessas células foi observado em doentes com IC, tanto em T0 quanto em T6, comparado com o grupo controlo. Não foram observadas diferenças significativas nas células Th17 entre os três grupos estudados. A diminuição na frequência de células Tc17 desde o início até T6 é ainda mais significativa nos respondedores à TRC. Em relação à comparação entre respondedores e não respondedores à TRC, não encontramos diferenças estatisticamente significativas na frequência de células Tc17 ou Th17, quer na avaliação basal quer nos 6 meses de *follow-up*.



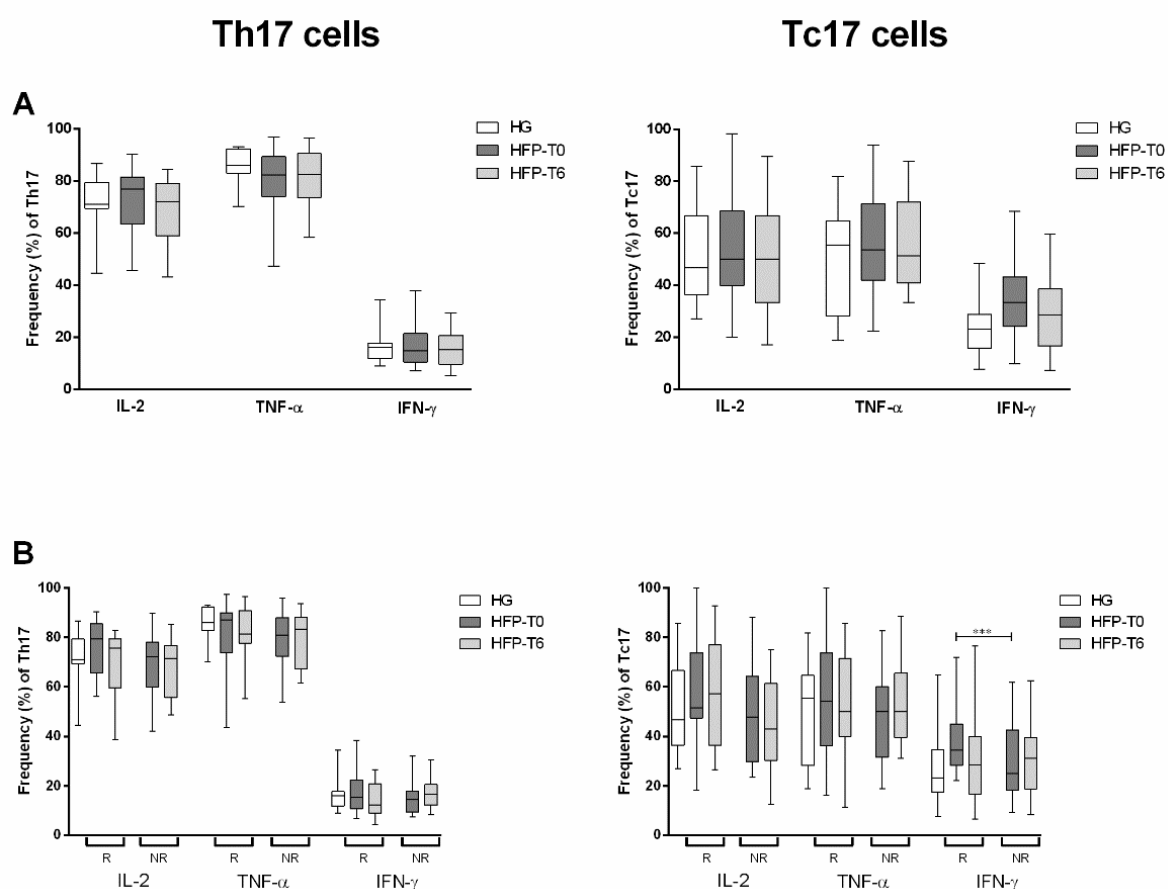
**Tabela II** - Frequência de células Th17 entre células T CD4+ e de Tc17 entre células T CD8+, e quantidade de IL-17 per célula (MFI) nos diferentes grupos, após estimulação *in vitro* com PMA e Ionomicina

