

Verônica Soares Monteiro

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE sCD40, sCD40L E s4-1BB
NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA AVANÇADA E APÓS O
TRANSPLANTE CARDÍACO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para a obtenção do título de
Doutora em Ciências.

São Paulo
2017

Verônica Soares Monteiro

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE sCD40, sCD40L E s4-1BB
NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA AVANÇADA E APÓS O
TRANSPLANTE CARDÍACO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de
Doutora em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola

Co-orientador:

Prof. Dr. Leuridan Cavalcante Torres

São Paulo

2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Monteiro, Verônica Soares

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE sCD40, sCD40L e s4-1BB
NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA AVANÇADA E APÓS O
TRANSPLANTE CARDÍACO / Verônica Soares Monteiro. - São Paulo,
2017.

xii, 55f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista
de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: EVALUATION OF SERUM LEVELS OF sCD40,
sCD40L and s4-1BB IN ADVANCED HEART FAILURE AND AFTER
HEART TRANSPLANT.

1. Insuficiência Cardíaca. 2. antígenos CD40. 3. ligante de CD40. 4.
Antígenos CD137 . 5. Rejeição de Enxerto . 6. Transplante de Coração.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TRANSLACIONAL

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Ana Luisa Godoy Fernandes

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Profa. Dra. Dulce Elena
Casarini

DOUTORADO INTERINSTITUCIONAL (DINTER)
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TRANSLACIONAL

Coordenadores doDINTER - Universidade Federal de São Paulo:

Prof. Dr. Nestor Schor
Profa. Dra. Dulce Elena Casarini
Profa. Dra. analysalles de azevedo melo

**Coordenadores doDINTER - Instituto de Medicina Integral Prof.
Fernando Figueira (IMIP):**

Profa. Dra. Leuridan Cavalcante Torres
Profa. Dra. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte
Prof. Dr. Jailson de Barros Correia

CAPES
2017

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Translacional C. A HART, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) sob o número de Processo APQ – 361-4.01/11.

Verônica Soares Monteiro

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE sCD40, sCD40L E s4-1BB
NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA AVANÇADA E APÓS O
TRANSPLANTE CARDÍACO**

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Presidente da banca

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sandro Gonçalves de Lima

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Flávio Roberto Azavedo de Oliveira

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira - IMIP

Profa. Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro

Fundação Osvaldo Cruz - FIOCRUZ

Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais, Raimundo e Rita, eternos exemplos de idoneidade, perseverança e amor ao próximo. Por terem me ensinado os verdadeiros valores da vida...”

AGRADECIMENTOS

Agradecerei até o fim da minha vida ter encontrado uma pessoa como minha co-orientadora Leuridan Torres. Admiração, respeito e devoção! Transformou o “impossível” no “factível” com leveza e competência ímpar. Devo a conclusão deste doutorado a este ser humano que merece todos os aplausos.

Ao meu orientador, Dr. Angelo de Paola que me encantou desde o primeiro contato. O meu agradecimento pela oportunidade de realizar este trabalho e por acreditar sempre em mim.

Ao Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, na pessoa de Dr. Gilliat Falbo e Dr. Amaro Medeiros de Andrade, pela viabilização desta pós-graduação que me trouxe tamanho engrandecimento profissional.

Ao Departamento de Cardiologia de Adultos do IMIP que entendeu minhas ausências e me apoiou incondicionalmente. À Cardio IMIP Hospitalar, equipe que me inspira e me faz querer mais e mais a cada dia.

Ao Departamento de Cirurgia Cardíaca do IMIP, em especial os médicos residentes Jeú Delmondes, Felipe Walter e João Paulo Segundo pelas coletas dos materiais e sinalizações de candidatos à minha pesquisa. Ao chefe do departamento, Dr. Fernando Figueira, que transformou a história do transplante cardíaco em Pernambuco e nos apresentou a excelência do seu trabalho.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE grants No. APQ – 361-4.01/11) pelo financiamento das análises laboratoriais realizados nesta pesquisa.

Ao Laboratório de Pesquisa Translacional Anthony Hart do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, em especial à Marina Matta que se dedicou particularmente a este projeto.

Por fim, agradeço principalmente à minha família (meus pais Raimundo e Rita, minhas irmãs Ana Luiza e Suely, meu filho Guilherme, meu marido Julio, minha Zizinha e meus sogros Emilia e Fred). Vocês serão sempre a minha fortaleza e meu bem maior....

Sumário

Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xii
Lista de siglas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Insuficiência Cardíaca	1
1.2 Transplante Cardíaco.....	2
1.3 Rejeição cardíaca.....	5
1.4 Proteína C Reativa (PCR), mediadores inflamatórios sCD40, sCD40L e s4-1BB e doença cardiovascular	9
1.5 Mediadores inflamatórios e transplante	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 Tipo do estudo.....	15
3.2 Local e período do estudo.....	15
3.3 População de estudo.....	15
3.4 Critérios de elegibilidade.....	16
3.4.1 Critério de inclusão.....	16
3.4.2 Critério de exclusão.....	16
3.5 Fluxograma de captação dos pacientes	16
3.6 Técnica de coleta, processamento e armazenamento das amostras de sangue	18
3.7 Determinação da concentração sérica de sCD40, sCD40L e s4-1BB.....	18
3.8 Variáveis clínicas, biológicas e laboratoriais.....	19
3.8.1 Variáveis clínicas.....	19
3.8.2 Variáveis biológicas.....	20
3.8.4 Variáveis laboratoriais.....	20
3.9 Esquemas de imunossupressão.....	21
3.10 Análise Estatística	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Análises das características clínicas dos pacientes submetidos a transplante cardíaco	23
4.2 Análises das concentrações séricas de sCD40, sCD40L e s4-1BB na insuficiência cardíaca antes e após o transplante	25
4.3 Análises das características clínicas e laboratoriais dos pacientes com e sem rejeição no transplante cardíaco	28
4.4 Análises das concentrações séricas de sCD40, sCD40L e s4-1BB	29

dos pacientes com e sem rejeição	
4.5 Análises dos índices de sCD40/PCR, sCD40L/PCR e s4-1BB/PCR dos pacientes com ou sem rejeição	31
4.6 Análises das concentrações séricas de sCD40, sCD40L e s4-1BB de acordo com a etiologia da miocardiopatia dilatada	34
4.7 Análises das concentrações séricas de sCD40, sCD40L e s4-1BB no transplante de acordo com o esquema terapêutico	35
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÕES.....	44
7. REFERÊNCIAS.....	45
Apêndice	
Anexo	

Lista de figuras

- Figura 1** Número de transplantes realizados no Brasil por ano de realização
- Figura 2** Número de transplantes realizados por estado entre janeiro e junho de 2016
- Figura 3** Número de transplantes realizados por estado por milhão de população, entre janeiro e junho de 2017
- Figura 4** Achados histopatológicos de biópsia endomiocárdica: ausência de rejeição
- Figura 5** Achados histopatológicos de biópsia endomiocárdica: rejeição grave (3R) caracterizada pelo dano dos miócitos
- Figura 6** CD40/CD40L e inflamação
- Figura 7** Resposta inflamatória mediada por linfócitos T e expressão do 4-1BB
- Figura 8** Fluxograma da pesquisa
- Figura 9** Análises dos níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB dos pacientes com IC no antes e após transplante e nos controles saudáveis
- Figura 10** Análise pareada dos níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB dos pacientes no pré e pós-transplante
- Figura 11** Análises dos níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB dos pacientes com rejeição ou sem rejeição e dos controles saudáveis
- Figura 12** Valores dos índices de sCD40/PCR, sCD40L/PCR e s4-1BB/PCR dos pacientes com rejeição ou sem rejeição e dos controles saudáveis
- Figura 13** Valores dos índices de sCD40/PCR, sCD40L/PCR e s4-1BB/PCR dos pacientes com rejeição ou sem rejeição
- Figura 14** Análise dos números de pacientes com e sem rejeição que apresentaram valores abaixo ou acima da mediana encontrada dos índices de sCD40/PCR, sCD40L/PCR e de s4-1BB/PCR

Lista de tabelas

- | | |
|-----------------|--|
| Tabela 1 | Descrição de frequência de características biológicas e clínicas dos pacientes com IC submetidos a transplante cardíaco |
| Tabela 2 | Análises das frequências de características biológicas e clínicas dos pacientes submetidos a transplante cardíaco com e sem rejeição. |
| Tabela 3 | Análises laboratoriais nos pacientes com e sem rejeição submetidos a transplante cardíaco. |
| Tabela 4 | Análises dos níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB nos pacientes com etiologia chagásica da miocardiopatia dilatada no pós transplante cardíaco |
| Tabela 5 | Análise dos níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB, e das relações Neutrófilos/Linfócitos e Plaquetas/Linfócitos dos pacientes no pós-transplante de acordo com o esquema de imunossupressão utilizado |

Lista de siglas

IC	Insuficiência Cardíaca
BNP	Peptídeo Natriurético Atrial
C	Controles saudáveis
CF	Classe funcional
CH	Chagas
DP	Desvio padrão
IQR	Interquartil
FE	Fração de Ejeção
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
SUS	Sistema Único de Saúde
ISHLT	Internacional Society of Lung and Heart Transplantation
NYHA	New York Heart Association
PCR	Proteína C Reativa
RNL	Relação ou Índice Neutrófilos/linfócito
RPL	Relação ou Índice Plaquetas/linfócito
SUS	Sistema Único de Saúde
Tx	Transplante
HFSS	Heart Failure Survival Score
SHFM	Seattle Heart Failure Model
ELISA	<i>Enzymeimmunosorbentassay</i>
IL	Interleucina
VD	Ventrículo direito
TNF	Fator de necrose tumoral

Resumo

Monteiro V S. **AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE sCD40, sCD40L E s4-1BB NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA AVANÇADA E APÓS O TRANSPLANTE CARDÍACO.** São Paulo 2017. [Tese] Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Introdução: Insuficiência cardíaca (IC) é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Embora grandes avanços tenham sido alcançados no tratamento, o prognóstico da IC avançada é reservado, sendo o transplante cardíaco a principal terapia para esse estágio de doença. A rejeição tem grande responsabilidade na mortalidade dos pacientes transplantados e o método de diagnóstico é invasivo por meio de biópsia endomiocárdica. Sabe-se da associação da resposta inflamatória tanto na doença cardiovascular como no desenvolvimento de rejeição de órgãos. **Objetivo:** Avaliar os níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB na insuficiência cardíaca avançada e após o transplante cardíaco. **Métodos:** Foram estudados prospectivamente 38 pacientes com IC e submetidos a transplante cardíaco no período de agosto de 2015 a setembro de 2016 no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). Quinze pacientes tiveram marcadores inflamatórios dosados no ante e após transplante e dezessete tiveram a dosagem apenas no pós-transplante. Foram incluídos seis pacientes com rejeição aguda ao enxerto. Destes, quatro pacientes apresentaram rejeição em biópsia cardíaca antes mesmo da biópsia protocolar de 30 dias e quatro apresentaram rejeição durante o *followup*. O grupo controle foi composto por 19 indivíduos saudáveis com idade entre 18 e 60 anos sem história clínica de doença cardiovascular ou outras comorbidades. A dosagem no plasma de s4-1BB, sCD40L e sCD40 foi realizada por *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Testes de Mann-Whitney foram usados para análise de medianas entre os grupos e de Wilcoxon para análise pareadas. As variáveis de distribuição normal foram apresentadas em média e desvio padrão. Foi utilizado o teste *t* para a comparação das médias entre grupos. Foi considerado significativo valores de $p < 0.05$. Toda a análise estatística foi realizada através do GraphPadPrism v6.0 **Resultado:** A rejeição ocorreu em 2 (6,26%) dos pacientes estudados dentro dos primeiros 30 dias após o transplante cardíaco. Não houve

diferença significativa entre idade, sexo, comorbidades como hipertensão ou diabetes e etiologia da miocardiopatia dilatada nos grupos com e sem rejeição. Níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB foram significativamente maiores nos pacientes com IC avançada com relação aos controles saudáveis ($p < 0,0001$ para todos). Não houve diferença nos níveis séricos sCD40 ($p = 0,74$) e sCD40L ($p = 0,44$) entre os grupos com e sem rejeição. Os níveis de s4-1BB foram reduzidos de forma significativa nos pacientes com rejeição aguda quando comparados ao sem rejeição ($p = 0,02$). Os índices sCD40/PCR e s4-1BB/PCR foram significativamente elevados no grupo com rejeição ($p = 0,02$ e $p = 0,0001$). **Conclusão:** Concluiu-se que o sCD40, sCD40L e s4-1BB são marcadores de doença cardíaca descompensada. O s4-1BB pode ser um potencial biomarcador de rejeição aguda do miocárdio. A associação de sCD40 e s4-1BB com a proteína C reativa apresenta ser um boa estratégia de análise na doença grave do miocárdio.

Palavras chaves: Insuficiência cardíaca – Antígenos CD40 – Ligante de CD40 – Antígenos CD137 – Rejeição de enxerto – Transplante de coração

Abstract

Monteiro V S. **EVALUATION OF SERUM LEVELS OF sCD40, sCD40L and s4-1BB in advanced heart failure and after heart transplant.** São Paulo 2017. [Tesis] Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Heart failure is one of the most important problems in public health. Although big advances had been reached in treatment, the prognosis of advanced heart failure is still reserved and the heart transplant is the main therapy for this stage of disease. Allograft rejection is responsible for mortality in transplantation patients and the diagnosis of this complication is made through an invasive diagnostic method – the cardiac biopsy. The inflammatory response has been described in cardiovascular disease and in allograft rejection process. The objective of this study is to evaluate levels of sCD40, sCD40L and s4-1BB in advanced heart failure and post heart transplant. The study population comprised 38 patients undergoing heart transplant between september, 2015 and september, 2016 at Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife, Pernambuco, Brazil. Fifteen patients had biomarkers dosed before heart transplant and seventeen patients had dosed just after procedure. Four patients were enrolled in the study for clinical suspicion of rejection confirmed by cardiac biopsy and other two patients were submitted to biopsy before 30 days of transplant because had clinical suspicion of rejection. Nineteen health persons composed the control group with age between 18 and 60 years. Plasma dosage of sCD40, sCD40L e s4-1BB was made by *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Mann-Whitney test, Wilcoxon and t test were used to analyse dates. Statistical analysis used *GraphPad® Prism6* and the value $p < 0,05$ was considered statistical significant.

Allograft rejection occurred in 6,26% of studied patients. There was no statistical difference in age, sex, comorbidities as hypertension, diabetes or etiology of cardiomyopathy. Serum levels of sCD40, sCD40L e s4-1BB were higher in patients with advanced heart failure comparing to controls ($p < 0,0001$). There was no difference in these levels of sCD40 ($p = 0,74$) e sCD40L ($p = 0,44$) between groups with and without rejection. Levels of s4-1BB were significantly lower in patients with allograft rejection ($p = 0,02$). The sCD40/PCR and s4-1BB/PCR indexes were significantly higher in the group of patients with allograft rejection ($p = 0,02$ e $p = 0,0001$). We concluded that sCD40, sCD40L e s4-1BB are biomarkers of severe heart failure. The serum level of s4-1BB could be a potential biomarker of allograft rejection and the association of sCD40 and s4-1BB with PCR could be a better strategy to this.

Key words: Heart failure – sCD40 – CD40L – CD-137 - Allograft rejection – Heart transplant

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insuficiência Cardíaca

Insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica caracterizada por dispnéia aos esforços, edema de membros inferiores e fadiga, resultado de alteração estrutural ou funcional do coração¹. Trata-se da via final da maioria das doenças que acomete o coração, sendo um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo².

Na América latina, a incidência de IC é de 199 novos casos para cada 100.000 habitantes por ano³. No Brasil, é a principal causa cardiovascular de internação hospitalar, sendo responsável, em 2007, por 2,6% de todas as hospitalizações do SUS no Brasil². Sua prevalência é extremamente elevada, atingindo 1% da população mundial e até 10% dos indivíduos maiores que 70 anos de idade². Estima-se crescimento de aproximadamente 46% na prevalência de IC entre 2012 e 2030, fato esse relacionado ao aumento na expectativa de vida⁴.

A principal causa de insuficiência cardíaca no Brasil é a miocardiopatia dilatada de etiologia isquêmica seguido da hipertensiva, idiopática, valvar e chagásica⁴. Em diferentes regiões do país, existe diferença de distribuição de acordo com a etiologia da mesma. No nordeste do país, a miocardiopatia isquêmica também é a mais prevalente, entretanto, a miocardiopatia idiopática ultrapassa a hipertensiva com relação à prevalência na região⁴.

Existem diversos tipos de classificação da IC. As classificações mais comumente utilizadas são: (i) Por tempo do início dos sintomas em aguda e crônica; (ii) Por fração de ejeção (FE) de ventrículo esquerdo em IC FEn (normal), IC FEr (reduzida) e IC FEmr (moderadamente reduzida); (iii) Por severidade dos sintomas e grau de tolerância ao esforço físico – classe funcional (CF) pela NYHA (New York Heart Association) – variando de I a IV¹. Pacientes em classe funcional III e IV são também denominados pacientes com IC avançada, ou seja, aqueles com sintomas graves, descompensações frequentes e significativa disfunção ventricular¹, sendo esses pacientes a população de estudo neste trabalho.

