

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

SAMUEL PADOVANI STEFFEN

**Análise da expressão gênica na disfunção primária do enxerto
em receptores adultos submetidos a transplante cardíaco**

**São Paulo
2024**

SAMUEL PADOVANI STEFFEN

**Análise da expressão gênica na disfunção primária do
enxerto em receptores adultos submetidos a transplante
cardíaco**

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Fábio Biscegli Jatene
Coorientador: Dr. Fábio Antônio Gaiotto

**São Paulo
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Steffen, Samuel Padovani

Análise da expressão gênica na disfunção primária do enxerto em receptores adultos submetidos a transplante cardíaco / Samuel Padovani Steffen; Fábio Biscegli Jatene, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1.Transplante cardíaco 2.Disfunção primária do enxerto
3.Expressão gênica I.Jatene, Fábio Biscegli, orient. II.Título

USP/FM/DBD-399/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Nome: Samuel Padovani Steffen

Título: Análise da expressão gênica na disfunção primária do enxerto em receptores adultos submetidos a transplante cardíaco

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

Aprovada em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Fábio Biscegli Jatene

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família.

À minha esposa Camila!

Obrigado por permanecer sempre ao meu lado, por me estimular a ser cada dia melhor e por compreender todas as minhas ausências. A sua presença na minha vida faz com que eu siga meus dias de forma leve e feliz. Se Deus permitir, continuaremos de mãos dadas enfrentando todos os capítulos novos que a vida nos preparar.

Te amo!

À minha pequena Rafaela!

O seu nascimento transformou a minha forma de entender o mundo. Peço a Deus que me dê saúde e longos anos de vida para estar sempre por você e com você, em qualquer situação. Que eu possa ser, juntamente com a mamãe, o seu porto seguro e exemplo de vida!

Ao meu pai Valder!

Obrigado por demonstrar que o esforço e a dedicação realmente constroem uma brilhante carreira. Obrigado pelos conselhos, apoio e todos os momentos vividos em família nesses últimos 40 anos.

À minha mãe Carmen!

Exemplo de altruísmo e dedicação à família. Obrigado por não medir esforços em me trazer bem-estar, ensinamentos e orientações desde a infância. Mesmo com o trabalho diário de professora, sempre cuidou de toda a família com carinho e, principalmente, com a sua presença.

À minha irmã Nathalie!

Obrigado pelos conselhos de vida e de família. O Seu exemplo de como expressar para os outros a sua forma de pensar é inspirador e sua inteligência sempre me impressionou! Obrigado por ter me tornado tio da Emilia e cunhado do Diego, outro ser humano de inteligência invejável.

À Yara Lambert, agora vovó Yara!

Obrigado por nos ajudar tanto nos cuidados com a Rafaela aqui em São Paulo, desde o seu nascimento. Ela é sortuda em ter você como vovó e eu também como seu genro.

Aos meus tios médicos: Georges, Vânia e João Henrique!

Tio Georges, obrigado por ter cuidado de mim como médico pediatra durante tantos anos. Sua dedicação à medicina e aos seus pacientes sempre foi um exemplo para a minha vida profissional. ***Tia Vânia***, obrigado também por ter cuidado de mim, especialmente me recepcionando ao nascimento! Obrigado por ter me iniciado na vida acadêmica, me ajudando a fazer minha primeira IC na faculdade. A maneira como a Profa. Dra. Vânia coordenou e cuidou de todos os prematuros daquela UTI neonatal no HC é um exemplo de liderança para mim e para várias gerações. ***Tio João Henrique Steffen (in memoriam)***, mesmo não convivendo durante a sua vida profissional, as suas histórias foram inspiradoras. Se Deus permitir, da mesma maneira como o sr. disse aos 94 anos em homenagem recebida pelos serviços prestados como Médico, quero poder, ao final da minha vida profissional, dizer da mesma forma: “combati o bom combate, terminei a carreira, guardei a fé.”

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **Deus**, autor da vida, que me proporcionou capacidade física, intelectual e emocional para exercer a profissão de médico e cirurgião cardiovascular.*

*Agradeço a todos os **pacientes** que pude ajudar durante todo esse tempo. O real motivo da minha profissão é ter a confiança de cada um de vocês para poder atuar como médico e fazer diferença em suas vidas.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fábio Biscegli Jatene**, obrigado pelo tempo, tão precioso e curto em sua posição, investido para me ajudar na construção desta tese. Obrigado pela compreensão durante esse período, pelo interesse em sempre me ajudar e pela oportunidade dentro do InCor. Serei eternamente grato.*

*Ao meu coorientador, **Dr. Fábio Antônio Gaiotto**, obrigado pela confiança ao me colocar na posição de cirurgião do Núcleo de Transplantes do InCor, obrigado pelas incansáveis oportunidades cirúrgicas e por permitir e estimular, de forma singular, o meu crescimento profissional. Sua forma de liderança é rara e inspira todos que estão a sua volta. Obrigado pelos conselhos em relação a essa tese e conselhos em relação à vida. **Viva a “Gaiottologia”**: respeito ao paciente, habilidade técnica e velocidade máxima!.*

*A **Dra. Fabiana Goulart Marcondes Braga**, exemplo de médica e de pesquisadora. Obrigado por me ajudar a construir esse trabalho.*

*Ao **Dr. Alexandre Pereira**, obrigado pela ajuda na idealização do estudo e, principalmente, por ter viabilizado as análises genéticas.*

*A todos os meus colegas cirurgiões do Núcleo de Transplantes do InCor. **Dr. Domingos, Dr. Ronaldo, Dra. Shirleyne e Dr. Gaiotto**. Obrigado pela ajuda na coleta das biópsias, mesmo nas madrugadas. Obrigado por me ensinarem a cada cirurgia, a cada transplante. É um privilégio trabalhar com vocês.*

*A todos os cardiologistas do Núcleo de Transplantes do InCor. **Prof. Fernando Bacal, Dra. Iáscara, Dr. Luis Seguro, Dra. Mônica e Dr. Sandrigo.** Obrigado pelo apoio e convivência nos últimos anos.*

A todas as enfermeiras do Núcleo. O trabalho de vocês é que viabiliza todo o processo do transplante. Obrigado pelo apoio, pela ajuda com os dados e por estarem sempre disponíveis. Vocês são sensacionais.

Aos demais colegas, residentes, fellows e funcionários do Núcleo de Transplantes do InCor. Obrigado pela convivência alegre e exemplos de trabalho.

*Aos meus colegas de trabalho da LEV Cardiovascular, a melhor equipe de cirurgia cardíaca do Brasil!! **Dr. Gaiotto, Dr. Ranieri, Dra. Shirlyne, Dr. Lucas Bonamigo, Dr. Lucas Cardoso, Dra. Paula Martins, Dr. Cristiano e Dr. Aislan.** Vocês são como família! Obrigado por terem me ajudado durante o período das disciplinas, coletas de dados e confecção dos textos. Um agradecimento especial ao **Dr. Lucas Cardoso**, quem me ajudou sobremaneira no dia a dia cirúrgico, principalmente durante as minhas ausências para a realização dessa tese.*

*Aos colegas cirurgiões de Uberlândia! **Dr. Paulo Cesar Santos, Dr. Cláudio Ribeiro da Cunha e Dr. Daniel de Conti.** Obrigado por terem me apresentado a cirurgia cardíaca. Obrigado pelos conselhos e por terem permitido, por tantas vezes, a minha presença nas cirurgias, mesmo enquanto acadêmico.*

*Ao colega cirurgião **Álvaro Perazzo**, residente do Núcleo de Transplantes. Obrigado por me estimular a manter acesa a chama da ciência e da academia no meu dia a dia. Obrigado pelas inúmeras ajudas nas cirurgias e por ter auxiliado na escrita do artigo e formatação. Serei sempre grato! Seu futuro é promissor.*

*“Se eu puder evitar que um coração se parta, a
minha vida não terá sido em vão... aliviar o
sofrimento de uma vida, ou encaminhar um
passarinho perdido de volta ao ninho, a minha
vida não terá sido em vão”*