	%Th17	IL-17 MFI nas células Th17	% Tc17	IL-17 MFI nas células Tc17
<b>HG (n=15)</b>	1.83 (0.28-3.70)	79.06 (44.72-364.33)	0.60 (0.09-3.68)	57.45 <b>(16.18-167.56)</b>
<i>Valores de p HG vs HFP-T0</i>	0.339	0.126	0.268	<b>0.007</b>
<b>HFP - T0 (n=28)</b>	1.66 (0.52-6.22)	111.53 (55.32-245.52)	<b>0.92</b> <b>(0.24-3.32)</b>	<b>87.20</b> <b>(31.02-210.71)</b>
<i>Valores de p HFP-T0 vs. HFP-T6</i>	0.716	0.509	<b>0.026</b>	0.412
<b>HFP - T6 (n=28)</b>	1.80 (0.10-6.49)	92.70 (38.99-476.49)	<b>0.56</b> <b>(0.21-4.20)</b>	<b>88.75</b> <b>(24.26-416.66)</b>
<i>Valores de p HG vs HFP-T6</i>	0.665	0.593	0.959	<b>0.050</b>
<b>Respondedores (n=15)</b>				
<i>Valores de p HG vs HFP-T0</i>	0.709	0.178	0.384	<b>0.004</b>
<b>HFP - T0</b>	1.39 (0.52-6.15)	100.61 (55.32-229.20)	<b>0.91</b> <b>(0.24-3.32)</b>	<b>117.82</b> <b>(31.02-210.71)</b>
<i>Valores de p HFP-T0 vs. HFP-T6</i>	0.865	0.532	<b>0.020</b>	0.334
<b>HFP - T6</b>	1.67 (0.26-4.26)	80.46 (51.11-236.35)	<b>0.37</b> <b>(0.21-2.10)</b>	83.35 (24.26-194.03)
<i>Valores de p HG vs HFP-T6</i>	0.836	0.852	0.604	0.120
<b>Não-respondedores (n=13)</b>				
<i>Valores de p HG vs HFP-T0</i>	0.189	0.205	0.300	0.102
<b>HFP - T0</b>	2.02 (0.63-6.22)	122.45 (58.93-245.52)	1.08 (0.28-2.18)	71.80 (32.23-179.08)
<i>Valores de p HFP-T0 vs. HFP-T6</i>	0.727	0.650	0.382	0.807
<b>HFP - T6</b>	1.92 (0.10-6.49)	117.80 (38.99-476.49)	0.64 (0.30-4.20)	88.94 (43.35-416.66)
<i>Valores de p HG vs HFP-T6</i>	0.580	0.447	0.628	0.069

Resultados expressos em mediana (mínimo-máximo). Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando  $p < 0,05$ . O teste de *Mann-Whitney U* foi usado para comparar HFP-T0 vs HG e HFP-T6 vs HG. O teste de *Wilcoxon signed-rank* foi usado para comparar HFP-T0 vs HFP-T6. HG: grupo controlo saudável; HFP-T0: Doentes com insuficiência cardíaca na avaliação inicial; HFP-T6: Doentes com insuficiência cardíaca 6 meses após o implante da terapia de ressincronização cardíaca (TRC).

### 3.3 Caracterização funcional das células Th17 e Tc17 do sangue periférico em doentes com insuficiência cardíaca

Considerando todos os doentes com IC em conjunto, não foram encontradas diferenças na frequência de células Th17 e Tc17 produtoras de IL-2, TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ , nem entre HG e HFP, nem na comparação entre T0 e T6. No entanto, os respondedores à TRC apresentaram no início do estudo uma percentagem aumentada de células Tc que co-expressam IFN- $\gamma$ + e IL-17+ em comparação com os não respondedores ( $p=0,045$ ) (Figura 1).