Embora grandes avanços tenham sido alcançados nas últimas décadas no tratamento da IC, o prognóstico de pacientes com IC avançada ainda continua

reservado com alto índice de hospitalizações e mortalidade elevada⁴. Pacientes hospitalizados com IC têm mortalidade em um ano estimada em 17% e, nesse estágio de doença, pouca efetividade existe em termos de tratamento clínico¹.

Diversos escores preditivos de sobrevida são utilizados para pacientes com IC crônica, sendo o *Heart Failure Survival Score* (HFSS) e *Seattle Heart Failure Model* (SHFM), os mais utilizados⁶. Esses escores ajudam na decisão da inclusão na lista de transplante cardíaco, terapia esta, consagrada para casos de IC avançada⁶.

1.2 Transplante Cardíaco

O transplante (Tx) cardíaco é a principal terapia para a IC avançada refratária ao tratamento clínico. Nesse estágio da doença, somente essa terapêutica é capaz de melhorar qualidade de vida dos pacientes, além de oferecer maior sobrevida aos mesmos.⁷

O primeiro Tx em seres humanos foi realizado em 1967 pelo cirurgião cardiovascular Christiaan Neethling Barnard, na Cidade do Cabo, África do Sul. Esse foi o primeiro Tx cardíaco homólogo ortotópico no mundo e que teve uma sobrevida de apenas 17 dias⁸.

No Brasil, em 26 de março de 1968, o Professor E. J. Zerbini realizou em São Paulo, o primeiro Tx cardíaco da América Latina com sucesso. O paciente era portador de miocardiopatia dilatada de etiologia chagásica⁸. Desde então, a técnica do procedimento tem sido aprimorada com um número crescente a cada ano (Figura 1), assim como o tratamento imunossupressor, reduzindo drasticamente o número de complicações relacionadas ao procedimento⁶. Em Pernambuco, o primeiro Tx de coração foi realizado em agosto de 1991 por Dr. Carlos Moraes, cirurgião cardiovascular atuante até os dias atuais.

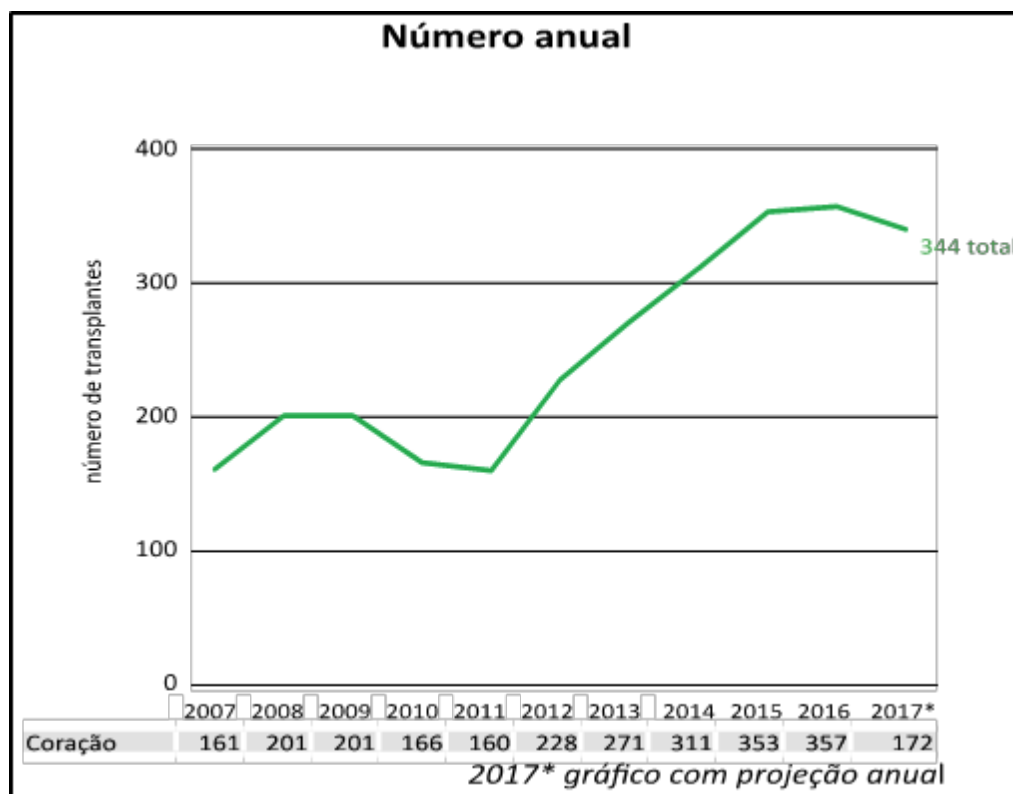


Figura 1 – Número de transplantes realizados no Brasil por ano de realização.
 Fonte: Registro brasileiro de transplante: ano XXIII n.º 2⁹

Atualmente (2017), o Estado de Pernambuco ocupa o segundo lugar entre os estados que mais realizam esse tipo de procedimento no Brasil⁹ (Figura 2). O Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) iniciou o programa de transplante cardíaco em junho de 2012 e hoje tornou-se o terceiro segundo centro transplantador de coração do Brasil⁹. Foram realizados desde o início do programa até setembro de 2016, 102 transplantes de coração com uma mortalidade de 14,3% neste último ano – taxa esta que se equivale à de países do primeiro mundo¹⁰. Em termos proporcionais ao número de habitantes do estado, Pernambuco ocupa o segundo lugar em número de transplantes no Brasil, estando atrás apenas do Distrito Federal (Figura 3).

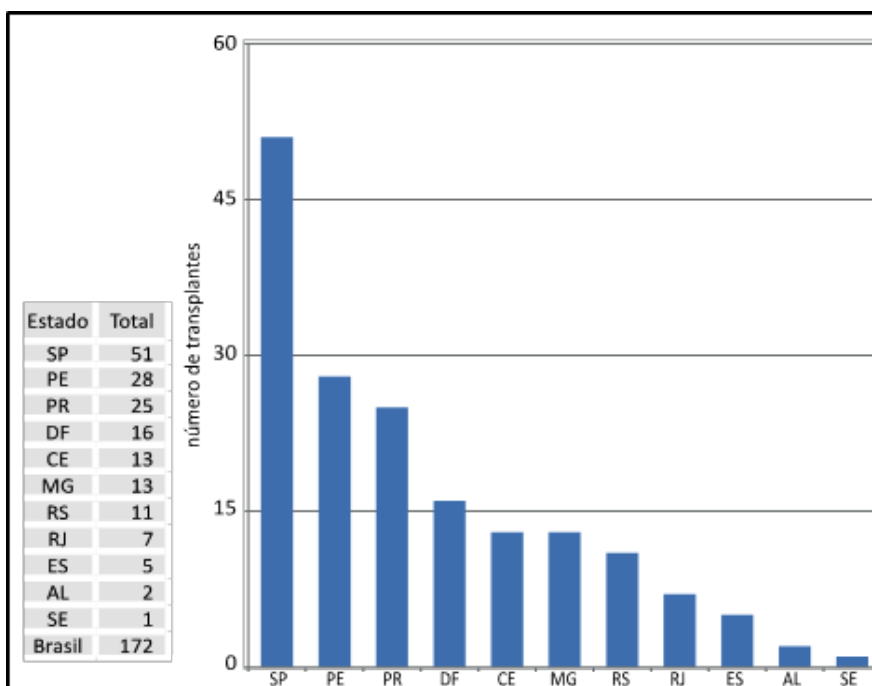


Figura 2 - Número de transplantes realizados por estado entre janeiro e junho de 2017. Fonte: Registro brasileiro de transplante: ano XXIII n^o 2.⁹

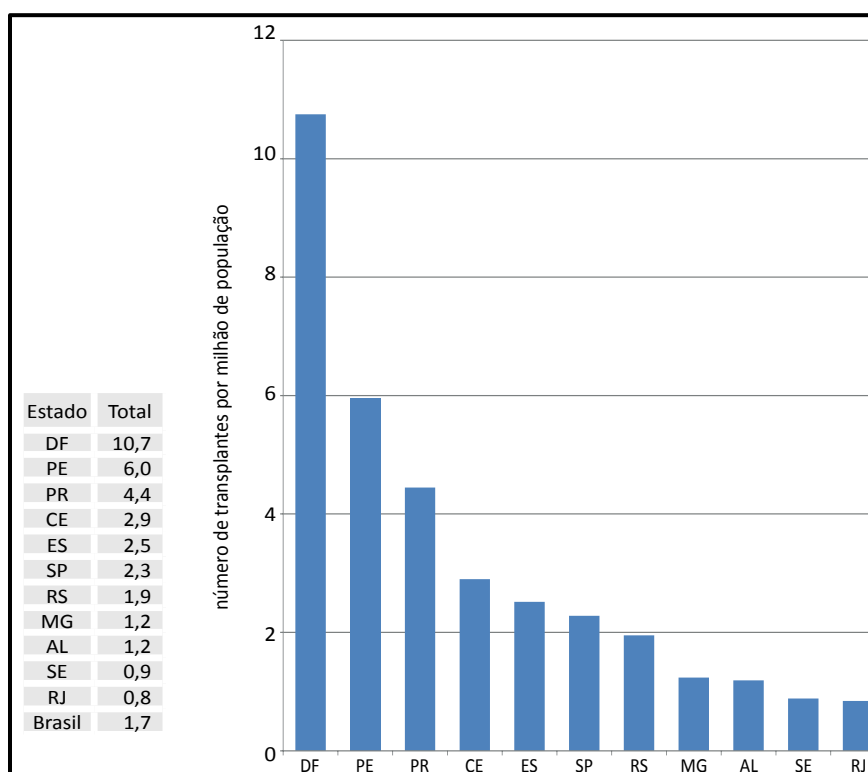


Figura 3 – Número de transplantes realizados por estado por milhão de população, entre janeiro e junho de 2017. Fonte: Registro brasileiro de transplante: ano XXIII n^o 2.⁹

O Tx de coração está indicado quando o paciente é portador de IC classe funcional IV da NYHA e é refratário a terapia clínica convencional^{6,7}. De acordo com a II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco, é considerado classe I de indicação aos seguintes pacientes: (i) IC refratária na dependência de drogas inotrópicas e/ou de suporte circulatório e/ou ventilação mecânica; (ii) Ventilação de Oxigênio (VO₂) pico ≤ 10 ml/Kg/min; (iii) Doença isquêmica com angina refratária sem possibilidade de revascularização; (iv) Arritmia ventricular refratária; (v) Classe funcional III/IV persistente^{6,7}.

É considerado classe IIa de indicação aos seguintes pacientes: (i) Teste da caminhada dos 6 minutos < 300 metros; (ii) Uso de beta bloqueador com VO₂ pico ≤ 12 ml/Kg/min; (iii) Sem uso de beta bloqueador com VO₂ pico ≤ 14 ml/Kg/min; (iv) teste cardiopulmonar com relação VE/ VCO₂ > 35 e VO₂ pico ≤ 14 ml/Kg/min⁶.

As complicações relacionadas à fase precoce ou tardia do transplante interferem diretamente na sobrevida dos pacientes. Doenças como Diabetes, dislipidemia, hipertensão, osteoporose, complicações infecciosas, malignidade e insuficiência renal estão entre as principais complicações⁶.

A sobrevida pós-transplante é variável nos diferentes centros e países. Segundo dados da ISHLT, a sobrevida em 1 ano dos pacientes transplantados na América Latina é em torno de 70%⁹. As complicações em curto e médio prazo impactam diretamente na sobrevida dos mesmos, dentre elas, destaca-se a rejeição aguda e grave⁶.

1.3 Rejeição cardíaca

A despeito de significativo aprimoramento na terapia imunossupressora, a rejeição, que ocorre principalmente no primeiro ano após o transplante cardíaco, ainda é uma das principais responsáveis pela mortalidade dos pacientes transplantados.¹¹

O esquema tríplice incluindo corticosteróides, inibidor da calcineurina e anti-proliferativo ainda é o mais aceito e universalmente utilizado⁶. Os corticosteroides são utilizados em altas doses na fase inicial do transplante cardíaco e, em geral,

mantido até o sexto mês após o procedimento. Atuam regulando função de leucócitos, citocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento⁶.

Os inibidores da calcineurina são a ciclosporina e o tacrolimus. O mecanismo de ação dessas drogas é a inibição da síntese de IL-2 pela célula T. O tacrolimus é o inibidor da calcineurina mais utilizado em nosso meio, com a vantagem de menor incidência de efeitos colaterais e, em alguns estudos, diminuição de rejeição do enxerto¹².

Os antiproliferativos são representados pela azatioprina e micofenolato. Estudos comparativos entre essas duas drogas têm demonstrado superioridade do micofenolato em relação à incidência de rejeição. Em relação a pacientes chagásicos, existe dúvida desse benefício uma vez que estudos demonstraram maior percentual de reativação de doença de chagas em usuários de micofenolato em relação aos que usavam azatioprina.^{13,14,15,16}

Uma quarta classe de drogas imunossupressoras pode ser utilizada em substituição aos inibidores da calcineurina, que são os inibidores do sinal de proliferação, classe à qual pertencem o sirolimus e o everolimus. Essas drogas interferem com inúmeros mecanismos no sistema imune, como proliferação celular, apoptose, produção de mediadores inflamatórios⁶. É a classe mais nova dos imunossupressores e ainda não entra na maioria dos esquemas terapêuticos no Brasil⁶. A adequada terapia imunossupressora é fundamental para a manutenção do enxerto e menor chance de complicações relacionadas à rejeição¹¹.

A rejeição pode ser classificada de acordo com o padrão de resposta imune estabelecida contra o enxerto, que pode ser celular, humoral ou mista. A rejeição celular é caracterizada por infiltrado inflamatório linfo-histiocitário nos seus mais variados graus. Classificada em três tipos de acordo com a agressividade desse infiltrado inflamatório (1R: infiltrado pouco exuberante, sem acometimento de cardiomiócitos ou com foco único; 2R: dois ou mais focos de agressão dos cardiomiócitos e 3R: infiltrado polimorfo podendo ocorrer vasculite, hemorragia e necrose de miócitos)⁶. A mudança terapêutica depende dos achados histopatológicos associados aos achados ecocardiográficos de disfunção ventricular ou não⁶. Pacientes sem disfunção e com classificação até 1R na biópsia em geral não requerem intervenção terapêutica⁶. Para o diagnóstico de rejeição humoral, faz-se necessário, além dos achados histopatológicos característicos, a detecção de

anticorpos circulantes contra o soro do doador associado a quadro clínico sugestivo. Em geral, esse tipo de rejeição ocorre em indivíduos previamente sensibilizados e tem a tendência a ser mais grave com relação à rejeição celular¹¹.

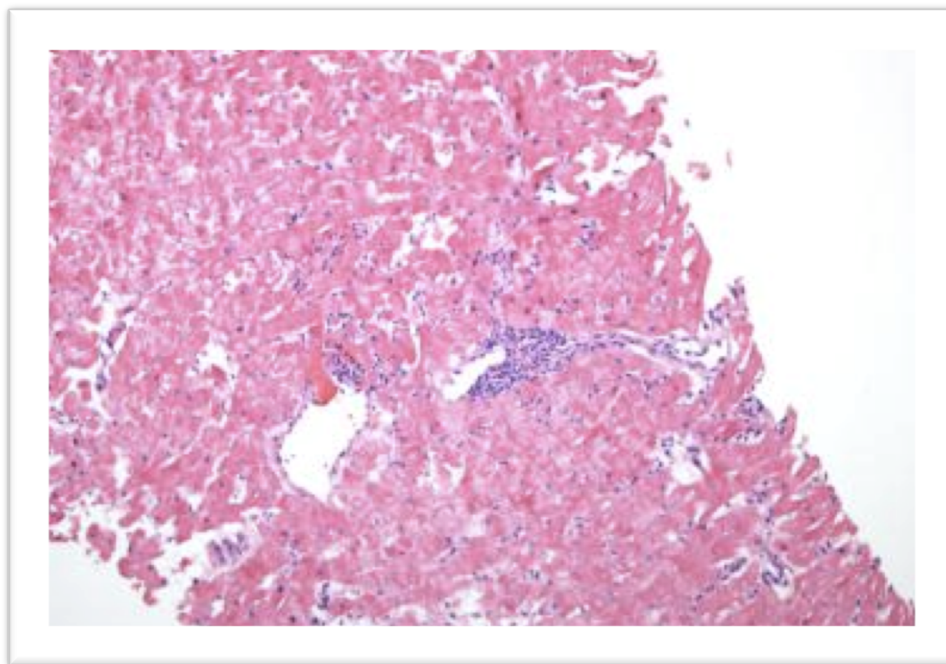


Figura 4 – Achados histopatológicos de biópsia endomiocárdica: ausência de rejeição.
Fonte: Heart Transplant Rejection Pathology, autor: Joseph J Maleszewski

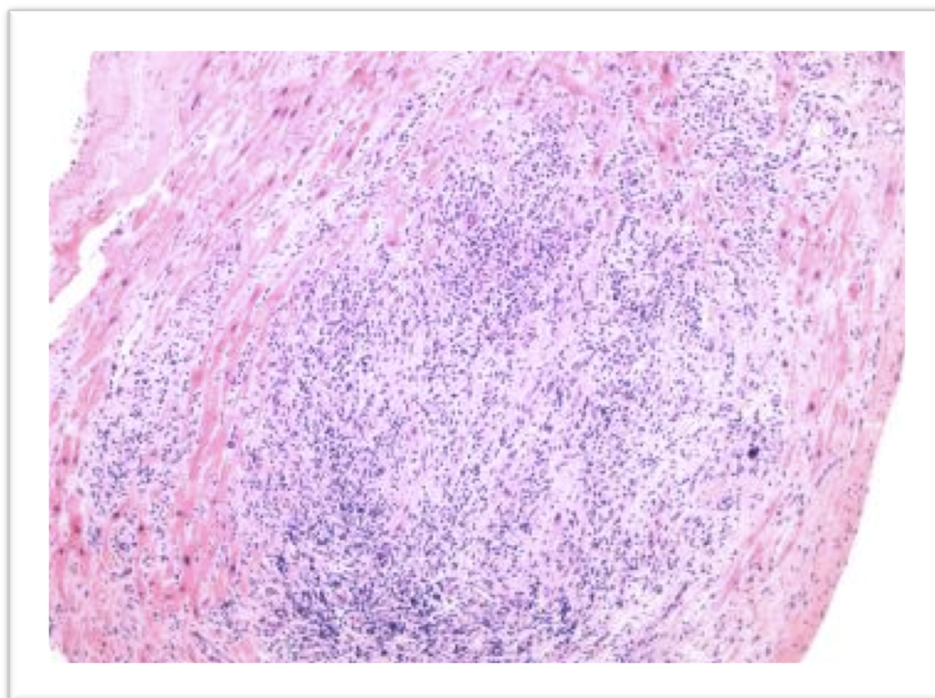


Figura 5– Achados histopatológicos de biópsia endomiocárdica: rejeição grave (3R) caracterizada pelo dano dos miócitos. Fonte: Heart Transplant Rejection Pathology, autor: Joseph J Maleszewski

O padrão ouro para a detecção de rejeição do enxerto é a biópsia endomiocárdica, que é realizada por meio de punção venosa central e exérese de tecido cardíaco do ventrículo direito com posterior análise histopatológica¹⁷. É rotina na avaliação dos pacientes transplantados e a sua periodicidade é realizada de acordo com protocolo próprio de cada instituição. Novas técnicas menos invasivas para a detecção de rejeição tem sido aprimoradas^{17, 18, 19}.