Emily Dickinson

“Belief comes before ability”
Nick Bare

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	Aspectos históricos do Transplante Cardíaco	25
2.2	O Transplante Cardíaco na atualidade	30
2.3	Complicações pós transplante cardíaco	33
2.4	Disfunção Primária do Enxerto – DPE.....	35
2.4.1	Definição e classificação da DPE	35
2.4.2	Incidência da DPE	37
2.4.3	Fisiopatologia da DPE	37
2.4.4	Fatores de risco para DPE	40
2.4.5	Manejo e tratamento da DPE	41
2.5	A expressão gênica e a Justificativa do estudo	42
3	OBJETIVOS	46
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	48
4.1	Critérios de Seleção	48
4.2	Captação do enxerto e proteção miocárdica	48
4.3	Coleta das biópsias	49
4.4	Definição da Disfunção Primária de Enxerto	50
4.5	Descrição da amostra estudada	52
4.5.1	Descrição dos dados dos receptores	52
4.5.2	Descrição dos dados dos doadores	54
4.5.3	Dados do procedimento cirúrgico	56
4.6	Análise da expressão gênica	56

4.6.1	Extração do RNA	57
4.6.2	A diferenciação da expressão gênica utilizando o pacote DESEQ2	57
4.7	Análise estatística	58
5	RESULTADOS	61
5.1	Avaliação e evolução após o transplante	61
5.2	Dados relacionados ao perioperatório	61
5.3	Análise da expressão gênica	65
6	DISCUSSÃO	70
6.1	Limitações	74
6.2	Perspectivas futuras	75
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVCH	Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico
BIA	Balão Intra-aórtico
B3GALT 5	Beta-1,3- Galactosyltransferase 5
CEC	Circulação Extracorpórea
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPE	Disfunção Primária de Enxerto
DVA	Droga Vaso Ativa
DEG	Diferenciação da expressão gênica
DESEQ2	Differential Expression Analysis for Sequence Cont Data
ECMO	Oxigenação por membrana extracorpórea
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HSA	Hemorragia Subaracnóidea
IC	Índice Cardíaco
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCOR	Instituto do Coração
IQC	Intervalo Interquartil

ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
LVAD	Dispositivo de assistência circulatória esquerda de Longa
L2FC	Log2 Fold Change
ME	Morte Encefálica
MYL4	Myosin Light Chain 4
NYHA	New York Heart Association
PAM	Pressão Arterial Média
PCP	Pressão Capilar Pulmonar
PCWP	Pressão de Oclusão Pulmonar
PSAP	Pressão Sistólica da Artéria Pulmonar
PVC	Pressão Venosa Central
PRC	Parada cardiorrespiratória
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
RVP	Resistência vascular pulmonar
TCE	Traumatismo Crânio Encefálico
TPG	Gradiente transpulmonar
UNOS	United Registry for Organ Sharing
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos dos receptores transplantados	53
Tabela 2 - Dados relacionados aos doadores	55
Tabela 3 - Características gerais dos pacientes com e sem Disfunção Primária do Enxerto	62
Tabela 4 - Dados relacionados ao perioperatório do transplante cardíaco	63

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Dr. Christiaan Barnard e Louis Washkansky, o primeiro receptor de coração do mundo.....	26
Figura 2 - Denise Darvall, a primeira doadora de coração do mundo	27
Figura 3 - Em pé: Dr. Norman Schumay e Dr. Richard Lower. Abaixo, o veterinário Dr. Stofer com um animal transplantado	27
Figura 4 - Fotografia do preparo do primeiro coração transplantado no Brasil	29
Figura 5 - Aspecto final do primeiro transplante cardíaco do Brasil.....	29
Figura 6 - Principais mecanismos envolvidos na DPE.....	39
Figura 7 - Coleta de biópsia do ventrículo esquerdo, imediatamente antes do implante do coração	49
Figura 8 - Distribuição das amostras analisadas no estudo	61
Quadro 1 - Classificação de INTERMACS adaptada para avaliação de fragilidade	32
Quadro 2 - Classificação da Disfunção Primária de Enxerto (DPE)	51
Gráfico 1 - Etiologias da Insuficiência Cardíaca na amostra estudada	54
Gráfico 2 - Tipos de Morte Encefálica dos doadores da amostra	56

Gráfico 3 - Comparação da fração de ejeção nas primeiras 24 horas após o transplante cardíaco	63
Gráfico 4 - Comparação das pressões pulmonares dos pacientes com e sem DPE	64
Gráfico 5 - Comparação da PVC dos pacientes com e sem DPE.....	64
Gráfico 6 - Comparação do escore inotrópico dos pacientes com e sem DPE	65
Gráfico 7 - Distribuição dos genes diferentemente expressos nos corações com DPE, em uma análise comparativa, separados quanto a sua expressão e valor de P.....	66
Gráfico 8 - MA plot: Distribuição de todos os transcritos identificados, com destaque para aqueles associados a DPE	67
Gráfico 9 - “Vulcano plot” demonstrando os genes com maior ou menor expressão, com significância estatística	68

RESUMO

Steffen SP. *Análise da expressão gênica na disfunção primária do enxerto em receptores adultos submetidos a transplante cardíaco* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Introdução: O transplante cardíaco permanece sendo o tratamento de escolha para a insuficiência cardíaca avançada, apesar de vários avanços no tratamento clínico e cirúrgico da insuficiência cardíaca. Muitos são os fatores que contribuem para a morbimortalidade dos pacientes submetidos ao transplante cardíaco, sendo a Disfunção Primária de Enxerto (DPE) a principal causa de mortalidade precoce após o transplante cardíaco. A real patogênese da DPE ainda permanece indefinida, porém já foi demonstrado que a injúria de isquemia/reperfusão é o principal fator. O coração do doador é submetido a variados tipos de insultos durante o processo do transplante, incluindo a morte encefálica, hipotermia, isquemia fria e quente e finalmente a reperfusão, levando à diminuição da sobrevida do enxerto e DPE. Dado a importância do tema, vários centros transplantadores têm buscado estudar e entender a fisiopatologia da DPE. A avaliação do perfil genético através de técnicas de transcriptomas poderá esclarecer melhor a fisiopatologia da DPE. **Objetivo:** Avaliar, comparativamente, a partir de análises proteômicas de amostras de tecido miocárdico de corações transplantados, o perfil da expressão gênica tecidual nos enxertos que desenvolveram DPE e comparar com os que não desenvolveram DPE. Identificar, nos enxertos que desenvolveram DPE, o grau de expressão dos principais genes envolvidos. **Métodos:** Pacientes adultos submetidos ao transplante cardíaco em nosso serviço foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O diagnóstico da DPE foi realizado através dos critérios da ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation). Dados clínicos e laboratoriais dos doadores e receptores foram analisados. Foram incluídos no protocolo 20 pacientes consecutivos submetidos ao transplante cardíaco. Seis pacientes apresentaram DPE. A análise da expressão gênica foi realizada através de biópsias no momento do implante do coração doado. **Resultados:** Onze genes tiveram sua expressão significativamente diferente nos pacientes com DPE, sendo o MYL4 o gene com menor expressão e o gene B3GALT5 com a maior expressão. **Conclusão:** A expressão gênica nos pacientes com DPE é diferente quando comparada aos pacientes sem DPE, sendo o gene MYL4 muito menos expresso e o B3GALT5 muito expresso. O estudo futuro dessa expressão gênica poderá trazer luz a fisiopatologia e trazer possíveis biomarcadores da doença.

Descritores: Transplante cardíaco; Disfunção primária do enxerto; Expressão gênica.

ABSTRACT

Steffen SP. *Gene expression analysis of primary graft dysfunction in adult heart transplant recipients* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2024.

Introduction: Cardiac transplantation remains the treatment of choice for advanced heart failure despite several advances in the clinical and surgical treatment of heart failure. Several factors contribute to the morbidity and mortality of patients undergoing heart transplantation, and Primary Graft Dysfunction (PGD) is the main cause of early mortality. The actual pathogenesis of PGD remains undefined, but it is already known that ischemia / reperfusion injury is the main factor. The donor heart is subjected to various types of insults during the transplant process, including brain death, hypothermia, cold and hot ischemia and finally reperfusion, leading to decreased graft survival and PGD. Given the importance of the theme, several transplant centers are studying the pathophysiology of PGD by analyzing the epidemiological, clinical and possible biomarkers of transplant patients who developed PGD. In addition, evaluation of the genetic profile through transcriptome techniques may better clarify the pathophysiology of PGD. **Objective:** To evaluate, through proteomic analysis from myocardial biopsies of transplanted hearts, the gene expression profile of patients with PGD and to compare it with patients without PGD. **Methods:** Adult patients submitted to heart transplantation in our service were included in the study after signing the Informed Consent Term. The diagnosis of PGD observed the ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) criteria. Clinical and laboratory data from donors and recipients were evaluated. We included in the protocol 20 consecutive patients submitted to cardiac transplantation. The analysis of the gene expression profile was performed through biopsies at the time of donor heart implantation. **Results:** Eleven genes had their expression significantly different in patients with PGD, with MYL4 the less expressed gene and the B3GALT 5 the most expressed one. **Conclusion:** The gene expression in patients with PGD is different when compared to patients without PGD. MYL4 gene was much less expressed in these patients and B3GALT5 was overexpressed. Future studies regarding gene expression on PGD may clarify the pathophysiology and provide possible biomarkers of the disease..