**Figura 1** - Frequência de células Th17 e Tc17 produtoras de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  intracelulares. A percentagem de células Th17 e Tc17 produtoras de citocinas foi avaliada em indivíduos saudáveis (HG, n=15) e doentes com insuficiência cardíaca (HFP, n=28) distribuídos da seguinte forma: (A) doentes totais na avaliação inicial (HFP-T0) e 6 meses após o implante da terapêutica de ressincronização cardíaca (HFP-T6); e (B) de acordo com a resposta à terapia de ressincronização cardíaca: pacientes respondedores (R) e não respondedores (NR). \*\*\* Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ . O teste *Mann-Whitney U* foi usado para comparar HFP-T0 vs HG e HFP-T6 vs HG. O teste de *Wilcoxon signed-rank* foi usado para comparar HFP-T0 vs HFP-T6.

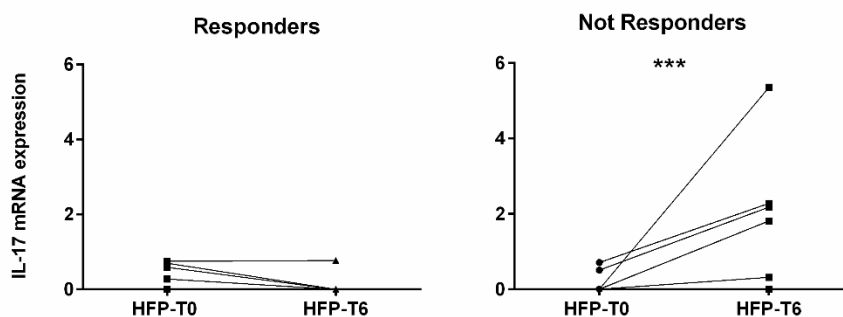
### 3.4 Expressão de mRNA de IL-17 em células do sangue periférico em doentes com insuficiência cardíaca

O mRNA de IL-17 foi detetado numa pequena proporção de doentes (22%, 6 em 27) e quase indetetável no HG (7%, 1 em 15) (Figura 2A).

A

	% of cases expressing IL-17 mRNA (n)	Median (minimum-maximum)*
<b>HG</b>	7% (1/15)	1.74 (-)
<b>HFP-T0</b>	22% (6/27)	0.65 (0.28-0.75)
<b>HFP-T6</b>	22% (6/27)	1.99 (0.32-5.35)
<i>According to response to cardiac resynchronization therapy</i>		
<b>HFP-T0</b>	27% (4/15)	0.65 (0.28-0.75)
<b>HFP-T6</b>	7% (1/15)	0.77 (-)
<b>HFP-T0</b>	17% (2/12)	0.61 (0.51-0.71)***
<b>HFP-T6</b>	42% (5/12)	2.18 (0.32-5.35)

B



**Figura 2 - A:** expressão de mRNA de IL-17 em células de sangue periférico (sangue total) de indivíduos saudáveis (HG, n=15) e doentes com insuficiência cardíaca (n=27), distribuídos de acordo com a resposta à terapêutica de resincronização cardíaca. Os resultados são expressos como percentagem (número de casos) em que a expressão de mRNA foi detetada por RT-PCR. \*Apenas considerando as amostras nas quais o mRNA de IL-17 foi detetado. \*\*\* Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ . O teste de *Mann-Whitney U* foi usado para comparar HFP-T0 vs HG e HFP-T6 vs HG. O teste de *Wilcoxon signed-rank* foi usado para comparar HFP-T0 vs HFP-T6. **B:** expressão de mRNA de IL-17 em células de sangue periférico (sangue total) de doentes com insuficiência cardíaca distribuídas de acordo com a resposta à terapêutica de resincronização cardíaca. \*\*\* Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ . O teste de *Wilcoxon signed-rank* foi usado para comparar HFP-T0 vs HFP-T6.