O ecocardiograma com doppler tissular mostrou-se ser bom preditor de rejeição quando comparado ao doppler convencional. Estudo brasileiro evidenciou que esse método tem sensibilidade de 88% e valor preditivo negativo de 92% para o diagnóstico de rejeição classificada com 3A ou mais pela biópsia endomiocárdica¹⁸.

Dados de ressonância cardíaca como edema miocárdico acentuado e aumento do volume diastólico final de VD são excelentes preditivos de rejeição cardíaca > 2R, segundo estudo que compara esse método com a biópsia endomiocárdica¹⁹. Alguns autores defendem que esse método deve servir de *screening* para o diagnóstico de rejeição^{17,19,20}.

A troponina I ultrasensível mostrou-se útil em um trabalho realizado com pacientes submetidos a transplante cardíaco e com diagnóstico de rejeição > 2A. Obteve-se correlação tanto com o diagnóstico de rejeição como de sua intensidade ou gradação, evidenciando um valor preditivo negativo maior que 99%²¹.

Apesar de vários trabalhos ressaltando o valor de novos métodos diagnósticos para a rejeição, todos os *guidelines* mundiais recomendam a biópsia endomiocárdica para o diagnóstico de rejeição, assim como para guiar o ajuste da terapêutica imunossupressora¹⁷.

1.4 Proteína C Reativa (PCR), mediadores inflamatórios sCD40, sCD40L e s4-1BB e doença cardiovascular

Nos últimos anos, novas evidências suportam que a inflamação exerce papel fundamental na maioria das doenças cardiovasculares e que, quanto maior a inflamação, pior o prognóstico do paciente²². O marcador inflamatório mais amplamente estudado em doença cardiovascular é a proteína C reativa (PCR) que tem extrema correlação em termos de prognóstico na doença arterial coronária²².

Já foi demonstrada correlação positiva entre níveis de PCR e escores de risco cardiovascular. Isso se traduz também em maior número de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico, doença arterial obstrutiva periférica e morte súbita em pacientes com níveis elevados de PCR²³.

O CD40 é uma glicoproteína transmembrânica expressa por linfócitos B e que tem papel fundamental na resposta inflamatória. É encontrado tanto em sua forma ligada à membrana (CD40), como na forma solúvel (sCD40). Um largo espectro de processos celulares e moleculares são regulados pela ligação CD40 ao seu ligante (CD40L) atuando diretamente sobre a resposta inflamatória sistêmica. Sua ligação à superfície das mais diversas células como Linfócitos B e T, basófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, células dendríticas, endoteliais e epiteliais é capaz de promover a produção de citocinas e a coestimulação de outras moléculas de superfície, facilitando a apresentação de antígenos.²⁴

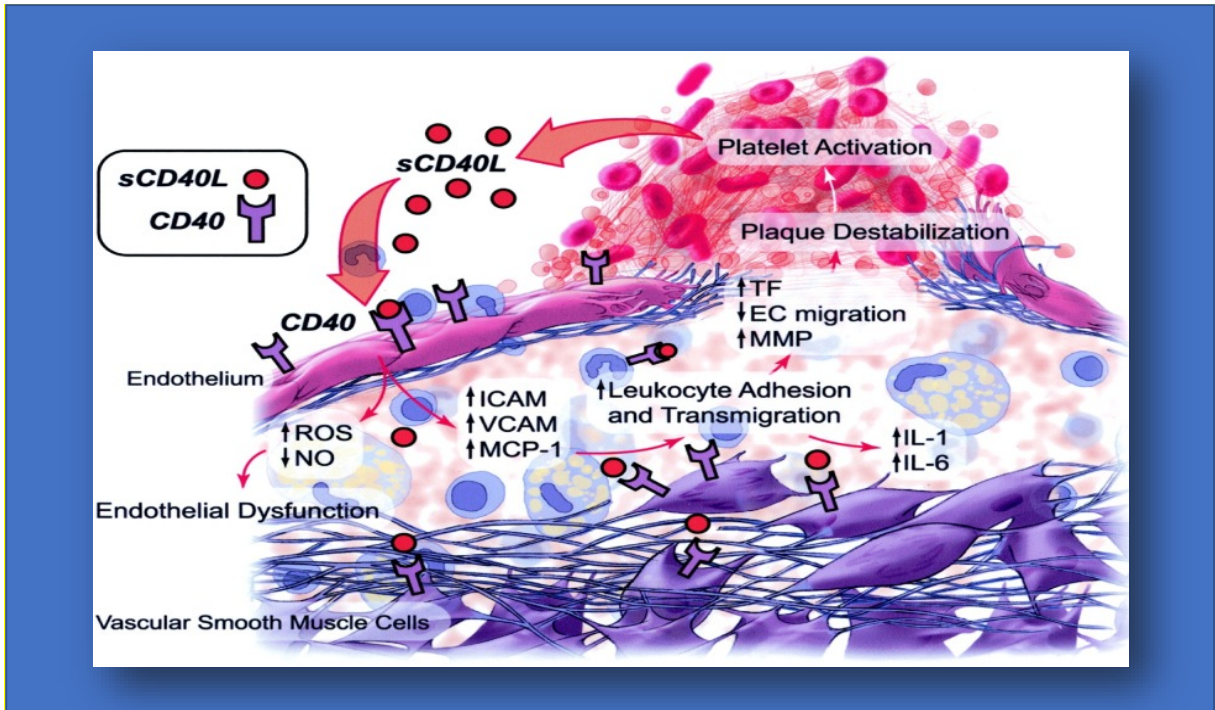


Figura 6 – Interação do sCD40L e CD40 expresso no endotélio vascular e o sCD40L secretado por plaquetas ativadas no processo inflamatório (Fonte: *Circulation* 2003; 108:1917-1923)

O CD40L vem sendo estudado na doença coronariana e já foi evidenciado ser forte marcador de risco cardiovascular. Estudo prévio identificou risco potencial do *endpoint* composto de morte, infarto ou progressão de insuficiência cardíaca em pacientes com níveis elevados de CD40L em relação aos pacientes com níveis normais desse marcador inflamatório. Quando o valor de troponina foi associado a essa análise, a evidência de risco foi ainda maior²⁵. Esse estudo trouxe a ideia da associação de dois marcadores inflamatórios para a estratificação de risco, o que trouxe ainda mais poder à correlação dos marcadores inflamatórios e a doença cardiovascular.

O 4-1BB, também conhecido como CD137, é outro tipo de glicoproteína transmembrânica, também envolvida na resposta inflamatória, porém expressa basicamente por linfócitos T. Ela é expressa principalmente na superfície de linfócitos T do tipo CD4 e CD8 ativados por antígenos²⁷.

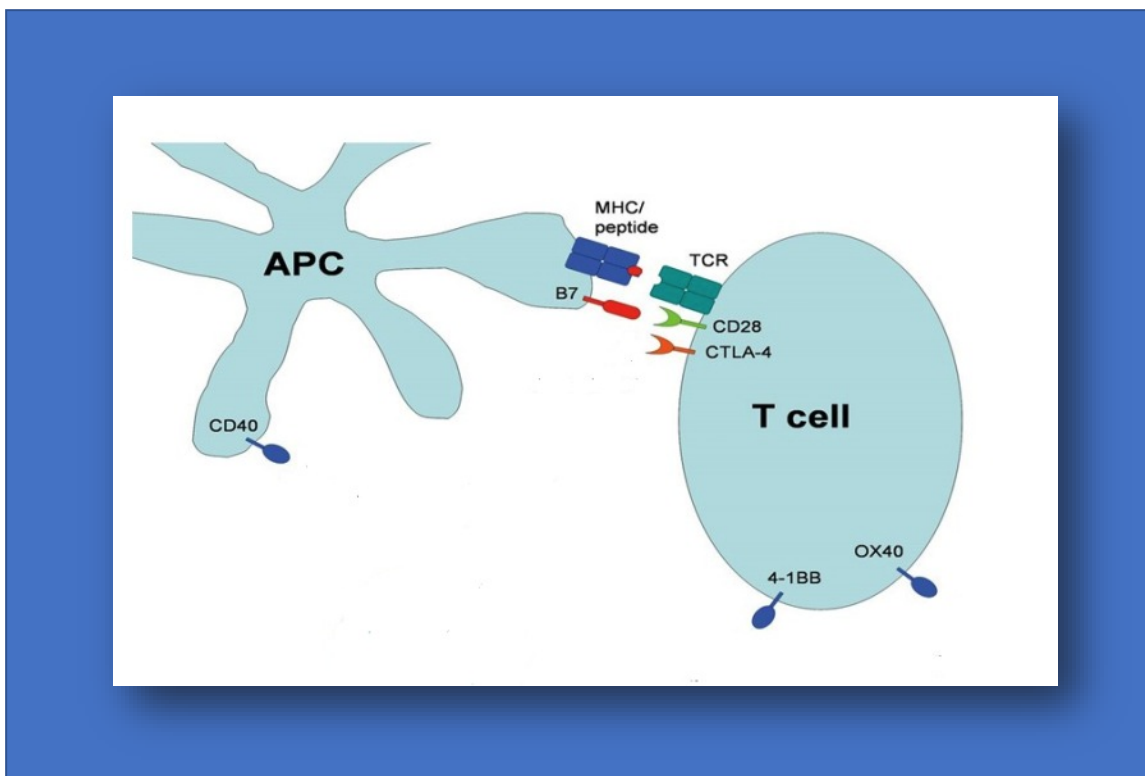


Figura 7 – Resposta inflamatória mediada por linfócitos T e expressão do 4-1BB
 Fonte: adaptado da *Clinical Science* 2006; 111, 93-106

Níveis elevados de 4-1BB foram também identificados como fator de risco para pacientes com síndrome coronariana aguda. Existe uma correlação de 4-1BB com a troponina e maior chance de eventos cardiovasculares no grupo com maiores níveis de 4-1BB durante um *followup* de 9 meses após o evento agudo²⁷.

O bloqueio dos receptores de determinados marcadores inflamatórios foi o objetivo de um estudo em pacientes com angina instável. Níveis mais elevados de OX40 e 4-1BB são encontrados nessa população. Nesse estudo, o bloqueio do receptor do OX40 e 4-1BB diminuiu a produção de $\text{TNF-}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$, diminuindo resposta inflamatória. Isso sugere que o bloqueio desses receptores pode ser alvo terapêutico como modulador de resposta inflamatória na síndrome coronariana aguda²⁸.

A resposta inflamatória no paciente com IC, independente de sua etiologia, tem sido alvo de pesquisas translacionais que tentam correlacionar atividade de leucócitos com prognóstico dos mesmos^{29,30,31}. Eles estão correlacionados com gravidade de doença e também têm valor prognóstico em relação à mortalidade cardiovascular³².

A associação entre sCD40L e graus variados de IC já foi evidenciada. Maiores níveis desse marcador inflamatório estiveram relacionados a maiores concentrações do BNP, além de associação direta com a classe funcional do paciente³³.

A expressão gênica de determinados mediadores inflamatórios como o 4-1BB, CD40L, *A Proliferation-inducingLligand* (APRIL), CD27L, FasL, LIGHT, *TNF-relatedapoptosis-inducingligand receptor 3* (TRAILR3) foi demonstrada como *upregulation* em pacientes com IC. Esse achado sugere que a maior ou menor ação desses mediadoresestejam ligadas à manifestação da doença³⁴.

1.5 Mediadores inflamatórios e transplante cardíaco

Um dos mecanismos de ativação e potencialização da resposta imune no pós-transplante é mediado pela ligação do CD40 e seu ligante CD40L às células apresentadoras de antígenos. Em modelo animal, o bloqueio da ligação CD40 com CD40L em camundongos que receberam enxertos cardíacos foi capaz de aumentar a tolerância ao enxerto³⁵.

Em humanos, recentemente destacou-se uma elevada expressão do CD40L em células T ativadas em pacientes receptores de transplante renal com boa tolerância ao enxerto comparado a controles saudáveis. Esses mesmos pacientes também produziram níveis elevados de interleucina 10(IL-10) após a ligação do CD40. Essa modulação da resposta inflamatória pode ser importante para tolerância a enxerto de órgãos³⁶.

A expressão gênica do 4-1BB, CD27 e CD70 foi estudada em transplantados cardíacos no tecido cardíaco colhido por meio de biópsia endomiocárdica e os pacientes foram seguidos por 6 meses. Foi evidenciado maior expressão do CD27 na população com alto risco de desenvolvimento de rejeição. Não houve diferença em relação à expressão gênica dos outros marcadores³⁷.

Por outro lado, foi demonstrado que existe o 4-1BB tem relação com a doença vascular do enxerto em camundongos. A produção de interferon- γ (IFN γ), IL6, e IL16 foi suprimida através do bloqueio do 4-1BB, diminuindo progressão de doença vascular nos camundongos tratados. Isso levanta a possibilidade de que a

manipulação desses marcadores inflamatórios pode reduzir o risco de rejeição tardia³⁸.

Em relação à PCR, alguns estudos já tentaram levantar associação de níveis elevados desse marcador e rejeição no pós-transplante cardíaco com resultados conflitantes³⁹. Em um estudo objetivando identificação de marcadores sanguíneos de rejeição, níveis de BNP, troponina e PCR não estiveram associados à maior incidência de rejeição no pós-transplante cardíaco⁴⁰.

A PCR mostrou-se útil em relação à maior detecção de doença vascular do enxerto no pós-transplante cardíaco, uma forma de rejeição tardia. Esse fato evidencia o fator “inflamação” como gênese da doença vascular de enxerto, responsável por 30% da mortalidade nessa população⁴¹.

Essa é uma área de interesse para inúmeras pesquisas translacionais – detectar marcadores inflamatórios que possam dar o diagnóstico de rejeição, assim como manipular e bloquear sua ação, a fim de prevenir o desencadeamento de resposta prejudicial ao organismo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB na insuficiência cardíaca avançada e após transplante cardíaco.

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1. Determinar níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB em pacientes com IC grave no pré-transplante cardíaco, na biópsia endomiocárdica após 30 dias do transplante e nos pacientes com suspeita clínica de rejeição;

2.2.2. Comparar níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB antes e após transplante cardíaco e com controles saudáveis;

2.2.3. Comparar níveis séricos destes marcadores inflamatórios entre os pacientes com e sem rejeição;

2.2.4. Avaliar os mediadores inflamatórios na cardiopatia chagásica e comparar com as etiologias hipertensiva, idiopática, chagásica e valvar;

2.2.5. Avaliar os índices sCD40/PCR, sCD40L/PCR e s4-1BB/PCR após o transplante cardíaco entre os pacientes com e sem rejeição

3. METODOLOGIA

3.1 Tipo do estudo

Estudo de coorte prospectivo, exploratório e translacional com grupo de comparação interna. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IMIP sob no. CAAE: 62703416.1.0000.6201 (Anexo 1), assim como Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Apêndice2).

3.2 Local e período do estudo do estudo

O estudo foi realizado no Departamento de Cardiologia de Adultos e no Laboratório de Pesquisa Translacional Anthony Hart do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) no período de setembro de 2014 a agosto de 2017. A coleta de dados clínicos e de amostra biológica foi realizada no período de setembro de 2015 a setembro de **2016**.