Descriptors: Heart transplant; Primary graft dysfunction; Genic expression.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O transplante cardíaco permanece sendo o tratamento de escolha para a insuficiência cardíaca avançada, apesar de vários avanços no tratamento clínico e cirúrgico da insuficiência cardíaca^{1,2}. Segundo dados da Sociedade Internacional de Transplante Cardíaco e Pulmonar (ISHLT – International Society for Heart and Lung Transplantation) na última década foram registrados no mundo uma média de 4000 transplantes cardíacos por ano em pacientes adultos, sendo perto de 5000 nos últimos anos. Porém, acredita-se que esse registro corresponda apenas a um pouco mais da metade do total de transplantes realizados, uma vez que nem todos os centros reportam seus dados³. O Brasil tem ocupado cada vez mais espaço neste campo, se colocando como referência mundial no transplante cardíaco em pacientes portadores da doença de Chagas¹.

A sobrevida após o transplante cardíaco evoluiu de forma exponencial desde o primeiro procedimento em 1967, indo desde 1 semana no primeiro transplante, até uma média atual de 10 anos, existindo relatos de pacientes com sobrevida acima de 30 anos^{4,5}. Esse avanço pode ser atribuído a vários fatores, como manejo adequado dos doadores, técnicas de preservação do órgão, técnica cirúrgica apurada, drogas imunossupressoras e conhecimentos adquiridos ao longo das últimas décadas no manejo do diagnóstico e tratamento das rejeições^{6,7,8}. Apesar dessa melhora importante da sobrevida, vários fatores ainda contribuem para a morbimortalidade dos pacientes submetidos ao transplante cardíaco. Neste contexto, a Disfunção Primária de Enxerto (DPE) se

coloca como a principal causa de mortalidade precoce após o transplante cardíaco.

A DPE é atualmente definida como disfunção ventricular esquerda, direita ou biventricular, que ocorre nas primeiras 24 horas após o procedimento e que não está associada a causas discerníveis, como rejeição hiperaguda, hipertensão pulmonar ou complicações cirúrgicas⁹. A definição da DPE, juntamente com os critérios de classificação, foi estabelecida em 2013 durante uma conferência internacional da Sociedade Internacional de Transplante Cardíaco e Pulmonar (ISHLT), gerando um consenso sobre o tema⁹. Antes do desenvolvimento dessa classificação, dados de vários centros transplantadores mostravam uma incidência de DPE que variava entre 2,3% até 28,2%^{10,11}. Essa grande variação da incidência entre os centros demonstrava a diferença dos parâmetros que eram adotados para o diagnóstico, desde parâmetros hemodinâmicos e ecocardiográficos, até em relação à necessidade de suporte inotrópico ou mecânico, muitas vezes não excluindo certos critérios, como a rejeição⁹. O consenso da ISHLT demonstra que o desenvolvimento da DPE é multifatorial, sendo afetado por características clínicas dos doadores e receptores e envolvendo todos os aspectos em torno do transplante, como eventos relacionados à captação e preservação do órgão¹². Muitos estudos já foram realizados a fim de identificar os fatores de risco que levam ao desenvolvimento da DPE. Tendo em vista o curto espaço de tempo em que a DPE se desenvolve e os inúmeros fatores relacionados ao doador que podem ser potenciais causadores da disfunção, acredita-se que fatores fisiológicos dos doadores que afetam negativamente a função cardíaca, continuam a afetar após o transplante realizado. Assim, a fisiopatologia da DPE se inicia no doador, mas

se perpetua no órgão após o transplante^{9,10}. Obviamente, dentre os fatores de risco associados, sabe-se que o processo de preservação do enxerto também tem papel fundamental no desenvolvimento da DPE. Existe uma grande variedade de soluções de preservação do enxerto, com mais de cem disponíveis. Obviamente, elas podem se diferir no grau de preservação dos cardiomiócitos. Em um estudo retrospectivo realizado por George TJ e colaboradores, demonstrou-se que em corações preservados com a solução Celsior, áreas de isquemia foram mais presentes nas biópsias quando comparados com corações preservados pela solução da Universidade de Wisconsin e a solução Custodiol¹³. Associado a isso, o tempo de isquemia total do órgão também se coloca como um fator de extrema importância no desenvolvimento da DPE¹⁰.

Fatores relacionados ao receptor também são sabidamente contribuintes para o desenvolvimento da DPE. O cenário mais importante ocorre quando há ativação da resposta inflamatória sistêmica no receptor, resultando em circulação vasodilatada, a qual muitas vezes é refratária a terapia com suporte vasopressor. Essa resposta está mais presente nos pacientes em suporte circulatório mecânico, quando o tempo de circulação extracorpórea foi mais prolongado ou quando houve necessidade de transfusões de hemoderivados¹⁴.

A real patogênese da DPE ainda permanece indefinida, porém já foi demonstrado que a injúria de isquemia/reperfusão, com atordoamento do miocárdio, é o principal fator¹⁶. O coração do doador é submetido a variados tipos de insultos durante o processo do transplante, incluindo a morte encefálica, hipotermia, isquemia fria e quente e finalmente a reperfusão, exacerbando a injúria de isquemia/reperfusão, levando à diminuição da sobrevida do enxerto e DPE¹⁷. Os mecanismos fisiopatológicos da injúria de isquemia e de reperfusão

têm sido amplamente estudados no contexto da insuficiência cardíaca. Sabe-se que esse mecanismo está presente no desenvolvimento da falência miocárdica, independentemente da etiologia da doença¹⁸.

Estudos genéticos têm sido desenvolvidos desde a finalização do projeto genoma humano para tentar identificar os fenótipos de um miocárdio doente, particularmente aqueles que sofreram lesões de isquemia e reperfusão¹⁹. Os estudos tentam atualmente entender as vias genéticas no desenvolvimento dessa lesão, com o intuito de identificar possíveis alvos que possam ser modificados ou manipulados através de medicações, com o objetivo de diminuir as consequências da lesão de isquemia e reperfusão¹⁹. Estudos de transcriptomas em animais, demonstraram claramente a importância de alguns genes que nitidamente estão alterados no miocárdio que sofreu esse tipo de lesão. Através da técnica de transcriptomas é possível definir o perfil de expressão gênica tecidual do paciente em determinada situação clínica²⁰. Dessa forma, novos biomarcadores genômicos para o diagnóstico e prognóstico da DPE podem ser descobertos, o que impactaria no manejo clínico desses doentes. Tendo isso em vista, para entender melhor o desenvolvimento da DPE, uma análise profunda dos mecanismos da lesão miocárdica deve ser realizada, avaliando, dentre tantas variáveis, o perfil genético desse miocárdio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos do Transplante Cardíaco

A evolução do transplante cardíaco não se iniciou ou terminou com o primeiro realizado por Christiaan Barnard em 1967²¹. Olhando para o passado, por milhões de anos antes, a mitologia grega já tinha várias descrições de quimeras, incluindo animais com cabeças de leões e corpos de cabra. Essas criaturas, não exatamente receptores de transplantes, mas possuindo órgãos de mais de uma espécie, sem dúvidas instigou a imaginação dos cientistas daquela época²². A possibilidade do transplante de órgãos de forma geral, historicamente frequentou a mente dos estudiosos desde suas primeiras gerações. Marcada por desafios, a evolução do transplante cardíaco é uma das principais vitórias da medicina contemporânea. O que mais fascina no transplante de coração é entender que a sua realização foi fruto da intensa colaboração entre a ciência experimental básica, a técnica cirúrgica e a coragem de cirurgiões visionários, que não mediram esforços para serem pioneiros.