Nos respondedores à TRC, a expressão de mRNA da IL-17 foi detetada num pequeno número de doentes no início do estudo (27%, 4 em 15) e somente detetada num doente 6 meses após a TRC (7%, 1 em 15) (Figura 2A e B). Por outro lado, nos doentes não respondedores, a proporção de doentes que exibem expressão de RNAm de IL-17 aumenta desde o início (17%, 2 em 12) até T6 (42%, 5 em 12) (Figura 2A e B). Além disso, este aumento foi associado a uma maior expressão de mRNA de IL-17 em T6 em comparação com a avaliação de base ( $p = 0,043$ ) (Figura 2A).

## 4 Discussão

A ICC é caracterizada por um processo inflamatório crónico. As células T parecem fazer parte da resposta inflamatória durante a ICC, independentemente da sua etiologia.[9] Até à publicação deste trabalho, este estudo foi o primeiro a avaliar o impacto da TRC sobre as células Th17 e Tc17 do sangue periférico. Aqui, demonstramos que os respondedores à TRC exibem uma redução nas células Tc17 atingindo níveis semelhantes aos controlos saudáveis.

As células T estão envolvidas na patogénese da doença cardíaca, tanto pela citotoxicidade direta quanto pela potenciação das funções inflamatórias de outras células.[39] As células Th17 e/ou a IL-17 parecem estar envolvidas na manutenção da inflamação crônica na ICC,[13, 40-44] embora não existam estudos descrevendo a função das células Tc17 nas cardiopatias. Com base em estudos recentes feitos pelo nosso grupo, descrevendo o envolvimento das células Tc17 noutras doenças inflamatórias, considerámos relevante estudar o comportamento das células Th17 e Tc17 em doentes com IC avançada submetidos à TRC. [16-18]

Múltiplas evidências sugerem que a IL-17 exerce funções cruciais na patologia cardíaca.[40, 42, 43] A IL-17 consegue estimular células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e outras células a libertar citocinas massivas, como o fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF), IL-6 e metaloproteinase da matriz,[40, 41] e consequentemente, inibir a reconstrução do coração devido à formação de fibrose no miocárdio através de dissolução, quebra e redução da síntese de colagénio intercelular. Estudos feitos em modelos animais, levantaram a hipótese de que a IL-17 pode causar danos no coração através de vários mecanismos: através de efeitos tóxicos diretos nas células do miocárdio; redução nos níveis de cálcio intracelular no miocárdio; e aumento da atividade de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6 e IL-1 $\beta$ . Estes mecanismos podem originar hipertrofia cardíaca, aumento da necrose celular, apoptose acelerada do miocárdio e remodelação da matriz extracelular e, por fim, acelerar a progressão da insuficiência cardíaca.[41]

A TRC pode reduzir tanto a morbidade quanto a mortalidade num subgrupo de doentes com IC, no entanto, o modo pelo qual a TRC afeta o sistema imunológico ainda não é bem conhecido. Um estudo realizado num pequeno número de doentes com IC relata uma diminuição de marcadores inflamatórios, como IL-8, IL-6, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e peptídeo natriurético tipo B (BNP), 6 meses após a TRC.[45] No nosso trabalho, os níveis de células Th17 nos doentes com IC foram semelhantes aos níveis do grupo controlo. Esta evidência está de acordo com outro estudo que descreve resultados comparáveis nas frequências de células Th17 circulantes, em níveis séricos de IL-17 e na expressão de ROR (*RAR-related orphan receptor gamma*)- $\gamma$ t entre doentes com ICC e indivíduos saudáveis.[15] Todavia, considerando as células Tc17, observamos uma tendência para uma frequência aumentada entre os doentes com IC, em comparação com controlos saudáveis,

acompanhada por uma maior quantidade de IL-17 produzida per célula (MFI) nos doentes. Quando avaliamos os mesmos doentes com IC 6 meses após a TRC, encontramos uma diminuição significativa na frequência das células Tc17. Notavelmente, esta diminuição deve-se principalmente ao grupo respondedor, que mostrou uma diminuição significativa na frequência de células Tc17 do início (T0) para T6.