3.3 População do estudo

Pacientes: Foram incluídos 38 pacientes com idade entre 14 e 68 anos. A população de estudo foi dividida em três grupos: i) grupo com insuficiência cardíaca, avaliado no pré-operatório de transplante cardíaco; ii) grupo pós-transplante com biópsia endomiocárdica eletiva; iii) suspeita clínica de rejeição com indicação de biópsia endomiocárdica.

Grupo controle de comparação: O grupo foi composto por 19 indivíduos saudáveis com idade entre 18 e 60 anos sem história clínica de doença cardiovascular ou outras comorbidades. Os voluntários foram funcionários da instituição convidados a participar do estudo.

3.4 Critérios de elegibilidade

3.4.1 Critérios de inclusão

- Pacientes no pré ou pós-operatório de transplante cardíaco, maiores de 14 anos (grupo de pacientes acompanhados pelo transplante cardíaco de adultos do IMIP) e indicação de biópsia endomiocárdica segundo protocolo institucional.
- Pacientes internados com suspeita clínica de rejeição com confirmação através de biópsia cardíaca
- Pacientes que desenvolveram rejeição confirmada por biópsia cardíaca no pós-operatório de transplante mesmo durante os primeiros 30 dias do pós-transplante

3.4.2 Critérios de exclusão:

- Sinais clínicos de infecção aguda
- Gestação
- História de doença autoimune
- História de neoplasia prévia ou ativa
- Sorologias positivas para HIV, Hepatite B ou C e HTLV no pré-transplante cardíaco.

3.5 Fluxograma de captação de pacientes

Amostra não-probabilística consecutiva, constituída por pacientes no pré ou pós-operatório de transplante cardíaco.

Os pacientes foram identificados em sua admissão hospitalar conforme critérios de seleção descritos acima. Os que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar da pesquisa com aplicação da ficha clínica (Apêndice1). Após aceitar o convite em participar deste estudo, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2).

Foram estudados 38 pacientes com IC submetidos a transplante cardíaco. Destes, um grupo de 15 pacientes foram incluídos e coletadas amostras sanguíneas antes e após a realização do transplante cardíaco e 17 com amostras coletadas apenas após o transplante. Outros seis pacientes com o diagnóstico de rejeição tiveram amostras coletadas apenas após o Tx, sendo 4 pacientes na biópsia protocolar e 2 pacientes antes mesmo dos 30 dias do procedimento (Figura 8). O grupo controle foi formado por 19 indivíduos saudáveis entre 18 e 49 anos. Doenças crônicas, auto-imunes, infecciosas e outras patologias foram afastadas nesses indivíduos para que os mesmos fizessem parte do estudo.

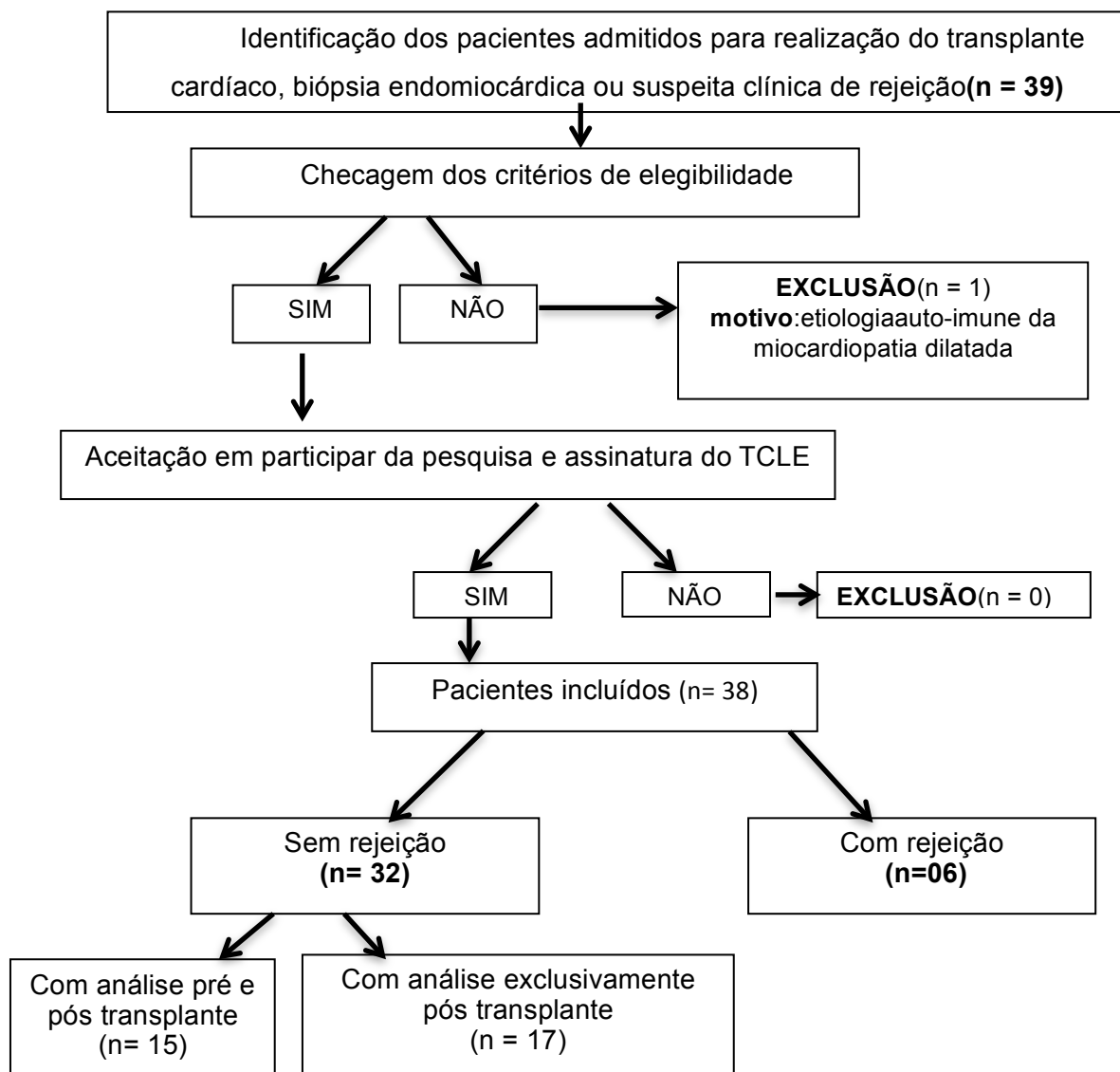


Figura 8: Fluxograma de captação dos pacientes

3.6 Técnica de coleta, processamento e armazenamento das amostras de sangue

A amostra de sangue foi coletada por técnicos e enfermeiros após inclusão do paciente no estudo. Sempre que possível, a coleta de sangue foi realizada aproveitando-se o momento da coleta de exames solicitados pela equipe médica acompanhante, a fim de evitar repetições de punções. Um volume total de 12 mL de sangue foi colhido em tubo com anticoagulante, o ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (BD Vacutainer®) e foi centrifugado a 300G em centrífuga refrigerada para separação do plasma e armazenado em microtubo sem freezer a -80°C para posterior análise dos mediadores inflamatórios.

3.7 Determinação da concentração sérica de sCD40, sCD40L e s4-1BB

A concentração foi determinada por *enzymeimmunosorbentassay* (ELISA), utilizando os sCD40, sCD40L e s4-1BB Platinum ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN), seguindo as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada utilizando a leitora de placas Human Reader HS (Human, Wiesbaden, Germany) e as concentrações expressas em pg/mL.

3.8 Variáveis clínicas, biológicas e laboratoriais

3.8.1 Variáveis clínicas:

- Hipertensão arterial sistêmica: variável categórica nominal. Dado clínico colhido em prontuário ou por informação do paciente. Considerado apenas aqueles com necessidade de algum anti-hipertensivo para controle dos níveis tensionais.
- Diabetes mellitus: variável categórica nominal. Dado clínico colhido em prontuário ou por informação do paciente. Considerados aqueles com necessidade de hipoglicemiante oral ou insulino-terapia.

- Etiologia da miocardiopatia dilatada: variável categórica nominal. Dado colhido na ficha de acompanhamento do paciente no pré-transplante cardíaco. As etiologias foram classificadas como idiopática, chagásica, isquêmica, reumática, hipertensiva, alcoólica, miocardites ou miocárdio não compactado (dado este colhido no prontuário do paciente).
- Rejeição clínica: Foram considerados pacientes “com rejeição” aqueles que tiveram o achado de classificação do tipo 2 ou 3R (ítem a seguir) na biópsia endomiocárdica. Estes foram classificados como rejeição celular. Também foi considerado rejeição os pacientes com disfunção ventricular aguda e difusa mesmo sem achado de alteração histopatológica. Este grupo foi considerado como rejeição humoral, uma vez que a técnica de imunohistoquímica não está disponível em nosso serviço.
- Grau de rejeição na biópsia endomiocárdica: baseado na Diretriz brasileira de Transplante Cardíaco de 2011)⁶.
 - 0R: ausência de infiltrado inflamatório: paciente estável com função sistólica normal ao ecocardiograma.
 - 1R: infiltrado inflamatório perivascular ou intersticial discreto sem dano celular ou com foco único de agressão dos cardiomiócitos: paciente estável com função sistólica normal ao ecocardiograma.
 - 2R: infiltrado inflamatório multifocal com dois ou mais focos de agressão dos cardiomiócitos. A função ventricular pode ou não estar alterada.
 - 3R: infiltrado inflamatório difuso, geralmente com presença de neutrófilos associado a múltiplos focos de agressão a miócitos.

3.8.2 Variáveis biológicas

- Idade: variável numérica contínua que corresponde ao intervalo entre a data do nascimento e a data de realização da pesquisa, em anos completos, conforme informação da pacientes e/ou data de nascimento do Registro Geral (RG).
- Sexo: variável categórica nominal dicotômica (masculino ou feminino).

3.8.3 Variáveis laboratoriais

- Leucócitos: variável numérica contínua. A contagem destas células corresponde ao número de leucócitos por microlitro de sangue ($\times 10^3/\mu\text{l}$).
- Neutrófilos: variável numérica contínua. A contagem destas células corresponde ao número de neutrófilos por microlitro de sangue ($\times 10^3/\mu\text{l}$).
- Linfócitos: variável numérica contínua. A contagem destas células corresponde ao número de linfócitos por microlitro de sangue ($\times 10^3/\mu\text{l}$).
- Plaquetas: variável numérica contínua. A contagem destas células corresponde ao número de plaquetas por microlitro de sangue ($\times 10^3/\mu\text{l}$).
- Índice Plaquetas/linfócito: variável numérica contínua expressa pela divisão do número de plaquetas pelo número de linfócitos totais do sangue.
- Índice Neutrófilos/linfócito: variável numérica contínua expressa pela divisão do número de neutrófilos pelo número de linfócitos totais do sangue.
- PCR: variável numérica contínua expressa em mg/dl.
- *soluble* CD40 (sCD40): variável numérica contínua expressa pela concentração no plasma em pg/mL.
- *soluble* do ligante CD40 (sCD40L): variável numérica contínua expressa pela concentração no plasma em pg/ml.
- *soluble* 4-1BB (s4-1BB): variável numérica contínua expressa pela concentração no plasma em pg/mL.

- Índice sCD40/PCR: variável numérica contínua expressa pela divisão do valor da dosagem de sCD40 pelo valor da PCR
- Índice sCD40L/PCR: variável numérica contínua expressa pela divisão do valor da dosagem de sCD40L pelo valor da PCR.
- Índice 4 1BB/PCR: variável numérica contínua expressa pela divisão do valor da dosagem de 4 1BB pelo valor da PCR.

3.9. Esquema de imunossupressão:

3.9.1. Esquema Padrão:

- Indução com 600mg de metilprednisolona seguido de 126mg 3x ao dia no primeiro PO. Se VO disponível no segundo PO, início de prednisona 20mg ao dia que é mantido por pelo menos 3 meses ou;
- Indução com 600mg de metilprednisolona seguido de 10mg/Kg/dia por 3 dias com desmame de 100mg/dia até a dose de 100mg/dia. Após isso, introdução de prednisona 1mg/Kg/dia e desmame gradual pelos próximos 6 meses ou;
- Indução com basiliximab 20mg/dose nos dias 0 e 4 do transplante cardíaco ou;
- Indução com thymoglobulina 1mg/Kg/dia durante três a sete dias.
- Manutenção com esquema composto por tacrolimus (0,1mg/Kg dividido em duas tomadas) associado a micofenolatomofetil (1.000mg 2x ao dia) ou micofenolato sódico (720mg 2x ao dia). Estas são as doses padronizadas para todos os pacientes (dose padrão).

3.9.2. Esquema alternativo: Mesmo tipo de indução de imunossupressão com uma das seguintes terapias de manutenção:

- prednisona 20mg/dia pelos primeiros 3 meses seguido de desmame gradual até os meses quando o corticoide é suspenso + micofenolato (dose padrão) + ciclosporina 4mg/Kg/dia.

- prednisona (dose padrão) + micofenolato (dose padrão) + sirolimus 2mg/dia.

3.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando GraphPad®Prism6, (GraphpadSoftwareInc., EUA). Para as variáveis numéricas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para a análise descritiva foram realizadas tabelas de distribuição de frequência com medidas de tendência central e de dispersão em mediana com intervalo interquartil (IQR de 26 a 76%) e de média com desvio padrão (DP). Para análises das variáveis com distribuição não normal foirealizado o teste de Mann-Whitney (não paramétrico) e para as variáveis com distribuição normal, foi realizado o teste t (paramétrico). Para as análises pareadas do mesmo indivíduo pré e pós-transplante cardíaco, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,06$.

4. RESULTADOS

4.1 Análises das características biológicas e clínicas dos pacientes com IC

Foram avaliados 38 pacientes com IC com idade média de 40,39 anos variando entre 14 e 68 anos de idade. Setenta e três por cento dos pacientes eram do sexo masculino. Da amostra estudada, apenas 28,9% dos pacientes eram hipertensos e 10,6% eram diabéticos. Detalhes das características clínicas destes pacientes estão listadas na tabela 1.

As principais etiologias da miocardiopatia dilatada que levaram ao transplante cardíaco foram a chagásica e a idiopática em igual proporção (26,3%), seguidas da miocardiopatia reumática (16,7%), miocardiopatia isquêmica e miocardites, ambas responsáveis por 10,6% das indicações de transplante cardíaco. A mediana de tempo de espera em lista foi de 14 dias, estando 67% dos pacientes em prioridade para Tx quando receberam o órgão. O tipo sanguíneo mais prevalente entre o grupo estudado foi o “O” em 66,2% dos pacientes, seguido de grupo A em 28,9% e os grupos B e AB em igual proporção (7,9%).

Trinta e dois pacientes não apresentaram rejeição nos primeiros 30 dias. Nenhuma rejeição em indivíduo assintomático foi evidenciada na ocasião da biópsia protocolar de 30 dias. Na biópsia, oito pacientes foram classificados como 1R, onde não houve necessidade de intervenção terapêutica por serem consideradas “rejeições não significativas”. Dois pacientes desenvolveram rejeição antes mesmo da biópsia dos 30 dias, sendo ambas as rejeições humorais (classificadas como significativas – tabela 1). Quatro pacientes internaram com suspeita clínica de rejeição que foram confirmadas através de material colhido na biópsia endomiocárdica. O grupo com rejeição foi então formado de seis pacientes.

Tabela 1 – Descrição de frequência de características biológicas e clínicas dos pacientes com IC submetidos a transplante cardíaco.

CARACTERÍSTICAS	N = 38
IDADE	40,39 ($\pm 13,1$)
SEXO	
<i>Feminino</i>	10 (26,3%)
<i>Masculino</i>	28 (73,6%)
HIPERTENSÃO	
Sim	11 (28,9%)
Não	27 (71,1%)
DIABETES	
Sim	4 (10,6%)
Não	34 (89,6%)
ETIOLOGIA DA MIOCARDIOPATIA DILATADA	
<i>idiopática</i>	10 (26,3%)
<i>chagásica</i>	10 (26,3%)
<i>reumática</i>	6 (16,7%)
<i>isquêmica</i>	4 (10,6%)
<i>miocardites</i>	4 (10,6%)
<i>álcool</i>	3 (7,8%)
<i>miocárdio não compactado</i>	1 (2,6%)
TEMPO DE ESPERA - TRANSPLANTE (dias)	14 (4 – 29)*
STATUS DE PRIORIZAÇÃO	
<i>priorizado</i>	22 (67,9%)
<i>não priorizado</i>	16 (42,1%)
TIPO SANGÜÍNEO	
A	11 (28,9%)
B	3 (7,9%)
AB	3 (7,9%)
O	21 (66,2%)
DIAGNÓSTICO DE REJEIÇÃO	
Não relevante	32
0R	24 (63,1%)
1R	8 (21,0%)
Relevante	6
2R	1 (2,6%)
3R	3 (7,9%)
<i>humoral</i>	2 (6,2%)

Desvio padrão (DP) ; * Mediana e interquartil (IQR 26-76)

4.2 Análises das concentrações séricas de sCD40, sCD40L e s4-1BB na insuficiência cardíaca antes e após o transplante

Os mediadores inflamatórios sCD40, sCD40L e s4-1BB foram dosados nos grupos de pacientes com IC antes (pré) e após transplantes (pós-Tx) Para esta análise, foi realizada a comparação dos níveis de **sCD40, sCD40L e s4-1BB** no pré e pós-Tx com os dos controles saudáveis.