Há quase 57 anos, em 3 de dezembro de 1967, o mundo amanheceu fascinado com a reportagem do primeiro transplante cardíaco entre humanos. Realizado na África do Sul, em Cape Town, pelo cirurgião Christiaan Barnard, o primeiro receptor, Louis Washkansky (Figura 1), sofrida de miocardiopatia isquêmica e estava internado por insuficiência cardíaca terminal no hospital Groote Schuur. O coração transplantado veio de uma doadora, Denise Darvall

(Figura 2), que sofreu traumatismo craniano grave por um acidente de trânsito. A captação do enxerto ocorreu apenas após a parada cardiorrespiratória da doadora após a suspensão da ventilação mecânica. A técnica utilizada foi a mesma idealizada por Schumway e Lower em Stanford (Figura 3), onde vários cirurgiões de todo o mundo já haviam visitado e aprendido, incluindo o grupo do Barnard^{21,23}.



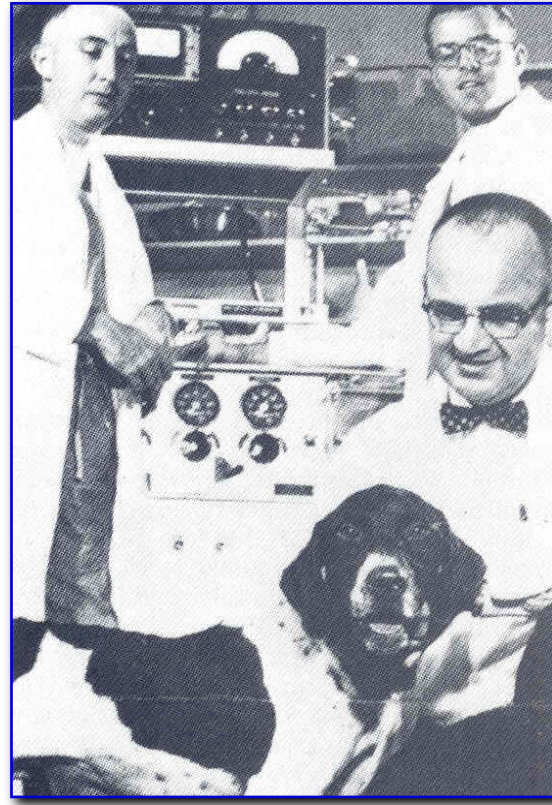
FONTE: Stolf.²⁸

Figura 1 - Dr. Christiaan Barnard e Louis Washkansky, o primeiro receptor de coração do mundo



FONTE: Stolf.²⁸

Figura 2 - Denise Darvall, a primeira doadora de coração do mundo



FONTE: Stolf.²⁸

Figura 3 - Em pé: Dr. Norman Schumay e Dr. Richard Lower. Abaixo, o veterinário Dr. Stofer com um animal transplantado

A prevenção da rejeição desse primeiro transplante do mundo foi realizada através de um coquetel de radiação local, azatioprina, prednisona e actinomicina C. Apesar de todos os esforços, incluindo a prevenção de infecções criando ambientes ‘estéreis’, Louis Washkansky faleceu no décimo oitavo dia de transplante por uma infecção pulmonar por *pseudomonas*²³. A coragem do Barnard ao realizar “The Operation”, como ele mesmo intitulou a publicação médica da cirurgia²¹, não respondia na época os principais questionamentos ainda desconhecidos no campo do transplante, principalmente éticos. Barnard

foi ovacionado, porém também muito criticado pela comunidade médica. Apesar das críticas, o grupo de Cape Town realizou um segundo transplante em menos de um mês após o primeiro, no dia 02 de janeiro de 1968. Esse paciente, Philip Blaiberg, viveu por 593 dias, o que trouxe grande publicidade ao caso^{24,25}.

O segundo transplante cardíaco realizado no mundo foi apenas três dias após o de Barnard. Dr. Kantrowitz do centro médico Maimonides em Brooklyn, Nova York, utilizou um enxerto de um doador anencéfalo e transplantou um recém-nascido de apenas 17 dias portador de anomalia de Ebstein. O receptor viveu apenas seis horas e trinta minutos²⁶. Dava-se início a primeira era do transplante de coração. Em 6 de janeiro de 1968, Norman Shumway fez o seu primeiro transplante em um paciente de 43 anos, que viveu apenas 15 dias. Apesar de não ter sido o pioneiro de data, Shumway trouxe inúmeras contribuições no campo do transplante cardíaco pelos próximos 20 anos de estudo na área²⁷. Mais de cem transplantes foram realizados no ano de 1968, em mais de 17 países, incluindo o Brasil.

O grupo liderado pelo professor Zerbini em São Paulo fez o primeiro transplante em 26 de maio de 1968 no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo²⁸. O receptor, portador de miocardiopatia dilatada grave, recebeu o coração de um doador vítima de traumatismo craniano. A captação do enxerto ocorreu em sala operatória ao lado da sala cirúrgica do receptor (Figura 4). Após a suspensão da ventilação, o coração parou e a perfusão do órgão foi imediatamente iniciada. O transplante transcorreu sem problemas, porém o receptor faleceu no vigésimo oitavo dia de pós-operatório por rejeição (Figura 5).



Figura 4 - Fotografia do preparo do primeiro coração transplantado no Brasil

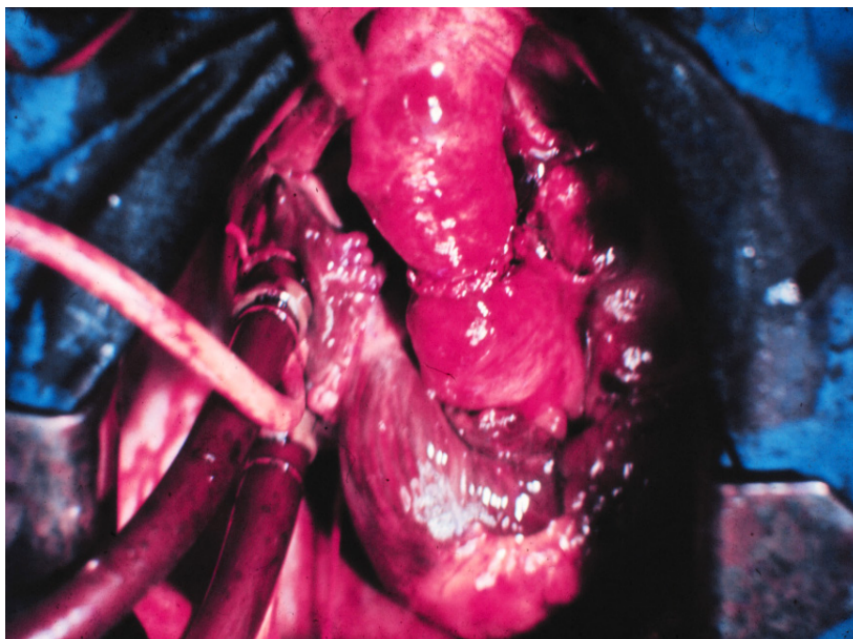


Figura 5 - Aspecto final do primeiro transplante cardíaco do Brasil

O entusiasmo médico inicial logo se esvaiu, pois as equipes e centros transplantadores entenderam que vários problemas ainda permaneciam não resolvidos²⁹. Assim, em 1969, 50 transplantes de coração haviam sido realizados

no mundo, em 1970 menos de 20 e em 1971 apenas 10. Na década de 70 apenas 4 centros estavam ativos em relação ao transplante cardíaco, porém os avanços vieram principalmente de um grupo, o de Stanford. A introdução da biopsia endomiocárdica para o controle de rejeição e o uso da ciclosporina em 1980, ambos iniciados em Stanford, abriram a era moderna do transplante cardíaco^{30,31}.

2.2 O Transplante Cardíaco na atualidade

O transplante cardíaco é o tratamento definitivo padrão ouro para os pacientes portadores de Insuficiência Cardíaca grave refratária aos tratamentos atuais. Nessa situação, os pacientes possuem grande limitação clínica e alta taxa de mortalidade¹. O aumento expressivo do número de transplantes no mundo se deu a partir da década de 90, porém esse número se mantém praticamente constante nas últimas décadas devido a limitação dos doadores, permanecendo entre 4000 e 5000 transplantes por ano³². No nosso país, a baixa taxa de aproveitamento dos doadores, em média 10%, faz com que exista uma perspectiva de aumento do número anual de transplantes, porém a realidade dos últimos anos demonstra que o número médio se mantém ao redor de 320 transplantes por ano¹.