Estas observações parecem estar de acordo com o pequeno número de doentes respondedores nos quais foi detetada a expressão de mRNA de IL-17 e a manutenção/ diminuição dos níveis de mRNA observados após a TRC. Pelo contrário, encontramos um maior número de casos com deteção de mRNA de IL-17, bem como um aumento da expressão de mRNA de IL-17 entre T6 e T0, nos doentes não respondedores.

A diminuição das células T produtoras de IL-17 nos doentes com IC após o implante da TRC está possivelmente relacionada à redução do processo inflamatório inerente à ICC e, provavelmente, à melhora da função cardíaca. A definição de resposta à TRC baseada na remodelação reversa do VE tem sido utilizada nos principais ensaios clínicos sobre TRC. No entanto, o objetivo final da TRC é prolongar a sobrevida e/ou aliviar os sintomas da insuficiência cardíaca e uma resposta de remodelação reversa positiva à TRC não é necessariamente paralela a um desfecho favorável ou a um benefício sintomático.[46] Portanto, podemos especular que o efeito anti-inflamatório da TRC poderia ser considerado um marcador complementar útil a incluir numa composta definição de resposta à TRC.

Do ponto de vista funcional, as células Th17 são amplamente definidas pela produção de IL-17A e IL-17F, as quais têm a capacidade de recrutar neutrófilos, possuindo uma função pró-inflamatória.[47] As células Th17 também podem produzir várias outras citocinas inflamatórias, como IL-21, IL-22, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . [48] Na insuficiência cardíaca, o elevado *stress* da parede diastólica-final do ventrículo esquerdo provoca expressão de citocinas pelo miocárdio, que influenciam direta ou indiretamente o desempenho e a função contrátil do ventrículo esquerdo e a remodelação. As citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, levam à ativação de monócitos, enquanto a IL-2 leva à ativação das células T. Em conjunto, promovem a adesão dos monócitos às células endoteliais, com subsequente produção de citocinas e formação de radicais livres, exponenciando a inflamação, destruição dos tecidos e remodelação, e perda de função cardiovascular.[49] Na tentativa de avaliar o impacto da TRC sobre as respostas inflamatórias funcionais das células Th17 e Tc17 nos doentes com ICC, analisámos a frequência destas células produzindo não apenas IL-17, mas também IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , após estimulação *in vitro*. Não encontramos diferenças significativas na expressão de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  pelas células Th17 e Tc17 entre indivíduos saudáveis e doentes, em ambos os momentos de avaliação, mas os respondedores apresentaram uma expressão significativamente maior de IFN- $\gamma$  pelas células Tc17. As células Tc17 possuem uma alta plasticidade e podem-se converter em células duplamente produtoras de IL

17/IFN- $\gamma$  (células Tc17/IFN- $\gamma$ ), permitidas através da sinalização de IL12, com propriedades distintas da linhagem Tc1. Além disso, devido à sua atividade altamente citotóxica e anti-tumoral, as células Tc17/IFN- $\gamma$  foram implicadas em várias condições inflamatórias em humanos e modelos animais.[16, 17, 50] No caso de inflamação mediada por células T no coração, o IFN- $\gamma$  tem uma combinação complexa de efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, incluindo um *feedback* inibidor da ativação das células T e funções efetoras.[39] Uma vez que as células Tc17 apresentam uma maior plasticidade do fenótipo produtor de citocinas do que as células Th17, [51] podemos especular que esta maior plasticidade pode traduzir-se numa função patogénica diferente das células Tc17 na ICC e, pode explicar o porquê de apenas as células Tc17 serem reduzidas pela TRC.