- **sCD40**

Os valores de mediana de sCD40 no pré-Tx (mediana: 328,6pg/mL) foram mais elevados com relação ao pós-Tx (mediana: 199,6pg/mL; $p=0,0006$). Verificou-se que os níveis de sCD40 foram elevados no pré e pós-Tx quando comparado aos controles saudáveis (mediana: 64,6pg/mL; $p<0,0001$), como mostra a figura 10A.

- **sCD40L**

Na análise de sCD40L, também verifica-se que a média dos níveis foram mais elevados no pré-transplante (mediana: 164 pg/mL) quando comparado aos pacientes no pós-transplante (mediana: 88,2 pg/mL), porém sem significância estatística ($p=0.09$). Quando comparado aos controles saudáveis (mediana: 18,1pg/mL), os níveis de sCD40L foram significativamente mais elevados no pré e pós-transplante cardíaco ($p < 0,0001$) como mostra a figura 10B.

- **s4-1BB**

A mediana dos níveis séricos de s4-1BB foi elevada no pré-TX (177,7 mg/dL) quando comparado ao pós-Tx (149,2 pg/mL; $p=0.01$). Com relação aos controles saudáveis (mediana: 70pg/mL), verificou-se que no pré e pós-Tx, os níveis são significativamente mais elevados ($p < 0.0001$) como mostra a figura 10C.

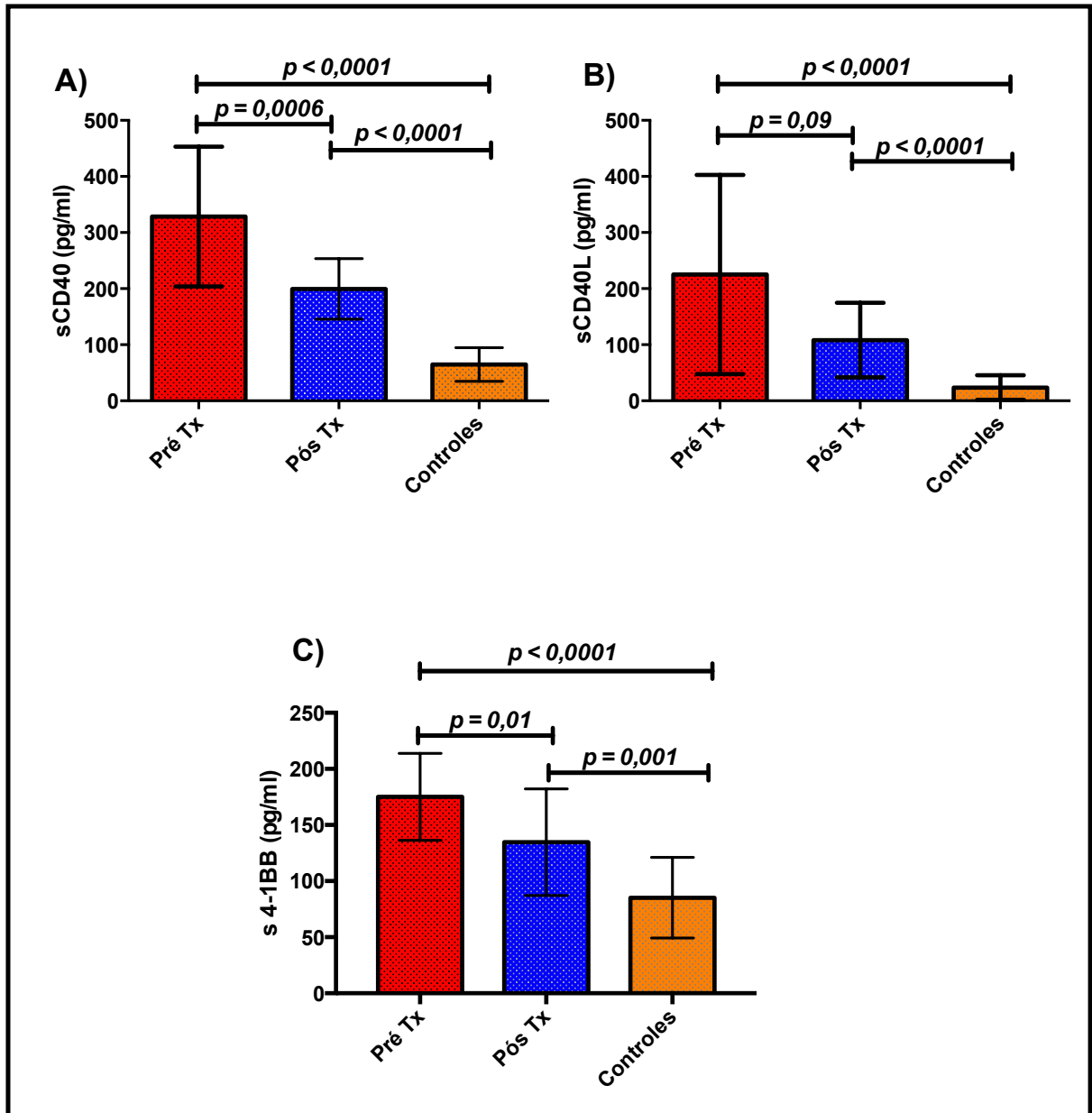


Figura 10: Níveis séricos em pg/mL de **sCD40**, **sCD40L** e **s4-1BB** dos pacientes com insuficiência cardíaca (**pré-Tx**), após transplantes (**pós-Tx**) e dos controles saudáveis. Os gráficos foram representados em mediana e intervalo interquartil (26-76). Foi realizado o teste de Mann Withney e considerado significativo $p < 0.06$.

Na análise pareada, observou-se uma diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de sCD40 e s4-1BB dos pacientes entre as fases pré e pós-transplante ($p=0,01$ e $p=0,001$, respectivamente). Não houve diferença significativa na análise de CD40L entre o pré e pós-Tx (Figura 11).

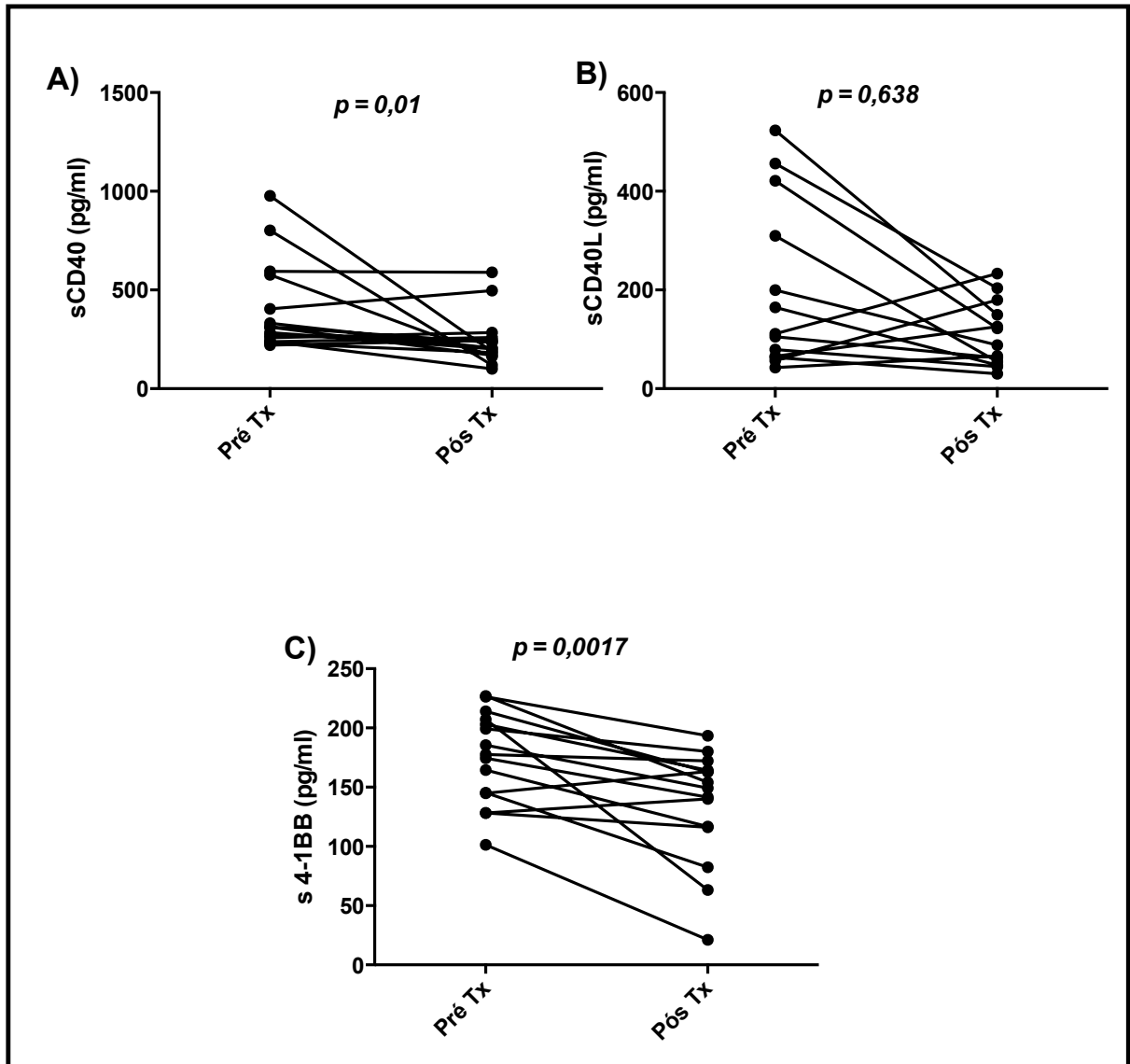


Figura 11: Análise dos níveis séricos em pg/mL de sCD40, sCD40L e s4-1BB dos pacientes no pré e pós-transplante (pré-Tx; pós-Tx, respectivamente). Os gráficos estão representados em pareado. Foi realizado o teste de Wilcoxon e considerado significativo $p < 0.05$.

4.3 Análises das características clínicas e laboratoriais dos pacientes com e sem rejeição no transplante cardíaco

Não houve diferença significativa entre idade, sexo, prevalência de hipertensão ou diabetes entre os grupos com e sem rejeição. Com relação a causa da doença, também não houve diferença significativa entre os grupos para as diferentes etiologias de miocardiopatia dilatada. (Tabela 2).

Tabela 2 –Análises das frequências de características biológicas e clínicas dos pacientes submetidos a transplante cardíaco com e sem rejeição.

	Pacientes com rejeição n= 6	Pacientes sem rejeição n= 32	Valor de p	Total n= 38
Idade (anos) média (DP)	44,6 (±16,46)	39,63 (±12,76)	0,99	40,39 (±13,1)
Sexo*				
Feminino	3 (60%)	7 (21,8%)		10 (26,3%)
Masculino	3 (60%)	26 (78,1%)	0,16	28 (73,6%)
Hipertensão*				
Sim	2 (33,3%)	9 (28,1%)		11 (28,9%)
Não	4 (76,7%)	23 (71,9%)	0,79	27 (71,1%)
Diabetes*				
Sim	0	4 (12,6%)		4 (10,6%)
Não	6 (100%)	28 (87,6%)	0,99	34 (89,6%)
Etiologia*				
chagásica	2 (33,3%)	8 (26%)	0,64	10 (26,3%)
idiopático	0	10 (31,2%)	0,16	10 (26,3%)
reumática	1 (16,6%)	6 (16,6%)	0,99	6 (16,7%)
isquemico	2 (33,3%)	2 (6,2%)	0,10	4 (10,6%)
miocardite	1(16,6%)	3 (9,3%)	0,61	4 (10,6%)
álcool	0	3 (9,3%)	0,99	3 (7,8%)
MNC	0	1 (3,1%)	0,99	1 (2,6%)

Testes *Exato de Fisher e **Qui-Quadrado. Significativo $p < 0,06$ MNC: miocardio não compactado

A dosagem sérica de proteína C reativa (PCR) foi realizada nos dois grupos (com e sem rejeição) e evidenciamos menor concentração de PCR nos pacientes sem rejeição com relação aos pacientes com rejeição (2,6 vs 6,1 $p = 0,06$), porém sem significância estatística (Tabela 3).

Como os mediadores inflamatórios são diretamente relacionados às células de defesa, foram estudados o número absoluto de neutrófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas, além da realização dos índices neutrófilos/linfócitos e plaquetas/linfócitos dos indivíduos com e sem rejeição. Apesar dos pacientes sem rejeição apresentarem níveis reduzidos quando comparados aos com rejeição, não foi evidenciado diferença significativa entre os grupos, exceto pelo número de linfócitos que foi significativamente menor nos pacientes com rejeição ($p = 0,02$)

Tabela 3 –Análises laboratoriais nos pacientes com e sem rejeição submetidos a transplante cardíaco.

	Pacientes com rejeição n= 6	Pacientes sem rejeição n= 32	Valor de p
PCR (mg/L)^{&}	6,1	2,6	
Mediana (IQR)	(6,0 – 94,7)	(0,9 – 2,3)	0,06
Neutrófilos	5.581	6.950	
Mediana (IQR)	(4.390 – 10.900)	(4.959 – 7.902)	0,847
Linfócitos	510	1.288	
Mediana (IQR)	(370 – 1.181)	(623 – 1.836)	0,027
Monócitos	343	504	
Mediana (IQR)	(146 – 470)	(307 – 726)	0,122
Plaquetas	185.000	245.000	
Mediana (IQR)	(54.000 – 185.000)	(188.000 – 333.000)	0,175
RPL[#]	434	217	
Mediana (IQR)	(242,2 – 610,1)	(133,7 – 314,1)	0,10
RNL[*]	12,6	4,6	
Mediana (IQR)	(6,6 – 14,7)	(2,86 – 10,4)	0,16

[&] (PCR; Proteína C reativa; ^{*}RNL:Relação Neutrófilos/Linfócitos; [#]RPL: Relação Plaquetas/Linfócitos; Teste de Mann Whitney. Foi considerado significativo $P < 0.06$.

4.4 Análises das concentrações séricas de sCD40, sCD40L e s4-1BB dos pacientes com e sem rejeição

Os mediadores inflamatórios sCD40, sCD40L e s4-1BB foram dosados nos pacientes com e sem rejeição e os resultados foram comparados aos controles saudáveis. Apenas os níveis séricos de 4-1BB foram significativamente menores nos pacientes com rejeição, não havendo diferença significativa nos níveis séricos dos

outros mediadores entre os grupos com e sem rejeição. Com relação aos controles saudáveis, evidenciamos níveis mais elevados de sCD40, sCD40L e s4-1BB nos pacientes com e sem rejeição (Figura 12).

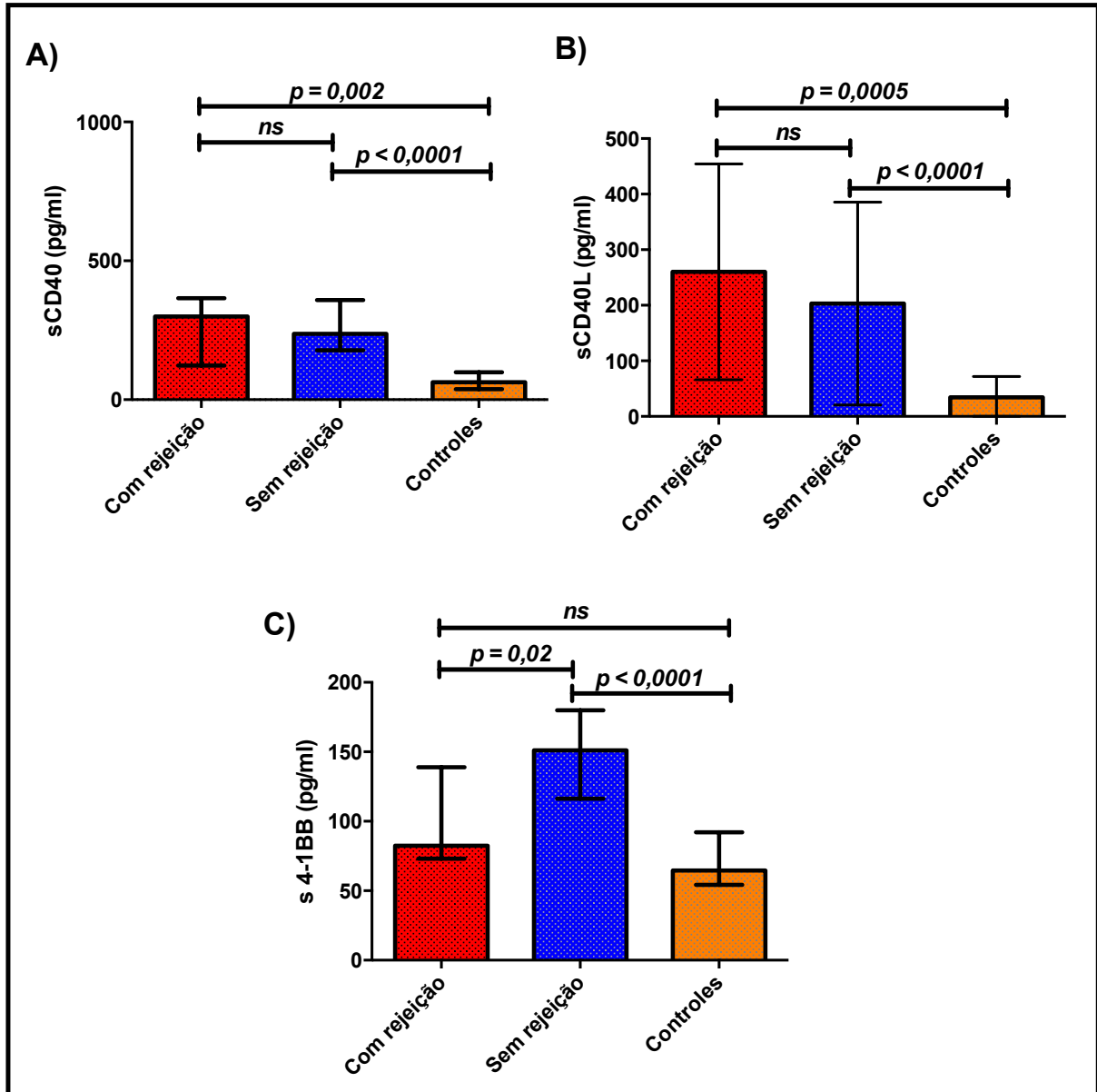


Figura 12: Níveis séricos em pg/mL de sCD40, sCD40L e s4-1BB dos pacientes com rejeição (n= 6) ou sem rejeição (n=32) e dos controles saudáveis (n=19). Os gráficos foram representados em mediana e intervalo interquartil (25-75). Foi realizado o teste de Mann Withney. Foi considerado significativo $P < 0.05$.