Em relação as indicações ao transplante, os pacientes em fase avançada da Insuficiência Cardíaca (estágio D), que se mantém em classe funcional 3 ou 4, com internações recorrentes e com terapia medicamentosa e cirúrgica, quando necessária, otimizadas, devem ser considerados ao transplante³³. Além dos dados clínicos, testes objetivos devem ser realizados, com ênfase no teste

cardiopulmonar. Esse último possui dois parâmetros importantes, pois tem forte correlação com o prognóstico da IC, sendo o consumo de oxigênio (VO_2) e o equivalente ventilatório de gás carbônico (VE/VCO_2)¹. Quando os pacientes apresentam comorbidades que limitam a sobrevida ou parâmetros de exames que impeçam o tratamento cirúrgico, o transplante poderá ser contraindicado. Dentre os principais fatores de contraindicação, a hipertensão pulmonar fixa (especialmente com resistência vascular pulmonar acima de 5 unidades wood), o Diabetes com lesão de órgãos alvo e o painel imunológico proibitivo são os principais¹.

Uma vez candidato ao transplante, os receptores deverão ser avaliados de forma multiprofissional, incluindo análises psicológica, nutricional e social. Além disso, a utilização de ferramentas de avaliação prognóstica deve ser constantemente empregada. Isso contempla escores de fragilidade, marcadores clínicos e de estimativa de sobrevida³⁴. Essa avaliação torna-se primordial uma vez que a oferta de órgãos é limitada, portanto a escolha dos receptores deve ser criteriosa, visando a melhor sobrevida possível. Sabendo que a oferta de órgãos é pequena, a alocação dos pacientes em fila de transplante precisa seguir critérios bem estabelecidos³⁵. Os pacientes internados com necessidade de inotrópicos ou algum tipo de assistência circulatória mecânica são prioridades nas ofertas de órgãos³⁵. Por isso, em um país como o Brasil em que a taxa de utilização dos doadores é baixa e o número de transplantes não apresentou crescimento na última década, a maioria dos pacientes transplantados, independente do centro transplantador e estado, são de pacientes internados, portanto priorizados¹. Uma forma de classificação e avaliação de prognóstico desse grupo de pacientes pode se dar pelo uso da ferramenta da Interagency

Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support (INTERMACS)³⁶. Embora não tenha sido construída para esse fim, é sabido que pacientes em estado crítico (INTERMACS 1, por exemplo) possuem prognóstico desfavorável ao transplante (Quadro 1). Dessa forma, lidando com pacientes priorizados, portanto a partir da classificação 3 de INTERMACS, os pacientes com melhor prognóstico são os priorizados apenas por uso de inotrópicos, sem uso de assistência circulatória mecânica¹. Apesar dessa constatação, habitualmente mais da metade dos pacientes transplantados em grandes centros brasileiros estão em uso de algum tipo de assistência circulatória mecânica de curta permanência, principalmente o balão intra aórtico (BIA)³⁷.

Classificação Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support (INTERMACS)		
Avaliação de fragilidade	Crítérios	
INTERMACS 1	Grave choque cardiogênico	Choque cardiogênico persistente, apesar de progressivo aumento do suporte inotrópico
INTERMACS 2	Piora progressiva, apesar de inotrópicos	Disfunções orgânicas paulatinamente progressivas, a despeito do aumento de inotrópicos
INTERMACS 3	Estável, porém à custa de inotrópicos	Paciente estável hemodinamicamente, porém em uso contínuo de terapia inotrópica
INTERMACS 4	Terapia oral domiciliar, porém sintomas em repouso	Sintomas diários aos esforços da rotina diária ou mesmo no repouso
INTERMACS 5	Intolerante ao exercício	Paciente confortável no repouso ou nos esforços mínimos da rotina diária, porém incapaz para esforços um pouco maiores
INTERMACS 6	Limitação ao exercício	Consegue fazer atividades um pouco mais intensas que as da vida diária, porém tem sintomas nos primeiros minutos de esforço
INTERMACS 7	NYHA III avançado	Sem sintomas no repouso ou nas atividades básicas diárias, vindo a ter dispneia aos pequenos esforços extra-habituais

Quadro 1 - Classificação de INTERMACS adaptada para avaliação de fragilidade

2.3 Complicações pós transplante cardíaco

As complicações relacionadas ao transplante cardíaco podem ser divididas entre precoces e tardias. A principal complicação precoce e que corresponde a aproximadamente 70% dos óbitos no primeiro mês após o transplante é a Disfunção Primária do Enxerto³⁸. Esse tópico será abordado separadamente a seguir. Ainda entre as precoces, as complicações infecciosas estão também entre as principais causas de mortalidade nos primeiros três anos após o transplante. Dentre as principais etiologias, infecções por germes oportunistas devido ao regime de imunossupressão instituído são as mais prevalentes³⁹. Durante o primeiro mês após o transplante, infecções hospitalares, normalmente bacterianas, prevalecem. Há também infecções relacionadas ao sítio cirúrgico, como a mediastinite, que apesar de não muito frequente, possui mortalidade alta³⁹. Após o segundo mês de transplante, infecções oportunistas por citomegalovírus (CMV), toxoplasmose, reativação da doença de Chagas, aspergilose e pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* são as que mais são diagnosticadas. Após o sexto mês, com a imunossupressão já ajustada, o número de infecção cai praticamente ao nível de pacientes imunocompetentes, porém quando aparecem, possuem gravidade maior^{1,40}.

A rejeição também está presente nas complicações precoces, apesar da incidência ter caído bastante nos últimos anos, fato esse observado pelos registros da ISHLT⁴⁰. Atualmente, os casos de rejeição são responsáveis por apenas 10% dos óbitos pós transplante, incluindo os casos tardios. Classicamente existem três tipos de rejeição: hiperaguda, celular e humoral. A hiperaguda, que é extremamente grave, atualmente possui uma incidência baixa

e está relacionada a anticorpos pré-formados do receptor que podem agir no enxerto, como aqueles relacionados ao grupo ABO, HLA ou endotélio. A rejeição aguda celular é a mais frequente e caracterizada pela presença de células inflamatórias no miocárdio, sendo classificadas em quatro subtipos, desde 0R até 3R⁴¹.

A disfunção do ventrículo direito secundária a hipertensão pulmonar é também uma complicação precoce de difícil manejo. Receptores com pressão sistólica de artéria pulmonar acima de 60mmhg e com resistência vascular pulmonar acima de 4 unidades wood estão sob maior risco⁴². O preparo pré-operatório desses pacientes é fundamental, principalmente com a otimização da pré carga visando a normovolemia, além da utilização de vasodilatadores para diminuir a pressão pulmonar. No pós transplante, a utilização de inotrópicos como dobutamina e milrinone, além de evitar a hipóxia e altas pressões na ventilação pulmonar são os pilares do tratamento. Caso não tenha reposta satisfatória, o uso de assistência circulatória mecânica torna-se fundamental⁴³.

Dentre as complicações tardias, destaca-se a doença vascular do enxerto, sendo a principal causa de mortalidade tardia e maior limitante da sobrevida a longo prazo. Essa doença se dá principalmente devido ao estado pró inflamatório crônico do endotélio, causando hiperplasia da camada íntima e obstrução arterial coronária⁴⁴. Evoluiu com manifestações semelhantes a doença coronariana, como arritmias, infarto, insuficiência cardíaca e morte súbita. Não há tratamento específico e o retransplante a principal forma efetiva. Em relação a prevenção, procura-se manter o tratamento imunossupressor otimizado e adequado, ter rigoroso controle dos riscos cardiológicos clássicos, como hipertensão, diabetes, obesidade, tabagismo e sedentarismo⁴⁰. Além da doença vascular do enxerto,

as neoplasias estão entre as complicações tardias frequentes no pós transplante. O risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias está relacionado ao regime de imunossupressão, o que aumenta a incidência de neoplasias associadas a infecções virais, como os linfomas Hodgkin e não Hodgkin, o sarcoma de Kaposi, tumores genitais e hepáticos⁴⁰.