Em suma, o nosso estudo evidencia novas perceções acerca do impacto da TRC sobre o comportamento imunológico das células Th17 e Tc17 em doentes com IC avançada. A resposta inflamatória mediada por células produtoras de IL-17 parece ser efetivamente reduzida pela TRC, particularmente por células Tc17, e esse benefício imunológico pode contribuir para a resposta positiva à TRC.

#### 4.1 Limitações do estudo

A principal limitação do nosso estudo é o pequeno número de amostras. No entanto, como a avaliação foi realizada em dois momentos diferentes (antes e depois da TRC), este estudo tem a força que cada doente serviu como seu próprio controlo. Outra limitação é o curto seguimento. Como a inflamação não foi reavaliada após 6 meses de acompanhamento, não sabemos se o possível efeito anti-inflamatório da TRC se mantém ao longo do tempo. Finalmente, não investigámos se as alterações nas células produtoras de IL-17 estavam associadas com o benefício clínico após TRC e estudos adicionais são necessários para avaliar se o alívio do estado inflamatório se traduz na melhoria do prognóstico após a TRC.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram não ter conflito de interesses.

### **Aprovação ética**

O estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsínquia de 1964 e com suas alterações posteriores ou padrões éticos comparáveis, e o protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comité de Ética local.

### **Consentimento informado:**

Todos os doentes estudados deram e assinaram o termo de consentimento informado, livre e esclarecido.



## 5. Referencias

1. Batista ML Jr, Lopes RD, Seelaender MC, Lopes AC. Anti-inflammatory effect of physical training in heart failure: role of TNF-alpha and IL-10. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93:643-651, 692-700.
2. Heymans S, Hirsch E, Anker SD, Aukrust P, Balligand JL, Cohen-Tervaert JW et al. Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail.* 2009;11:119-129.
3. Komamura K. Similarities and Differences between the Pathogenesis and Pathophysiology of Diastolic and Systolic Heart Failure. *Cardiol Res Pract.* 2013;2013:824135.
4. Athanassopoulos P, Vaessen LM, Maat AP, Balk AH, Weimar W, Bogers AJ. Peripheral blood dendritic cells in human end-stage heart failure and the early post-transplant period: evidence for systemic Th1 immune responses. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2013;25:619-626.
5. Berry C, Clark AL. Catabolism in chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2000;21:521-532.
6. Aukrust P, Ueland T, Muller F, Andreassen AK, Nordoy I, Aas H et al. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1998;97:1136-1143.
7. Yndestad A, Damas JK, Geir Eiken H, Holm T, Haug T, Simonsen S et al. Increased gene expression of tumor necrosis factor superfamily ligands in peripheral blood mononuclear cells during chronic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000;54:175-182.
8. Seixas-Cambao M, Leite-Moreira AF. Pathophysiology of chronic heart failure. *Rev Port Cardiol.* 2009;28:439-471.
9. Yndestad A, Holm AM, Muller F, Simonsen S, Froland SS, Gullestad L et al. Enhanced expression of inflammatory cytokines and activation markers in T-cells from patients with chronic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2003;60:141-146.
10. Evans HG, Gullick NJ, Kelly S, Pitzalis C, Lord GM, Kirkham BW et al. In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:6232-6237.
11. Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity.* 2009;30:92-107.
12. Yu Q, Watson RR, Marchalonis JJ, Larson DF. A role for T lymphocytes in mediating cardiac diastolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H643-651.