4.6 Análises dos índices de sCD40/PCR, sCD40L/PCR e s4-1BB/PCR dos pacientes com ou sem rejeição

Foi realizado a análise da relação dos níveis séricos de sCD40 e PCR(sCD40/PCR), sCD40L e PCR (sCD40L/PCR), e de s4-1BB e PCR(s4-1BB/PCR). Para o índice sCD40/PCR, o grupo com rejeição apresentou valores de mediana de 40,16 vs 87,16 do grupo sem rejeição ($p = 0,02$), como mostra a figura 13A. Com relação ao índice sCD40L/PCR, o grupo com rejeição apresentou uma mediana de 22,11 vs 36,07 do grupo sem rejeição ($p = 0,66$), não evidenciando significância estatística (Figura 13B). Foi evidenciada diferença estatisticamente significativa no índice 4-1BB/PCR, onde o valor de mediana no grupo com rejeição foi 13,66 vs 86,9 no grupo sem rejeição ($p = 0,001$), como mostra a figura 13C.

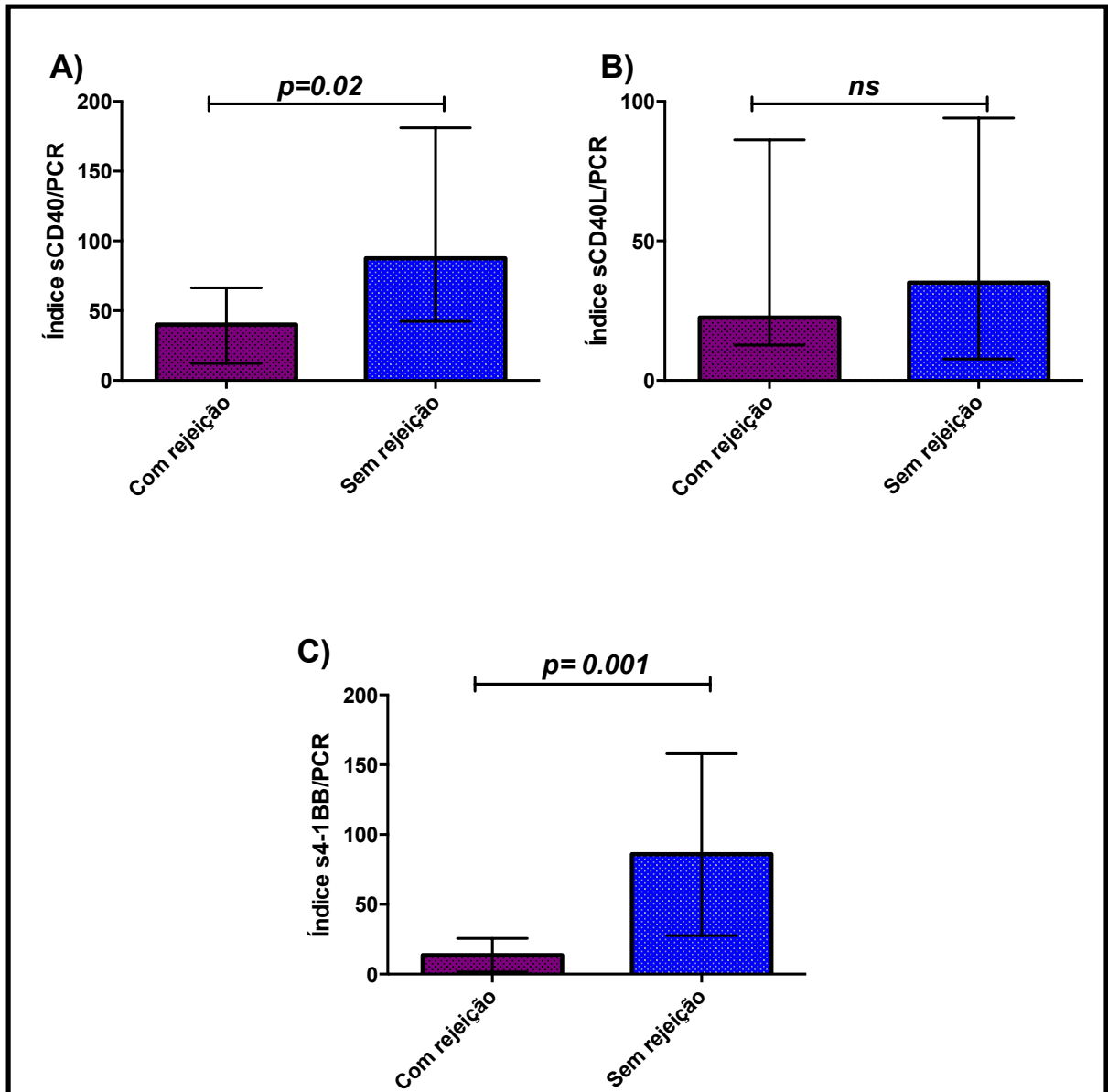


Figura 13: Valores dos índices de sCD40/PCR, sCD40L/PCR e s4-1BB/PCR dos pacientes com rejeição ($n= 6$) e sem rejeição ($n=32$). Os gráficos foram representados em mediana e intervalo interquartil (26-76). Foi realizado o teste de Mann Withney. Foi considerado significativo $P < 0.05$.

Também foi realizada a análise dos números de pacientes com e sem rejeição que apresentaram valores abaixo ou acima da mediana encontrada dos índices de sCD40/PCR ($<$ ou $\geq 73,7$), sCD40L/PCR ($<$ ou $\geq 42,4$) e de s4-1BB/PCR ($<$ ou $\geq 37,8$). Não houve diferença estatística dos números de pacientes com ou sem rejeição para análise de sCD40/PCR ($<$ ou $\geq 73,7$), sCD40L/PCR ($<$ ou $\geq 42,4$). Todos os pacientes sem rejeição apresentaram valores $\geq 37,8$ de índice s4-1BB/PCR ($p=0,01$) (Figura 14).

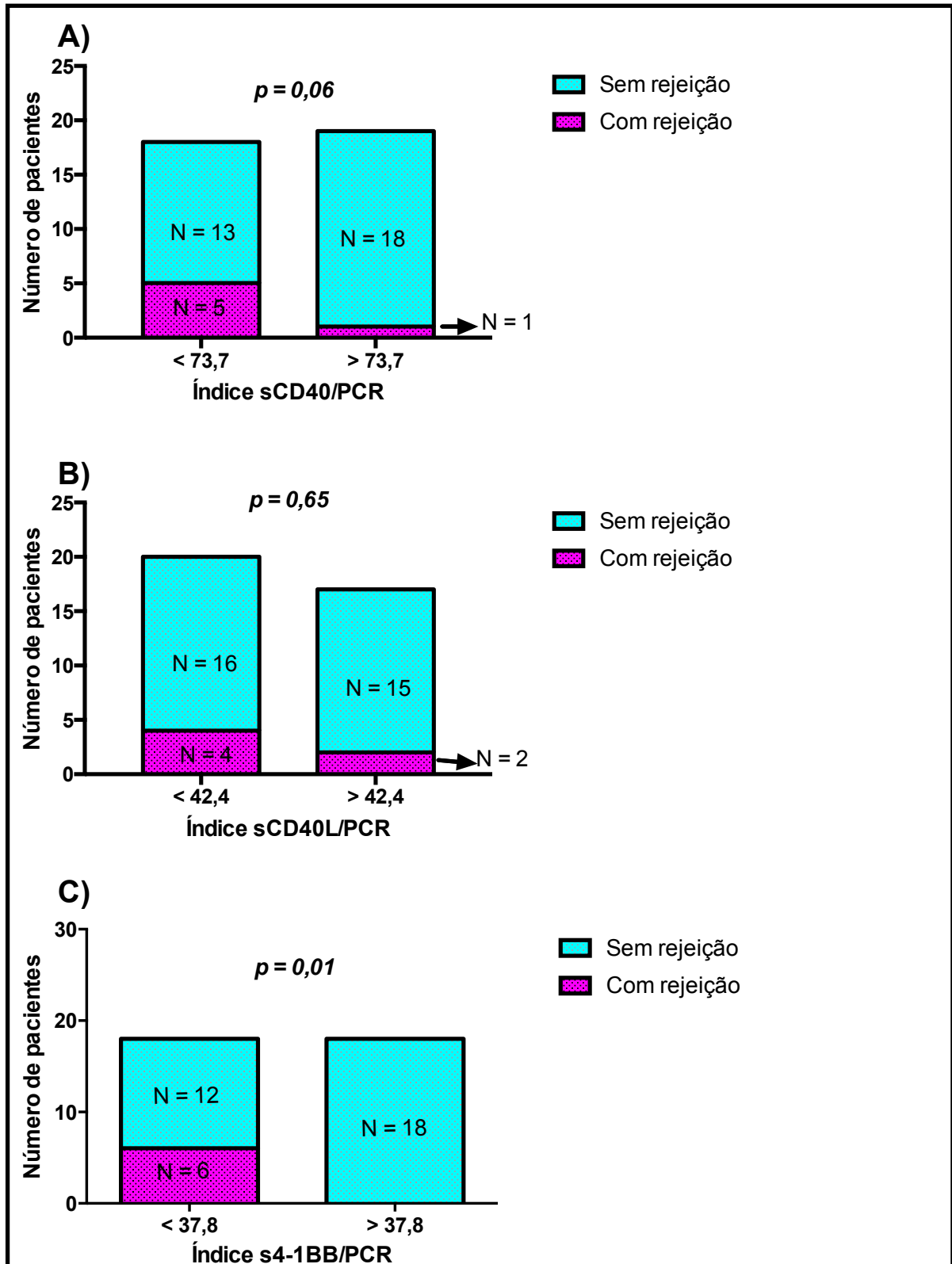


Figura 14: Análise dos números de pacientes com e sem rejeição que apresentaram valores abaixo ou acima da mediana encontrada dos índices de sCD40/PCR (< ou $\geq$ 73,7), sCD40L/PCR (< ou $\geq$ 42,4) e de s4-1BB/PCR (< ou $\geq$ 37,8). Foi realizado o teste de Qui quadrado, sendo considerado significativo o $p < 0,05$.

4.6 Análises das concentrações séricas de sCD40, sCD40L e s4-1BB de acordo com a etiologia da miocardiopatia dilatada

Os níveis de sCD40, sCD40L e s4-1BB foram comparados nas diferentes etiologias da miocardiopatia dilatada. Escolhemos a doença de chagas para comparar com as outras etiologias, uma vez que existe mecanismo bem estudado do desenvolvimento do processo inflamatório nos diferentes estágios de doença. Não evidenciamos diferença significativa desses mediadores entre os pacientes chagásicos com outras etiologias de miocardiopatia dilatada. Com relação aos controles saudáveis, houve diferença significativa desses marcadores independente da etiologia (Tabela 4).

Tabela 4 – Análises dos níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB nos pacientes com etiologia chagásica da miocardiopatia dilatada no pós transplante cardíaco

Concentração (pg/ml)	Pacientes com doença de chagas (n=26)	Pacientes com outras etiologias (n=13)	Controles saudáveis (n=19)	Valores de p		
				CH vs OE	CH vs C	OE vs C
sCD40 Mediana (IQR)	268,6 (191,4 – 347,8)	237,2 (174,8 – 374,6)	64,9 (38,7 – 113,9)	0,46	< 0,0001	< 0,0001
sCD40L Mediana (IQR)	180,6 (66,2 – 226,7)	126,6 (67,6 – 267,1)	42,7 (13-69)	0,90	0,01	< 0,0001
s4-1BB Mediana (IQR)	124,3 (93,7 – 186,6)	161 (124,7 – 179,7)	64,9 (21,6 – 146,1)	0,46	0,02	0,0008

IQR: Interquartil (26-76%) Foi considerado significativo $*p<0.06$. Teste de Mann Withney #CH: chagas; OE: outras etiologias: idiopática, isquêmica, reumática, miocardites, alcoólica e miocárdio não compactado. C: controles

4.7 Análises das concentrações séricas de sCD40, sCD40L e s4-1BB no transplante de acordo com o esquema terapêutico

A hipótese da interferência dos imunossupressores com a expressão dos níveis séricos dos marcadores inflamatórios foi testada comparando-se diferentes esquemas imunossupressores. Setenta e oito por cento dos pacientes faziam uso do esquema padrão (EP) de imunossupressor que consiste na associação de Tacrolimus, Prednisona e Micofenolato. Este esquema foi comparado a esquemas alternativos (EA) de imunossupressão. Evidenciamos não haver diferença significativa dos níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB nos diferentes esquemas.

Analizamos também se o tipo de imunossupressor tinha influência sobre os índices plaquetas/linfócitos (RPL) e neutrófilo/linfócito (RNL), fato este que poderia influenciar na maior ou menor expressão dos mediadores inflamatórios. Não evidenciamos diferença significativa entre os grupos EP e EA (Tabela6)

Tabela 5 – Análise dos níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB, e das relações Neutrófilos/Linfócitos e Plaquetas/Linfócitos dos pacientes no pós-transplante de acordo com o esquema de imunossupressão utilizado.

	Esquema padrão de IMS (n=30)	Esquema alternativo de IMS (n=8)	Controles saudáveis (n=19)	Valores de p		
				EP vs EA	EP vs C	EA vs C
sCD40						
Mediana (IQR)	237,2 (173,6 - 343,7)	327,6 (179,4 - 409,8)	64,9 (38,7 – 113,9)	0,64	0,0009	< 0,0001
sCD40L						
Mediana (IQR)	146,8 (68,3 - 248,9)	147,8 (76,9 - 332,6)	42,7 (13-69)	0,98	0,004	0,0001
s4-1BB						
Mediana (IQR)	144,3 (106,4 - 179,6)	166 (87,7 - 189,8)	64,9 (21,6 – 146,1)	0,84	0,001	0,0006
RPL						
Mediana (IQR)	217 (136,4 - 364,2)	288,6 (134 - 480,10)	-	0.63	-	-
RNL						
Mediana (IQR)	4,7 (2,92 - 12,43)	6,6 (3,6 – 12,6)	-	0.96	-	-

IQR: Interquartil (26-76%); DP: Desvio padrão. IMS: Imunossupressão. RPL: Relação Neutrófilos/Linfócitos; RNL: Relação Plaquetas/Linfócitos

6. DISCUSSÃO

A insuficiência cardíaca é indubitavelmente um grave problema de saúde pública e, quando existe refratariedade ao tratamento clínico, o transplante cardíaco torna-se a única terapêutica eficaz. A rejeição ao enxerto é uma complicação temível e esforços devem ser incentivados tanto para o diagnóstico precoce como pelo adequado tratamento da mesma. O presente estudo ressalta que a população submetida ao transplante em nosso meio está na principal faixa economicamente ativa. A média de idade de 40,39 anos sendo inferior à média da população mundial de transplantados pois, segundo dados da ISHLT, nos Estados Unidos, 60% dos receptores têm idade maior ou igual a 60 anos⁹.

O Brasil tem a cardiopatia chagásica como uma das principais etiologias da miocardiopatia dilatada e suas manifestações clínicas geralmente tornam-se evidentes entre a segunda e quarta década de vida¹³. O alto percentual de cardiopatia chagásica encontrada em nosso estudo contribuiu para que a média de idade da população fosse inferior.

Quando comparamos aos dados do estudo BREATHE que registra a epidemiologia dos pacientes internados por insuficiência cardíaca no Brasil, observamos que a miocardiopatia isquêmica é a mais prevalente tanto no Brasil como no nordeste do país⁴. Em nossa população, a miocardiopatia chagásica e a idopática foram as principais responsáveis pela indicação dos transplantes realizados (26,3% ambas), seguido pela miocardiopatia reumática e, somente em quarto lugar, a miocardiopatia isquêmica. O grande número de transplantes realizados nesse grupo de pacientes sugere que esta pode ser uma forma grave e refratária de IC. Outro fato que pode ter contribuído para esse achado é que os chagásicos são indivíduos mais jovens, onde as comorbidades graves estão menos presentes, não trazendo contra-indicações à realização do Tx cardíaco.