2.4 Disfunção Primária do Enxerto – DPE

Conforme dito no tópico anterior, a DPE é a principal causa de mortalidade nos primeiros 30 dias após o transplante cardíaco. A sua real incidência se tornou mais conhecida após 2014, quando a ISHLT publicou um consenso sobre o tema⁹. Até essa data, os dados publicados pelos centros transplantadores eram muito divergentes, variando desde 1% até 30% dos pacientes transplantados. Essa variabilidade era um reflexo da ausência de critérios bem estabelecidos para o diagnóstico correto dessa condição. Esse consenso de 2014 foi fundamental, pois além de ter implementado o diagnóstico trazendo luz para a real prevalência da doença, trouxe importantes conhecimentos do impacto dessa condição na morbidade e mortalidade dos pacientes transplantados⁹.

2.4.1 Definição e classificação da DPE

A DPE é uma condição caracterizada por diminuição da função miocárdica nas primeiras 24 horas após o transplante, o que clinicamente reflete em hipotensão e baixo débito cardíaco, necessitando de doses crescentes de

inotrópicos e vasopressores além de assistência circulatória mecânica. Deve-se afastar as causas secundárias de disfunção cardíaca, como hipertensão pulmonar, rejeição hiperaguda ou causas cirúrgicas relacionadas as anastomoses ou sangramentos. A DPE, através dos critérios da ISHLT, é dividida em dois grandes grupos: DPE isolada do ventrículo esquerdo (VE) ou biventricular e a DPE isolada do ventrículo direito (VD). A DPE do VE é subdividida em leve o que inclui fração de ejeção do VE menor ou igual a 40% ou dados hemodinâmicos demonstrando altas pressões de enchimento, com pressão venosa central (PVC) maior que 15 mmHg, pressão de oclusão pulmonar (PCWP) acima de 20 mmHg e índice cardíaco (CI) abaixo de 2 L/m/m². A disfunção moderada do VE é caracterizada quando somado ao quadro acima há a necessidade de um alto score inotrópico por pressão arterial média (PAM) menor que 70 mmHg ou a necessidade de implantar um novo balão intra aórtico (BIA). Quando se faz necessário o implante de assistência circulatória, seja oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO), dispositivos de assistência circulatória esquerda de longa permanência (LVAD) ou de assistência biventricular (biVAD), a classificação da DPE é grave. A DPE isolada do VD ocorre quando há PVC maior que 15 mmHg, CI menor que 1 L/min/m², gradiente transpulmonar (TPG) menor que 15mmHg ou pressão sistólica da artéria pulmonar menor que 50 mmHg. Não existe subclassificação para a DPE isolada de VD⁹.

2.4.2 Incidência da DPE

Após a publicação dos critérios diagnósticos e classificação da DPE, vários centros publicaram seus dados de acordo com a ISHLT. Autores como Foroutan e Sabatino demonstram uma incidência média de 15% de DPE, sendo a grande maioria biventricular, com mortalidade dos casos de DPE grave acima de 50%^{45,46}. Em estudo realizado no Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Steffen et al. demonstraram que a incidência de DPE moderada e grave em um período de 2 anos foi de 18,7%⁴⁷. Vários estudos confirmam que o impacto da DPE leve é pequeno, com incidência de mortalidade de 0,5%⁴⁸. Em contrapartida, a DPE grave tem prognóstico ruim e a sua incidência aumentou nos últimos anos por motivos variados, como uma maior utilização de doadores limítrofes, aumento do número de transplantes de pacientes em uso de dispositivos de curta duração e aumento dos casos de doadores de morte circulatória (DCD)⁴⁹. Além disso, uma vez que a necessidade de ECMO está nos critérios diagnósticos para DPE grave e a sua utilização tem sido mais liberal nos últimos anos, isso também pode ter contribuído para o aumento da incidência⁵⁰.

2.4.3 Fisiopatologia da DPE

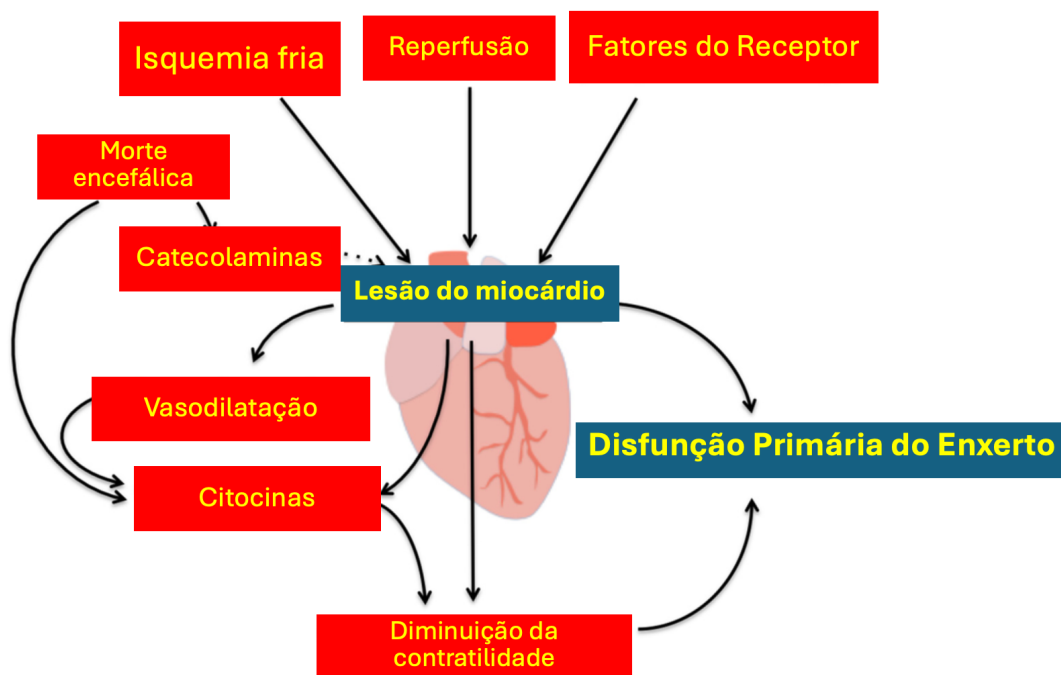
Na fase pré-operatória ao transplante o coração do doador passa por várias agressões resultantes da morte encefálica, isquemia fria, isquemia quente durante o implante e reperfusão. Além disso, fatores sistêmicos relacionados ao receptor também podem impactar no coração transplantado⁵¹.

A morte encefálica esta normalmente associada a hemorragia intracerebral, hipóxia ou hipertensão intracraniana. Esses eventos levam a herniação do tronco cerebral com isquemia e edema⁵². Há liberação imediata de norepinefrina pela medula da adrenal, levando ao estímulo de barorreceptores, com consequente hipertensão, bradicardia e padrão respiratório irregular (tríade de Cushing)⁵². Além disso, o aumento da norepinefrina circulante induz ao acúmulo de cálcio intracelular, com disfunção mitocondrial. A perda do tônus simpático da medula espinhal resulta em profunda vasodilatação, com redução da pré carga, pós carga e perfusão miocárdica^{53,54}. As alterações hormonais subsequentes com queda dos hormônios tireoidianos, cortisol e insulina, também levam a uma diminuição da contratilidade miocárdica^{53,54}.

A isquemia fria a qual o coração é submetido durante a captação é também parte da fisiopatologia da DPE. A proteção fria, com infusão de solução cardioplégica gelada a 4 graus celsius na raiz aórtica ainda continua sendo a principal forma de captação e proteção miocárdica⁵⁵. Após a retirada, o coração é acondicionado em recipiente envolto por gelo para a manutenção da hipotermia. Essa, diminui a taxa metabólica miocárdica, porém ainda resulta em dano isquêmico devido ao metabolismo lento que ainda continua. A acidose celular inevitavelmente ocorre, o que ativa a bomba de sódio e hidrogênio, facilitando a retirada dos íons H⁺ das células. O acúmulo do sódio no intracelular interfere na bomba de cálcio, o que causa dano celular miocárdico⁵⁶.

A isquemia quente, ou o tempo de implante do órgão, se dá quando o implante se inicia, aquecendo gradualmente o enxerto, o que faz com que a sua taxa de metabolismo aumente. Esse aumento leva ao acúmulo de radicais livres, o que causa injúria celular⁵⁶. Estudos demonstram que o tempo de isquemia

quente é um fator independente de mortalidade em 30 dias⁵⁷. Após a liberação do fluxo sanguíneo pela aorta, inicia-se a reperfusão do enxerto. Imediatamente há acúmulo de cálcio e liberação de radicais livres, aumentando a formação de poros de permeabilidade nas mitocôndrias, induzindo mecanismos de morte celular. Estudos voltados ao entendimento desses poros de permeabilidade mitocondriais demonstram que ao impedir o seu aparecimento, a injúria celular de reperfusão diminui⁵⁷. Possivelmente estudos voltados ao tema poderão trazer luz a esse mecanismo de lesão celular miocárdica. Apesar dos esforços em entender os reais caminhos celulares do desenvolvimento da DPE, a literatura atual ainda considera a DPE uma “caixa preta”, a qual o entendimento de sua patogenia é incerto⁵⁸. A Figura 6 resume os principais mecanismos envolvidos na DPE.