13. Li N, Bian H, Zhang J, Li X, Ji X, Zhang Y. The Th17/Treg imbalance exists in patients with heart failure with normal ejection fraction and heart failure with reduced ejection fraction. *Clin Chim Acta*. 2010;411:1963-1968.
14. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Inomata T, Machida Y, Osada K, Izumi T. Circulating levels of interleukin 18 reflect etiologies of heart failure: Th1/Th2 cytokine imbalance exaggerates the pathophysiology of advanced heart failure. *J Card Fail*. 2002;8:21-27.
15. Zhu ZF, Li JJ, Liu J, Tang TT, Ding YJ, Liao YH et al. Circulating Th17 cells are not elevated in patients with chronic heart failure. *Scand Cardiovasc J*. 2012;46:295-300.
16. Lopes A, Machado D, Pedreiro S, Henriques A, Silva I, Tavares B et al. Different frequencies of Tc17/Tc1 and Th17/Th1 cells in chronic spontaneous urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161:155-162.
17. Henriques A, Gomes V, Duarte C, Pedreiro S, Carvalheiro T, Areias M et al. Distribution and functional plasticity of peripheral blood Th(c)17 and Th(c)1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2013;33:2093-2099.
18. Henriques A, Ines L, Couto M, Pedreiro S, Santos C, Magalhaes M et al. Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Immunol*. 2010;264:97-103.
19. Hu Y, Ma DX, Shan NN, Zhu YY, Liu XG, et al. Increased number of Tc17 and correlation with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *PLoS One*. 2011;6(10):e26522.
20. Yen, HR, Harris TJ, Wada S, Grosso JF, Getnet D, et al. Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J Immunol*. 2009;183(11):7161-8.
21. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. 2012;14:803-869.
22. Curtis AB, Yancy CW, Albert NM, Stough WG, Gheorghide M, Heywood JT et al. Cardiac resynchronization therapy utilization for heart failure: findings from IMPROVE HF. *Am Heart J*. 2009;158:956-964.
23. Yu CM, Gorcsan J 3rd, Bleeker GB, Zhang Q, Schalij MJ, Suffoletto MS et al. Usefulness of tissue Doppler velocity and strain dyssynchrony for predicting left ventricular reverse remodeling response after cardiac resynchronization therapy. *Am J Cardiol*. 2007;100:1263-1270.
24. Steffel J, Rempel H, Breitenstein A, Schmidt S, Namdar M, Krasniqi N et al. Comprehensive cardiac resynchronization therapy (CRT) optimization in the real world. *Cardiol J*. 2014

25. Foley PW, Leyva F, Frenneaux MP. What is treatment success in cardiac resynchronization therapy? *Europace*. 2009;11 Suppl 5:v58-65.
26. Brouwers C, Spindler H, Larsen ML, Eiskær H, Videbæk L, et al. Association between psychological measures and brain natriuretic peptide in heart failure patients. *Scand Cardiovasc J*. 2012;46(3):154-62.
27. Michelucci A, Ricciardi G, Sofi F, Gori AM, Pirolo F, et al. Relation of inflammatory status to major adverse cardiac events and reverse remodeling in patients undergoing cardiac resynchronization therapy. *J Card Fail*. 2007;13(3):207-10.
28. Osmancik P, Herman D, Stros P, Linkova H, Vondrak K, et al. Changes and prognostic impact of apoptotic and inflammatory cytokines in patients treated with cardiac resynchronization therapy. *Cardiology*. 2013;124(3):190-8.
29. Lappegard KT, Bjørnstad H, Mollnes TE, Hovland A. Effect of Cardiac Resynchronization Therapy on Inflammation in Congestive Heart Failure: A Review. *Scand J Immunol*. 2015; 82(3):191-8.
30. Glick A, Michowitz Y, Keren G, George J. Neurohormonal and inflammatory markers as predictors of short-term outcome in patients with heart failure and cardiac resynchronization therapy. *Isr Med Assoc J*. 2006;8(6):391-5.
31. Shinohara T, Takahashi N, Saito S, Okada N, Wakisaka O, et al. Effect of cardiac resynchronization therapy on cardiac sympathetic nervous dysfunction and serum C-reactive protein level. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2011;34(10):1225-30.
32. Ramani GV, Uber PA, Mehra MR. Chronic heart failure: contemporary diagnosis and management. *Mayo Clin Proc*. 2010;85:180-195.
33. Jameel MN, Zhang J. Heart failure management: the present and the future. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:1989-2010.
34. Antonio N, Teixeira R, Lourenco C, Saraiva F, Coelho L, Martins R et al. Which echocardiographic definition should be used to define response to cardiac resynchronization therapy? *Rev Port Cardiol*. 2009;28:943-958.
35. Kydd AC, Khan FZ, Ring L, Pugh PJ, Virdee MS, Dutka DP. Development of a multiparametric score to predict left ventricular remodelling and prognosis after cardiac resynchronization therapy. *Eur J Heart Fail*. 2014;16(11):1206-13.
36. Doltra A, Bijmens B, Tolosana JM, Borrás R, Khatib M, Penela D et al. Mechanical Abnormalities Detected With Conventional Echocardiography Are Associated With Response and Midterm Survival in CRT. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7:969-979.
37. Rordorf R, Savastano S, Sanzo A, Spazzolini C, De Amici M, Camporotondo R et al. Tumor necrosis factor-alpha predicts response to cardiac resynchronization therapy in patients with chronic heart failure. *Circ J*. 2014;78:2232-2239.

38. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3:RESEARCH0034.
39. Lichtman AH. The heart of the matter: protection of the myocardium from T cells. *J Autoimmun.* 2013;45:90-96.
40. Cai YH, Ma ZJ, Lu XY, He EL, You MY. Study on the effect and mechanism of the dysfunction of CD4(+) T cells in the disease process of chronic cardiac failure. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9:682-687.
41. Li XF, Pan D, Zhang WL, Zhou J, Liang JJ. Association of NT-proBNP and interleukin-17 levels with heart failure in elderly patients. *Genet Mol Res.* 2016;15.
42. Sandip C, Tan L, Huang J, Li Q, Ni L, Cianflone K et al. Common variants in IL-17A/IL-17RA axis contribute to predisposition to and progression of congestive heart failure. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e4105.
43. Min X, Lu M, Tu S, Wang X, Zhou C, Wang S et al. Serum Cytokine Profile in Relation to the Severity of Coronary Artery Disease. *Biomed Res Int.* 2017;2017:4013685.
44. Milovanovic M, Pesic G, Nikolic V, Jevtovic-Stoimenov T, Vasic K, Jovic Z et al. Vitamin D deficiency is associated with increased IL-17 and TNFalpha levels in patients with chronic heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2012;98:259-265.
45. Lappegard KT, Bjornstad H. Anti-inflammatory effect of cardiac resynchronization therapy. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2006;29:753-758.
46. Yu CM, Bleeker GB, Fung JW, Schalij MJ, Zhang Q, et al. Left ventricular reverse remodeling but not clinical improvement predicts long-term survival after cardiac resynchronization therapy. *Circulation.* 2005;112(11):1580-6.
47. Hatton RD, Weaver CT. Duality in the Th17-Treg developmental decision. *F1000 Biol Rep.* 2009;1:5.
48. Mesquita Jr D, Cruvinel WM, Camara NO, Kallas EG, Andrade LE. Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42:476-486.
49. Adamopoulos S, Parissis JT, Kremastinos DT. A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2001;3:517-526.
50. Xu WH, Hu XL, Liu XF, Bai P, Sun YC. Peripheral Tc17 and Tc17/Interferon-gamma Cells are Increased and Associated with Lung Function in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin Med J. (Engl)* 2016;129:909-916.
51. Hayes MD, Ovcinnikovs V, Smith AG, Kimber I, Dearman RJ. The aryl hydrocarbon receptor: differential contribution to T helper 17 and T cytotoxic 17 cell development. *PLoS One.* 2014;9(9):e106955.