O protocolo institucional de imunossupressão utiliza dose baixa de corticosteroides associado a micofenolato e tacrolimus. Este protocolo foi utilizado em 86% dos pacientes estudados e destes, todos utilizaram a dose baixa de corticóide no primeiro mês pós transplante. Este esquema de imunossupressão foi recentemente implantado na instituição e foge às recomendações brasileiras para imunossupressão no transplante cardíaco. Apesar do esquema alternativo para o

uso de corticoide, o trabalho sugere a segurança e eficácia deste tratamento na população estudada. Apenas dois pacientes submetidos a Tx cardíaco apresentaram rejeição na biópsia endomiocárdica realizada nos primeiros 30 dias do procedimento, o que significa um percentual de rejeição de 6,26%. Dados de literatura sugerem maior incidência de rejeição nos primeiros dois anos após o Tx¹⁹, sendo particularmente elevada no primeiro ano, com uma incidência de até 30% dos casos neste período²¹.

Segundo a Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco, o diagnóstico de rejeição aguda humoral é dado através do achado de quadro clínico compatível, que geralmente ocorre quando há disfunção de enxerto associada à demonstração de anticorpos circulantes contra o doador do tipo anti HLA da classe I ou II6. Os dois pacientes que foram biopsiados antes dos 30 dias do transplante por apresentarem quadro clínico compatível com rejeição, tiveram a confirmação da rejeição humoral através dos achados de microscopia. Comparados aos dados mundiais que evidenciam uma taxa de rejeição humoral em torno de 10 a 20% dos casos¹¹, foi evidenciado baixo índice de rejeição humoral nessa população. Esse baixo percentual de rejeição pode ter sido encontrado porque os pacientes foram seguidos apenas até o primeiro mês do transplante, ocasião da biópsia protocolar. Sabemos entretanto, que este é o período de maior incidência de rejeição e que após o primeiro mês, esse percentual cai de forma significativa⁴². Biópsias sucessivas durante o primeiro ano do transplante cardíaco poderiam modificar este dado, porém não foi objetivo do estudo.

Ainda com relação a rejeição, tentamos identificar fatores que pudessem influenciar em sua frequência na população estudada. Não houve diferença estatística com relação ao sexo, idade, presença de comorbidades ou etiologia da miocardiopatia dilatada para os grupos com e sem rejeição. O sexo masculino mostrou-se mais frequente com relação à incidência de disfunção de enxerto em alguns estudos⁴⁰. Entretanto, a rejeição é apenas uma das várias causas de disfunção de enxerto, não nos permitindo fazer uma correlação com esse dado.

Identificar o momento ideal para tratar de forma mais agressiva a insuficiência cardíaca pode evitar complicações mais graves e minimizar a indicação do transplante. O marcador atual de insuficiência cardíaca que indica tanto a descompensação da doença como tem valor prognóstico da mesma é o BNP (*Brain*

natriuretic peptide). Este é secretado pelos ventrículos em resposta à sobrecarga de volume ou pressão.³² Novos marcadores tem somado informações sobre descompensação de doença e mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese da IC.

A molécula 4-1BB já havia sido testada anteriormente como marcador de doença coronariana grave, mostrando correlação positiva com os seus séricos e gravidade da doença²⁶. É evidente o papel dos linfócitos T CD4 na resposta inflamatória dos pacientes com síndrome coronariana aguda^{26,43}. Os linfócitos T CD4 deficientes de CD28 estão presentes em maior quantidade em pacientes com síndrome coronariana aguda e seus receptores de coestimulação, OX40 (CD134) e o 4-1BB (CD 137), membros na família de TNF, tem ação fundamental nessa resposta inflamatória. Um experimento evidenciou a alta concentração desses dois mediadores nos linfócitos presentes em placas ateroscleróticas de pacientes com síndrome coronariana aguda. Esse mesmo estudo testou o bloqueio do OX40 e 4-1BB e foi evidenciado menor produção de interferon γ e TNF α nos linfócitos CD4 isentos de CD28, fato esse que contribui para a importância desses mediadores na doença cardiovascular⁴³.

Na doença cardíaca de uma maneira geral, a inflamação é um processo que não está presente apenas na aterosclerose, mas em qualquer processo com perda da homeostase, nos processos que resultem em dano tecidual⁴⁴. O mal funcionamento das células, incluindo as células miocárdicas, desencadeia uma cascata inflamatória que é evidente em alguns casos⁴⁴. O dano tecidual na insuficiência cardíaca descompensada já é bem conhecido e, uma vez identificada a função do 4-1BB na inflamação crônica, o achado de elevação de seus níveis séricos, como no presente estudo, reforça a importância deste mediador inflamatório como marcador de doença grave.

Além do 4-1BB, outros mediadores inflamatórios como o sCD40 e o sCD40L também estiveram elevados no pré-operatório do transplante cardíaco com diferença significativa em relação aos controles saudáveis. Esses níveis séricos caíram de forma significativa no pós-operatório do Tx, ocasião em que os indivíduos estão, em sua grande maioria, compensados clinicamente. Em relação ao CD40L, essa queda não foi estatisticamente significativa, embora observemos uma tendência à queda, assim como os outros mediadores.

Um dos principais mecanismos ativadores da resposta adquirida é a ligação do CD40 ao CD40L expresso nos linfócitos T CD4 e plaquetas.⁴⁶ Já foi demonstrado que a deficiência de CD40L foi capaz de diminuir citocinas inflamatórias e os marcadores inflamatórios como VCAM-1, COX-2 e iNOS. Esse é o principal mecanismo da disfunção endotelial que está presente na maioria das doenças cardiovasculares^{24,26}.

Na insuficiência cardíaca, já foi evidenciado a correlação entre classe funcional da NYHA com níveis de sCD40L e CD40L plaquetário além de sua correlação com $\text{TNF}\alpha$ ⁴⁷. Inflamação e trombogênese caminham juntos na fisiopatologia desta doença e o estudo demonstrou que esses mecanismos são correlatos. Uma vez que a ligação CD40-CD40L desencadeia uma cascata de respostas inflamatórias que podem fazer parte da fisiopatologia do dano muscular cardíaco, o aumento dos níveis séricos desses mediadores pode ser causa ou consequência na descompensação da insuficiência cardíaca.

Esse fato nos leva a sugerir que sCD40, sCD40L e s4-1BB são mediadores de doença cardíaca descompensada e grave e levanta a possibilidade dos mesmos servirem como valor prognóstico e marcador de gravidade na IC, assim como já foi demonstrado na doença arterial coronária. Nesse sentido, avaliamos esses mediadores como potenciais biomarcadores preditivos de rejeição cardíaca. A primeira análise da dosagem de PCR no grupo com e sem rejeição não foi significativa, embora tenhamos observado tendência a níveis mais elevados no grupo com rejeição. A PCR é uma proteína de fase aguda presente no início do processo inflamatório, sendo um componente da resposta imune inata, cujo aumento dos níveis séricos estão associadas com o efeito sistêmico das citocinas $\text{TNF}\alpha$, IL1 e IL6 durante o processo inflamatório. A hipótese de correlação entre níveis séricos de PCR e rejeição já havia sido testada anteriormente, também com resultados negativos⁴⁰. Por outro lado, a PCR se mostrou ser um bom marcador para desenvolvimento de doença vascular do enxerto, um tipo de rejeição tardia⁴¹. Nesse estudo, o nível sérico de PCR na biópsia dos três primeiros meses após o Tx foi correlacionado com disfunção de enxerto num *followup* de 6 anos⁴¹. Quanto maior o nível de PCR, maior a incidência de doença vascular do enxerto⁴¹. No presente estudo, o pequeno número de rejeições de enxerto encontrado pode ter contribuído para que não tenhamos atingido significância estatística, uma vez que o valor de p

foi de 0,06 entre os grupos. Este dado de aumento de PCR e sua correlação com rejeição ainda é controverso na literatura atual^{40,41}.

Realizar o diagnóstico precoce e modular a resposta inflamatória pode ser fundamental para reduzir a rejeição e aumentar sobrevida no transplante cardíaco. Os marcadores inflamatórios sCD40, sCD40L e s4-1BB também foram dosados em pacientes com e sem rejeição a fim de se identificar a possibilidade de servirem como um método não invasivo para triagem de rejeição. No presente estudo, observou alterações nos níveis de 4-1BB na rejeição, enquanto que não houve diferença dos níveis sCD40 e sCD40L entre pacientes com ou sem rejeição. Apesar de não ter sido observado relevância da via CD40/CD40L nos pacientes com rejeição, foi descrito que essa via é importante na resposta inflamatória e está envolvida no processo de tolerância ao enxerto. Estudo em modelo animal que foi realizado o bloqueio dessa via, aumentou a tolerância ao enxerto³⁵.

A interação do 4-1BB ao seu ligante (4-1BBL) desencadeia resposta inflamatória dependente de linfócitos T e que esses têm papel fundamental na resposta imune e tolerância a enxerto³⁸. O bloqueio do 4-1BB em camundongos receptores de transplante de coração foi capaz de aumentar a tolerância ao enxerto. Os achados histopatológicos foram de menor resposta inflamatória caracterizada por infiltração linfocítica e lesão endotelial nos camundongos tratados com o bloqueio do 4-1BB⁴⁵. Em nosso estudo, evidenciamos concentrações reduzidas de 4-1BB em pacientes com rejeição, o que sugere que a forma livre de 4-1BB pode ocupar a região de ligação do 4-1BBL presentes nas células apresentadoras de antígenos e nas células do músculo liso, dificultando as interações entre essas células e os linfócitos T efetores auto-reativos. Os linfócitos TCD8 são fundamentais para a lesão cardíaca, pois produzem e liberam substâncias como perforina e granzimas que são responsáveis pela apoptose celular. As células musculares cardíacas expressam grande quantidade de ligantes (4-1BBL), o que leva a aumento de proliferação dos linfócitos T citotóxicos³⁸. Essas interações são responsáveis pela forte ativação dos linfócitos TCD8+ contra o enxerto, o que leva a uma rápida resposta inflamatória com elevada produção de mediadores inflamatórios, lesão vascular e cardíaca na rejeição ao enxerto⁴³.

Em modelos animais, o bloqueio da ligação 4-1BB/4-1BBL já foi utilizada para minimizar resposta inflamatória na artrite reumatoide e no lúpus eritematoso

sistêmico³⁸. Como relatado anteriormente, esse bloqueio também foi capaz de retardar rejeição aguda em camundongos⁴⁵. Para a rejeição descrita como doença vascular do enxerto que é caracterizada principalmente por proliferação de músculo liso e hiperplasia neointimal, o bloqueio do 4-1BB também foi testado. Existe evidência de sua expressão também nos linfócitos do tipo TCD4+ efetores, que tem papel principal na rejeição tardia. O bloqueio da via 4-1BB/ 4-1BBL por meio de anticorpos monoclonais anti-4-1BBL, foi capaz de reduzir a rejeição tardia em modelos animais³⁸. Portanto, a produção de s4-1BB pode estar envolvida nos mecanismos de regulação da resposta imune, pois os níveis séricos de s4-1BB elevados, pode exercer efeitos anti-inflamatórios sistêmicos por ocupar a fenda de ligação da via 4-1BB/4-1BBL, impedindo a expansão clonal de linfócitos T auto-reativos, o que leva no transplante cardíaco a proteção das células do miocárdio, por diminuir as interações entre essas células e os linfócitos T, com isso, ocorre a redução do processo inflamatório contra o enxerto³⁸.

A resposta inflamatória é desencadeada pela imunidade nata e adaptativa, sendo a última dependente da apresentação do antígeno. A PCR, como já comentada anteriormente, é uma proteína inespecífica relacionada a imunidade nata. Nesse estudo associamos dois marcadores de resposta inflamatória para a criação de um índice que fosse marcador precoce de rejeição. Os índices criados para sensibilização de marcadores de resposta inflamatória (associação da dosagem de sCD40, sCD40L e s4-1BB sobre PCR) foram excelentes marcadores de rejeição na população estudada. Essa associação entre níveis séricos de CD40L e PCR já foi utilizada no trabalho de Heeschen et al (2003), cujo autores avaliaram o risco de eventos cardiovasculares como infarto, morte e progressão de insuficiência cardíaca após síndrome coronariana aguda²⁴.

O objetivo da comparação dos índices plaquetas/linfócitos e neutrófilos/linfócitos nos grupos com e sem rejeição foi identificar possível influência destas células que participam diretamente da resposta inflamatória, na expressão dos marcadores inflamatórios sCD40, sCD40L e s4-1BB. Não identificamos diferença significativa entre os grupos com e sem rejeição, assim como no número de plaquetas, monócitos, neutrófilos e linfócitos, o que mostra a não influência dessas células circulantes na produção na rejeição aguda.

Outra hipótese é que pudesse existir diferença entre as etiologias de miocardiopatia dilatada para a expressão dos marcadores inflamatórios. Escolhemos a doença de chagas para comparar com as outras etiologias, uma vez que existe mecanismo bem estudado do desenvolvimento do processo inflamatório nos diferentes estágios de doença. Não identificamos diferença significativa dos mediadores sCD40L, sCD40 e s4-1BB entre os pacientes chagásicos e as outras etiologias como idiopática, reumática, isquêmica, hipertensiva, miocardites ou miocárdio não compactado. De acordo com dados de literatura, a resposta inflamatória desencadeada pelo dano tecidual é difícil de ser diferenciada de outros tipos de inflamação causadas por infecção, trauma, isquemia ou reperfusão⁴⁴. Dessa forma, o achado de não diferença das concentrações séricas desses mediadores foi compatível a outros estudos com doenças crônicas, independente de etiologia.

O esquema de indução de imunossupressão utilizado está fora dos padrões brasileiros e segue recomendações mundiais para utilização de doses mais baixas de corticosteroides. O tacrolimus tem sido a droga de escolha entre os inibidores da calcineurina e foi utilizado em 84,21% dos nossos pacientes. Analisamos se o tipo de imunossupressor influenciava nas dosagens séricas de sCD40, sCD40L e s4-1BB e nos índices plaquetas/linfócitos e neutrófilo/linfócito. Não identificamos diferença significativa entre os grupos com esquema imunossupressor padrão e o esquema alternativo. Dessa forma, testamos a hipótese da influência do imunossupressor no tipo de resposta inflamatória e na inibição da produção leucocitária como mecanismo protetor. O objetivo destas análises foi retirar fatores externos que pudessem influenciar no resultado encontrado em nosso estudo e tornar os resultados mais fidedignos.

Algumas limitações podem ter influenciado os resultados desse estudo. O seguimento dos pacientes foi de apenas 30 dias após o transplante, o que nos impede de analisar quadros de rejeição que poderiam estar em processo de desenvolvimento na ocasião da dosagem dos marcadores e da biópsia endomiocárdica.

Um aspecto a ser ressaltado é com relação ao tipo de rejeição estudada e a relação com os mediadores inflamatórios. Para a definição de qual o melhor mediador para prever rejeição, a análise dos tipos de rejeição deveria ter sido feita em separada e não em um grupo único. Como tivemos apenas dois casos de

rejeição humoral, as análises foram feitas de pacientes “com” e “sem” rejeição, sem caracterizar o mecanismo envolvido. Essa hipótese poderia testar se os mecanismos de alteração dos mediadores são os mesmos nos dois tipos de rejeição (humoral e celular).

Apesar dos pontos destacados, o estudo é importante, pois não foi necessário inclusão de um número maior de pacientes para que pudéssemos evidenciar alterações dos marcadores inflamatórios na rejeição cardíaca e IC avançada. Para confirmar as hipóteses levantadas, outros estudos são necessários a fim de se estabelecer pontos de corte e valores específicos em cada tipo de rejeição. Nenhum estudo evidenciou relação linear entre rejeição e dosagem destes mediadores em humanos. Sua função ou capacidade de ligação podem ser alvo de novos estudos em seres humanos a fim de se testar drogas que estimulem ou inibam esse mecanismo no processo inflamatório da rejeição aguda no miocárdio.

6. CONCLUSÕES

Com o presente estudo, concluiu-se:

- Níveis séricos de sCD40, sCD40L e s4-1BB estão significativamente elevados na insuficiência cardíaca avançada com posterior normalização no pós-transplante cardíaco. Isso sugere que esses mediadores possam ser possíveis biomarcadores de doença grave;
- A dosagem do 4-1BB foi útil na avaliação de rejeição de forma isolada e associado a PCR, sendo um potencial biomarcador preditivo de rejeição do enxerto no pós-transplante cardíaco. Os sCD40 e sCD40L não foram biomarcadores preditivos de rejeição na fase aguda;
- Não existe alteração dos níveis de sCD40, sCD40L e s4-1BB entre as diferentes etiologias da miocardiopatia dilatada, o que reforça o potencial desses mediadores com biomarcadores de prognóstico;
- Os índices 4-1BB/PCR e CD40/PCR foram bons biomarcadores de rejeição aguda do micorcardio.