FONTE: adaptada de Toldo et al.⁵⁹

Figura 6 - Principais mecanismos envolvidos na DPE

2.4.4 Fatores de risco para DPE

Vários fatores de risco já foram associados ao desenvolvimento da DPE, tendo vários estudos consistentes e concordantes quanto aos principais fatores. Eles podem ser divididos em fatores relacionados ao doador, ao procedimento e ao receptor⁹. A necessidade crescente de transplantes cardíacos nos últimos anos fez com que o amplo aceite de doadores fosse necessário, incluindo critérios de seleção mais expandidos, contemplando doadores mais velhos e com múltiplas comorbidades⁶⁰. Segundo relato recente da ISHLT, doadores mais velhos possuem maior incidência de DPE. Em estudo de registro da United Registry for Organ Sharing (UNOS), foi demonstrado que doadores abaixo de 20 anos podem tolerar longos períodos de isquemia, acima de 6 horas, ao passo que doadores acima de 33 anos evoluem com mais DPE quando a isquemia ultrapassa 3,5 horas⁶⁰. Esse déficit de doadores em todo o mundo faz com que os receptores vivam longos períodos de espera do órgão, muitas vezes internados. Nesse contexto, a utilização de dispositivos de assistência circulatória mecânica tornou-se frequente como ponte para o transplante. Estudos demonstram que o uso de qualquer tipo de dispositivo, seja de curta duração como ECMO ou BIA ou de longa permanência como LVAD, aumentam significativamente a incidência de DPE⁶¹. Truby et al., em estudo recente, demonstrou que 80% dos pacientes com DPE estavam em uso de LVAD no pré-operatório⁶². Além disso, o uso de medicações antiarrítmicas nos receptores, principalmente a amiodarona, também está associada ao desenvolvimento de DPE. Em estudo também recente, foi demonstrado que a dose da amiodarona

estava diretamente proporcional associada ao grau de DPE e a redução pré-operatória impactou positivamente⁶³.

Ferramentas para a predição de risco de DPE têm sido estudadas, mas o único escore de risco validado é o RADIAL. Nesse sistema, 6 variáveis foram utilizadas, sendo 4 relacionadas ao receptor: pressão atrial direita > 10 mmHg, idade > 60 anos, diabetes e dependência de suporte inotrópico e 2 relacionadas ao doador: idade > 30 anos e tempo de isquemia > 240 minutos. Cada fator contabiliza 1 ponto. Na validação do escore, 3 grupos foram definidos: baixo risco (0-1 pontos), médio risco (2 pontos) e alto risco (> 3 pontos) de desenvolver DPE. A incidência em cada grupo foi de 12%, 19% e 28%, respectivamente⁶⁴. No consorcio internacional de DPE publicado em 2023, no qual foram incluídos mais de 2500 pacientes transplantados em 10 centros diferentes, foi validado em uma população mais atual o escore RADIAL. Nesse estudo, a incidência de DPE grave foi de 7,8% e o escore não foi uma boa ferramenta nessa população. Dessa forma, novos escores necessitam de validação para melhor predizer o desenvolvimento da DPE⁶⁵.

2.4.5 *Manejo e tratamento da DPE*

O manejo da DPE é desafiador, uma vez que não existe tratamento específico, mas sim suporte medicamentoso com drogas inotrópicas e vasodiladores pulmonares e suporte circulatório com uso de BIA ou ECMO⁶⁶. A ECMO se tornou o padrão ouro para o suporte mecânico em casos de DPE grave pelo seu fácil implante e manejo bem conhecido nas unidades de terapia intensiva. A técnica de implante e estratégia de canulação são variadas, podendo

ser de implante central ou periférico. Alguns estudos já demonstraram melhores resultados com o implante periférico, uma vez que o tórax pode ser fechado e o paciente extubado⁶⁶. Em 2019, um estudo conduzido por DeRoo et al., demonstrou que o implante precoce da ECMO ainda na sala operatória teve melhor evolução quando comparado com o implante mais tardio, já na unidade de terapia intensiva⁶⁷. O implante precoce contribui para a manutenção da perfusão sistêmica, menor uso de drogas vasoativas e menores complicações relacionadas a ECMO. Isso, por sua vez, contribui para uma recuperação mais rápida do enxerto com DPE⁶⁷. Apesar do uso rotineiro da ECMO como forma de recuperação dos enxertos com DPE ter melhorado os resultados atuais, a evolução dos pacientes com DPE grave ainda é catastrófica, com impactos na mortalidade mesmo após 3 anos de seguimento⁶⁶.

2.5 A expressão gênica e a Justificativa do estudo

Idealmente, lidar com pacientes transplantados que não desenvolvem DPE é o objetivo de qualquer centro transplantador. Para isso, ações visando entender melhor os mecanismos da doença, formular escores de risco para prever ou até mesmo identificar possíveis biomarcadores, tornam-se necessárias no atual contexto do transplante cardíaco mundial. Sendo assim, a aplicação de conhecimentos de genética, especialmente da expressão gênica, pode ajudar no esclarecimento da fisiopatologia da doença e na identificação de possíveis marcadores genéticos.

A medicina de precisão avançou sobremaneira nos últimos anos, principalmente com a identificação de genes que são os responsáveis pelo

desenvolvimento ou não de certas condições clínicas. Esses podem ajudar em diagnósticos mais precisos e guiar prognósticos⁶⁸. Biomarcadores são identificadores que podem caracterizar e monitorar alterações de eventos biológicos⁶⁹. São considerados biomarcadores os genes, transcritos, proteínas e metabólitos, todos com uma característica em comum, a qual é prover conhecimentos sobre o diagnóstico, prognóstico ou terapia daquela doença em questão. De acordo com o “Working Group’s Specifications” de 2001, biomarcadores são objetos mensuráveis que indicam algum processo biológico ou patológico existente e que podem ter reações farmacológicas a intervenções terapêuticas. Eles possuem uma variedade de funções e podem ter grande impacto nos cuidados aos pacientes⁶⁹.

A bioinformática tem desempenhado papel fundamental nesse processo de identificação de genes e outros marcadores, principalmente no estudo dos transcriptomas. Ao realizar o sequenciamento do RNA (RNA-seq), milhares de dados são descobertos, incluindo os diferentes graus de expressão gênica em múltiplas condições clínicas diferentes⁷⁰. Isso levou a necessidade de diferenciar os genes expressos (DEG) através de várias amostras em contextos biológicos diversos. Além disso, o uso da “machine learning” possui extrema importância no que diz respeito a identificação de padrões genéticos do RNA-seq que podem não ser evidentes utilizando métodos tradicionais. O uso desses complexos algoritmos torna possível o entendimento de padrões genéticos chave que podem ser fundamentais no diagnóstico e tratamento de várias doenças⁷⁰.

A diferenciação da expressão gênica (DEG) é uma técnica usada em biologia molecular para comparar os níveis de expressão gênica de amostras entre dois ou mais grupos diferentes. Essa ferramenta pode ajudar na

identificação dos genes envolvidos em determinado processo biológico, provendo informações sobre a regulação desses genes expressos no mecanismo biológico em questão⁷¹.

Estudos de expressão gênica tecidual no contexto do transplante cardíaco são raros na literatura recente. Alguns autores estudaram genes relacionados aos receptores e ao desenvolvimento de rejeição, porém, ao nosso conhecimento, não existem até o momento estudos que analisaram a expressão gênica do coração transplantado que desenvolveu DPE⁷². Dessa forma, entendendo a importância do tema e a necessidade de melhor conhecimento da fisiopatologia e possíveis biomarcadores da doença, justifica-se analisar a expressão gênica nos corações transplantados.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- Avaliar, comparativamente, a partir de análises proteômicas de amostras de tecido miocárdico de corações transplantados, o perfil da expressão gênica tecidual nos enxertos que desenvolveram DPE e comparar com os que não desenvolveram DPE;
- Identificar, nos enxertos que desenvolveram DPE, o grau de expressão dos principais genes envolvidos.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Critérios de Seleção

Durante o período de junho de 2019 até dezembro de 2020 todos os pacientes adultos (acima de 18 anos) submetidos ao transplante cardíaco foram convidados a participar do estudo. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética institucional (CAAE: 86764218.1.0000.0068) e todos os pacientes que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O critério de inclusão foi pacientes com mais de 18 anos de idade submetidos ao transplante cardíaco no Instituto do Coração (InCor-HC.FMUSP) e os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Pacientes que se recusaram a participarem do estudo;
- Pacientes que tiveram disfunção miocárdica secundária à rejeição hiperaguda;
- Paciente em que o Cross-match virtual foi positivo, independentemente do valor.