7. REFERÊNCIAS

1. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal* 2016; 37, 2129–2200.
2. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93(1 supl.1): 1-71
3. Bocchi EA, Arias A, Verdejo H, Diez M, Gómez E, Castro P. The Reality of Heart Failure in Latin America. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; Vol. 62, (11).
4. Albuquerque D A, Souza Neto J D, Bacal F, Rohde L E, Pereira S B, Berwanger O, Almeida D R. I Registro Brasileiro de Insuficiência Cardíaca – Aspectos Clínicos, Qualidade Assistencial e Desfechos Hospitalares. *Arq Bras Cardiol.* 2016; 104 (6): 433-442.
5. Goda A, et al. Selecting patients for heart transplantation: comparison of the Heart Failure Survival Score (HFSS) and the Seattle heart failure model (SHFM). *J Heart Lung Transplantation*, 2011.
6. II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. *Arq Bras Cardiol* 2010; 94 (1): e16-e73.
7. Mandeep R. Mehra, MD (Chair), Charles E. Canter, MD et al. The 2016 International Society for Heart Lung Transplantation listing criteria for heart transplantation: A 10-year update. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, Vol 36, No 1, January 2016
8. Silva P R. Transplante cardíaco e cardiopulmonar: 100 anos de história e 40 de existência. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2008; 23(1): 146-162
9. Registro Brasileiro de Transplante Cardíaco. AnoXXIII n°2, jan-jun 2017.
10. The Internacional Society for Heart and Lung Transplantation.
<http://www.ishlt.org/registries>
11. Kobashigawa et al. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2011 march; 30: 3.
12. Grimm M, Rinaldi M, et al. Superior prevention of acute rejection by tacrolimus vs. cyclosporine in heart transplant recipients - a large European trial. *Am J Transplant* 2006; 6: 1387-97.
13. Bacal F, Silva CP, Bocchi EA, Pires PV, Moreira LF, Issa VS, et al. Mycophenolatemofetil increased Chagas' disease reactivation in heart transplanted patients: comparison between two different protocols. *Am J Transplant* 2006; 6: 2017-21

14. Michele A Z, Jian-Jun W, Galina V, Vandana Jay B and Nisha G. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *An Acad Bras Cienc* 2006; 77 (4)
15. Vespa GN, Cunha FQ and Silva JS. 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosomacruzi*- induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun* 1994; 62: 6177–6182
16. Higuchi MD. 1996. Endomyocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions. *São Paulo Med J* 1996; 113: 821–826.
17. Christian Kriehoff & Markus J. Barten & Lysann, et al. Assessment of sub-clinical acute cellular rejection after heart transplantation: comparison of cardiac magnetic resonance imaging and endomyocardial biopsy. *Eur Radiol* 2014; 24:2360–2371
18. Marcos Valério Coimbra Resende, Marcelo Luiz Campos Vieira, Fernando Bacal, José Lázaro Andrade, Noedir A. Stolf, Edmar Alcides Bocch. Ecocardiografia por Doppler Tecidual no Diagnóstico de Rejeição após Transplante Cardíaco. *Arq Bras Cardiol*. 2011
19. Craig R. Butler, MD, MS,^a Ana Maria Savu, PhD,^a Jeffrey A. Bakal, PhD,^b Mustafa Toma, MD,^a Richard Thompson, PhD,^c Kelvin Chow, PhD,^c Harris Wang, BS,^a Daniel H. Kim, MD,^a Michael Mengel, MD,^d Mark Haykowsky, PhD,^e Glen J. Pearson, PharmD,^a Padma Kaul, PhD,^a and Ian Paterson, MD^a. Correlation of cardiovascular magnetic resonance imaging findings and endomyocardial biopsy results in patients undergoing screening for heart transplant rejection. *J Heart Lung Transplant* 2016;34:643–660
20. Amarellia C, Santob, L S, Marraa, C et al. Early graft failure after heart transplant: risk factors and implications for improved donor–recipient matching. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 16 (2012) 67–62
21. Parag C. P, Douglas A. H, et al. High-Sensitivity Cardiac Troponin I Assay to Screen for Acute Rejection in Patients With Heart Transplant. *Circ Heart Fai*. 2014; 7:463-469
22. Kenji M, Daiji T, Kei I, Tokuko S, Toshio N, Epaminondas Z, Nikolitsa P. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *Journal of Cardiology* 2009; 63, 317—333.
23. Cozlea DL, Farcas DM, Nagy A, keresztesi AA, Tifrea R, Cozlea L, Caraska E. The Impact of C Reactive Protein on Global Cardiovascular Risk on Patients with Coronary Artery Disease. *Current Health Sciences Journal* 2013; 39 (4)
24. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm C W, M.D., van den Brand M, Boersma E, Zeiher A M, and Simoons M L. Soluble CD40 Ligand in Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med* 2003; 348:1104-11

25. Nerea V; James A L, et al. Soluble CD40L Risk Prediction After Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2003; 108:1049-1062.
26. Gray J C, Peter W. M. Johnson and Martin J. Glennie. Therapeutic potential of immunostimulatory monoclonal antibodies. *Clinical Science* 2006; 111, 93–106
27. Yan J, Wang C, Chen R, Yang H. Clinical implications of elevated serum soluble CD137 levels in patients with acute coronary syndrome. *Clinics*. 2013; 68(2):193-198.
28. Ingrid E. D, Paramita B, Caroline J F, Ian M L, Ricardo F A, Pitt L, Nicholas B, Juan C K. High Levels of Costimulatory Receptors OX40 and 4-1BB Characterize CD4-CD28null T Cells in Patients With Acute Coronary Syndrome. *CircRes*2012;110:867-869
29. Muthiah V, Stephen J G, Javed B, Hani N S, Eduard S, Gregory Y H L, Mihai G. The immunological axis in heart failure: importance of the leukocyte differential. *Heart Fail Rev* 2013; 18:836–846
30. Steve R O, David O H, et al. Predictive Power of the Relative Lymphocyte Concentration in Patients With Advanced Heart Failure. *Circulation* 1998; 97:19-22.
31. Shantsila E, Bialiuk N, Navitski D, Pyrochkin A, Gill PS, Pyrochkin V, Snezhitskiy V, Lip GY. Blood leukocytes in heart failure with preserved ejection fraction: impact on prognosis. *Int J Cardiol* 2011; 166(2): 337–338.
32. Miyamoto K, Takeuchi D, Inai K, Shinohara T, Nakanishi T. Prognostic value of multiple biomarkers for cardiovascular mortality in adult congenital heart disease: comparisons of single-two-ventricle physiology, and systemic morphologically right/left ventricles. *Heart Vessels* 2016.
33. Yana J C, Liua P, Dua R, Lianga Y, Mab G S, Zhub J, Luo D. Relationship between CD40 ligand expression and B type natriuretic peptide levels in patients with chronic heart failure. *Clinica Chimica Acta* 2008; 392: 17–20
34. Arne Y, Jan Kristian D, et al. Increased gene expression of tumor necrosis factor superfamily ligands in peripheral blood mononuclear cells during chronic heart failure. *Cardiovascular Research* 2002; 64 176–182.
35. Burrell BE, Lu G, Li XC, Bishop DK. OX40 costimulation Prevents Allograft Acceptance Induced by CD40- CD40L Blockade. *J Immuno*. 2009 January; Jan 1;182(1):379-90
36. Nova L E, Chana P, Mobillo P, Runglall M, Kamra Y, McGregor R, Lord GM, Lechler RI, Lombardi G. Increased CD40 ligation and reduced BCR signalling leads to higher IL-10 production in B cells from tolerant kidney transplant patients. *Transplantation*. 2016; Jul 28.

37. N. Shulzhenko, A. Morgun, A.P. Chinellato, G.F. Rampim, R.V.Z. Diniz, D.R. Almeida, and M. Gerbase-DeLima. CD27 But Not CD70 and 4-1BB Intragraft Gene Expression Is a Risk Factor for Acute Cardiac Allograft Rejection in Humans. *Transplantation Proceedings* 2002; 34, 474–476.
38. Saiki H, Suzuki J I, et al. Blockade of the 4-1BB Pathway Attenuates Graft Arterial Disease in Cardiac Allografts. *Int Heart J* 2008; 49: 106-118)
39. Peter J. Kennel¹ & P. Christian Schulze. Novel Biomarker Approaches for Managing Patients With Cardiac Transplantation. *Curr Heart Fail Rep* (2016) 12:328–332
40. Linda C. Battaes,¹ Caliskan K, Rizopoulos D, Constantinescu A, et al. Repeated Measurements of NT-pro-B-Type Natriuretic Peptide, Troponin T or C-Reactive Protein Do Not Predict Future Allograft Rejection in Heart Transplant Recipients. *Transplantation* 2016; 99: 680–686
41. Labarrere¹ C A, Woods J, Hardin J W, et al. Early Inflammatory Markers are independent Predictors of Cardiac Allograft Vasculopathy in Heart Transplant Recipients. *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0113260 December 9, 2014
42. Subherwal S, et al. Incidence of acute cellular rejection and non-cellular rejection in cardiac transplantation. *TransplantProc*, 2004
43. Dumitriu I, Baruah P, Finlayson C, et al. High levels of Coestimulatory Receptors OX40 and 4-1BB characterize CD40⁺ CD28^{null} T Cells in patients with acute coronary syndrome. *Circ. Res.* 2-12; 110: 857-869.
44. Park S, Kim H, Lee J, Cho H, Kwon B. Reverse signaling through the co-stimulatory ligand, CD137L, as a critical mediator of sterile inflammation. *Molecules and cells*, 2011; 33: 533-537.
45. Cho H, Kwon B, Yagita H, et al. Blockade of 4-1BB (CD137)/4-1BB Ligand interactions increases allograft survival. *TransplInt* 2004: 351-361.
46. Hausding M, Jurk K, Daub S, et al. CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol* 2013: 108, 386
47. Pignatelli P, Cangemi R, Celestini A, et al. Tumor necrosis factor α upregulates platelet CD40L in patients with heart failure. *Circulation*: 2008;78, 515-522.

Apêndice 1

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

NOME:

REGISTRO:

SEXO:

IDADE:

DATA DO TRANSPLANTE:

ETIOLOGIA DA MIOCARDIOPATIA			
CHAGASICA ()	ALCOOL ()	IDIOPÁTICA ()	OUTRAS:
ISQUEMICA ()	HIPERTENSIVA ()	DAVD ()	
VALVAR ()	PERIPARTUM ()	RESTRITIVA ()	

PAINEL IMUNOLÓGICO		REALIZAÇÃO DE CROSS		
TIPO I:	TIPO II:	VIRTUAL:	CITOTOXICO:	NAO ()

COMORBIDADES DO PACIENTE				
HAS ()	IRC DIALÍTICO ()	TABAG ATIVO ()	OUTRAS:	
DM ()	IRC CONSERV ()	TABAG INATIV ()		
DAC CRÔNICA ()	Câncer na família ()	Cancer ativo ()		
		AUTO-IMUNIDADE ()		

ESQUEMA DE INDUÇÃO:			
CORTICOIDE EM DOSE PADRÃO	() SIM	() NÃO	DOSE: MG
CORTICOIDE EM DOSE BAIXA (CCE)	() SIM	() NÃO	DOSE: MG
BASILIXIMAB	() SIM	() NÃO	DOSE: MG
THYMOGLOBULINA	() SIM	() NÃO	DOSE: MG

DATA DA BIÓPSIA:

() PRIMEIRA () SEGUNDA () TERCEIRA () POS INTERVENÇÃO

ESQUEMA DE IMUNOSSUPRESSÃO:			
PREDNISONA	() SIM	() NÃO	DOSE: MG
MICOFENOLATO	() SIM	() NÃO	DOSE: MG
AZATIOPRINA	() SIM	() NÃO	DOSE: MG
CICLOSPORINA	() SIM	() NÃO	DOSE: MG
TACROLIMUS	() SIM	() NÃO	DOSE: MG
SIROLIMUS	() SIM	() NÃO	DOSE: MG
OUTROS			

GRAU DE REJEIÇÃO:

INTERVENÇÃO () SIM () NÃO

ACHADOS CLÍNICOS

IC DESCOMPENSADA	() SIM() NÃO	VOMITOS	() SIM() NÃO
CLEARANCE < 30	() SIM() NÃO	ASTENIA	() SIM() NÃO
FEBRE	() SIM() NÃO	Sinais clínicos de infecção	() SIM () NÃO

MARCADORES SÉRICOS:

MARCADOR	ATA	NÍVEL SÉRICO	MARCADOR	DATA	NÍVEL SÉRICO
sCD40			Linfócitos		
sCD40L			Leucocitos		
4-1BB			Plaquetas		
PCR			Neutrofilos		

Apêndice 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: Avaliação dos níveis séricos de OX40 e CD40L como biomarcadores preditivos de rejeição pós Transplante Cardíaco

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa com finalidade de testar um novo método diagnóstico para rejeição no pós operatório de transplante de coração.

Eu, _____, portador do documento de identidade No. _____, abaixo assinado, dou o meu consentimento livre e esclarecido para participar como voluntário da pesquisa supracitada, sob a responsabilidade do pesquisadora Verônica Soares Monteiro, membro do doutorado em Medicina Translacional UNIFESP/ IMIP.

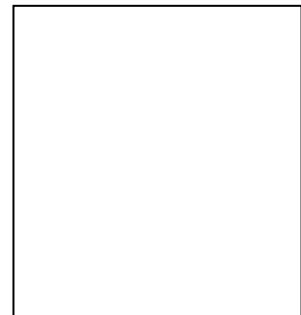
Assinado este termo de Consentimento, estou ciente de que:

1. Esta pesquisa tem como objetivo principal avaliar o valor do nível sérico de OX40 no diagnóstico de rejeição do transplante cardíaco.
2. No momento da realização da biópsia cardíaca que faço de rotina no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), terei meu sangue coletado a fim de se realizar dosagem do OX40. Os riscos referentes ao procedimento estão relacionados apenas à biópsia cardíaca, que já seria realizada independente da participação na pesquisa.
3. Não terei qualquer tipo de ônus com este procedimento, como também não serei remunerado pela participação nesta pesquisa.
4. Terei acesso irrestrito aos pesquisadores através de contato telefônico (Dra. Verônica 98899.4926) ou por e-mail: veronica.monteiro@imip.org.br. A pesquisadora responsável poderá ser contactada também no seguinte endereço: Av 17 de Agosto n. 2483 apto 1001, Casa Forte Recife, PE. Terei também acesso ao hospital a que pertenço (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira) a qualquer tempo para maiores esclarecimentos a respeito da pesquisa, riscos e benefícios relacionados à mesma e sobre os exames realizados. O comitê de ética do IMIP também se coloca à disposição a esclarecer qualquer dúvida relacionado a pesquisa ou o procedimento. Este está situado à Rua dos Coelho, 300, Boa Vista no Prédio Administrativo Orlando Onofre e funciona de segunda a sexta-feira de 7:00 às 11:30 e de 13:30 às 16:00h. O telefone é 2122 4100 e o e-mail para contato é comitedeetica@imip.org.br
5. Terei liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuidade da assistência.
6. Terei meu nome e identidade mantidos em absoluto sigilo e privacidade.
7. O IMIP disponibilizará assistência médica integral por eventuais danos à saúde que possam ser ocasionados pela pesquisa, bem como indenização pelos pesquisadores por estes eventuais danos.

Assinatura do Voluntário

1ª testemunha

2ª testemunha



Anexo 1



INSTITUTO DE MEDICINA
INTEGRAL PROFESSOR
FERNANDO FIGUEIRA -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos níveis séricos de OX40 e CD40L como biomarcadores preditivos de rejeição pós Transplante Cardíaco

Pesquisador: verônica soares monteiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52703415.1.0000.5201

Instituição Proponente: Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP/PE

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.472.094

Apresentação do Projeto:

No projeto em tela a pesquisadora discute sobre os possíveis biomarcadores de rejeição em questão (OX40 e CD40L) e propõe avaliá-los como possíveis biomarcadores de rejeição pós transplante.

Trata-se de resposta a pendência do parecer 1.413.626

Objetivo da Pesquisa:

Foram mantidos os objetivos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As mesmas

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

a pesquisadora fez ajustes sugeridos pelo CEP

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

foram feitos ajustes no TCLE e Metodologia de acordo com o recomendado em parecer prévio

Recomendações:

Sugiro, a critério de pesquisador, considerar um grupo controle com Insuficiência Cardíaca porém sem transplante (controle positivo)

Endereço: Rua dos Coelhos, 300

Bairro: Boa Vista

CEP: 50.070-550

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2122-4756

Fax: (81)2122-4782

E-mail: comitedeetica@imip.org.br



INSTITUTO DE MEDICINA
INTEGRAL PROFESSOR
FERNANDO FIGUEIRA



Continuação do Parecer: 1.472.094

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

emitir relatórios parciais semestrais e final

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_618330.pdf	26/03/2016 08:21:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEOX40.docx	26/03/2016 08:21:30	verônica soares monteiro	Aceito
Outros	anuencia.pdf	21/01/2016 22:37:15	verônica soares monteiro	Aceito
Folha de Rosto	platco.pdf	10/11/2015 12:36:02	verônica soares monteiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	29/10/2015 21:32:09	verônica soares monteiro	Aceito

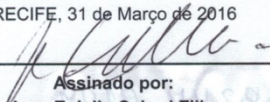
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 31 de Março de 2016


Assinado por:
Jose Eulalio Cabral Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua dos Coelho, 300

Bairro: Boa Vista

CEP: 50.070-550

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2122-4756

Fax: (81)2122-4782

E-mail: comitedeetica@imip.org.br