4.2 Captação do enxerto e proteção miocárdica

A técnica de captação do enxerto seguiu a mesma metodologia em todos os casos. O clampeamento aórtico foi realizado apenas após esvaziar todo o coração com abertura ampla da veia cava inferior e uma das veias pulmonares. A

infusão da cardioplegia na raiz da aorta ocorreu a seguir, sendo realizado 2 litros da solução Custodiol® no tempo de 7 a 10 minutos. A temperatura da solução sempre foi verificada com uso de termômetro digital, confirmando idealmente 4 graus. Realizada a cardiectomia habitual e já com o enxerto acondicionado para o transporte, foi infundido mais 1 litro da mesma solução na raiz aórtica e o enxerto foi transportado ao InCor envolto pela solução Custodiol®.

4.3 Coleta das biópsias

A realização das biópsias endomiocárdicas ocorreu imediatamente antes do início do implante do coração, já no centro transplantador. Dois fragmentos do ventrículo esquerdo por paciente foram facilmente coletados, tendo em vista a ampla exposição das cavidades do coração (Figura 7). Os fragmentos foram acondicionados em solução de RNA-later e encaminhados ao laboratório de genética do InCor para congelação à -80 graus.

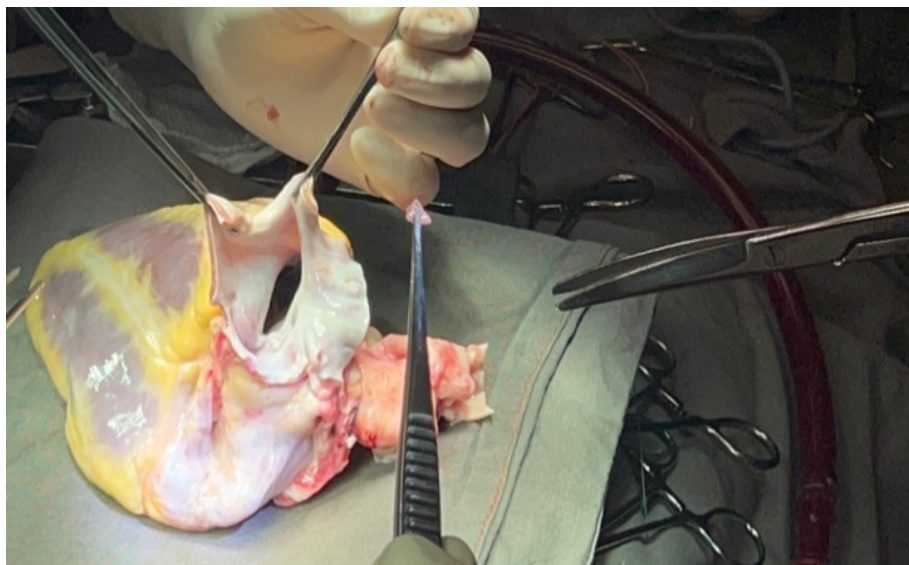


Figura 7 - Coleta de biópsia do ventrículo esquerdo, imediatamente antes do implante do coração (acervo pessoal)

4.4 Definição da Disfunção Primária de Enxerto

A classificação da disfunção primária de enxerto foi realizada utilizando os critérios estabelecidos pela ISHLT em consenso realizado em 2013 e publicado pela revista da própria sociedade em 2014⁹. Os critérios estão expostos no Quadro 2. Foram considerados para a classificação os dados relativos às primeiras 24 horas após o transplante. Conforme a metodologia proposta, seriam excluídos da classificação de disfunção primária os pacientes que tiveram deterioração dos parâmetros hemodinâmicos devido à rejeição hiperaguda e/ou tamponamento cardíaco, porém não tivemos casos assim nessa amostra específica. Todos os pacientes analisados possuíam painel de reatividade de antígenos zero e Cross-Match negativos. Para fins de comparação da expressão gênica, consideramos a presença ou não da Disfunção Primária de Enxerto, não considerando as diferentes subclassificações.

<u>DPE - VE</u>	Leve: Um dos seguintes critérios	1- Ecodopplercardiograma: FEVE $\leq$ 40% OU 2- Hemodinâmica: PVC > 15 mmHg; PCP > 20 mmHg; IC < 2 l/min/m² (por mais de uma hora) requerendo doses baixas de inotrópicos
	Moderada: Um dos critérios de I E outro critério de II	I. Um dos critérios a seguir: 1- Ecodopplercardiograma: FEVE < 40% OU 2- Hemodinâmica: PVC > 15 mmHg; PCP > 20 mmHg; IC < 2 l/min/m ² ; hipotensão com PAM < 70 mmHg (por mais de uma hora); II- Um dos critérios a seguir: 1- Alta dose de inotrópico - escore inotrópico > 10 ou 2- BIA recentemente implantado (independentemente do uso de inotrópicos)
	Grave	Dependência de suporte circulatório mecânico (ECMO, DAV esquerdo ou biventricular), excluindo BIA
<u>DPE - VD</u>	Requer I + II ou III isolado	I- Hemodinâmica: PVC > 15 mmHg; PCP > 20 mmHg; IC < 2 l/min/m ² ; II- GTP < 15 mmHg e/ou PSAP < 50 mmHg OR III- Necessidade de dispositivo de assistência ventricular direita.

DPE-VE: Disfunção Primária de Enxerto Esquerda; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; PVC: Pressão Venosa Central; PCP: Pressão Capilar Pulmonar; IC: Índice Cardíaco; PAM: Pressão Arterial Média; ECMO: extracorporeal membrane oxygenation; DPE-VD: Disfunção Primária de Enxerto Direita; GTP: Gradiente Transpulmonar; PSAP: Pressão sistólica da artéria pulmonar.

Quadro 2 - Classificação da Disfunção Primária de Enxerto (DPE)

4.5 Descrição da amostra estudada

Foram incluídas ao final do protocolo 40 biópsias coletadas de 20 transplantes realizados, totalizando a amostra do estudo. Para a caracterização da amostra, foram identificados os dados clínicos e laboratoriais de todos os receptores assim como os dados clínicos e laboratoriais relacionados aos doadores e ao procedimento cirúrgico, conforme descrito a seguir.

4.5.1 Descrição dos dados dos receptores

Foram identificadas nos receptores as seguintes características pré-operatórias: idade, etnia, gênero, peso, altura, tipo sanguíneo, presença de diabetes mellitus, creatinina, dados hemodinâmicos (pressão sistólica da artéria pulmonar -PSAP e resistência vascular pulmonar - RVP) e o tipo de priorização na lista de transplante, podendo ser uso de inotrópico, balão intra-aórtico ou dispositivo de assistência ventricular mecânica. Todos os receptores incluídos nessa amostra estavam priorizados, portanto já internados previamente ao transplante.

Os dados demográficos dos receptores estão demonstrados na Tabela 1. A mediana da idade dos pacientes foi de 49 anos, 55% eram do sexo masculino e de etnia branca em 85%. Em relação ao tipo de priorização, 55% dos pacientes estavam priorizados por uso de Balão intra-aórtico, 40% em uso de inotrópico e 5% priorizados por câmara técnica. Sobre a etiologia da insuficiência cardíaca, na nossa amostra do estudo a maior parte dos pacientes eram portadores de

doença de Chagas, seguido de miocardiopatia dilatada idiopática. As diferentes etiologias estão demonstradas no Gráfico 1.

Tabela 1 - Dados demográficos dos receptores transplantados

Receptor	n	%
	mediana	IQR
Idade mediana (IQR)	49	37 - 55
IMC mediana (IQR)	25,4	19,9 - 28,9
Sexo		
Masculino	11	55
Feminino	9	45
Etnia		
Branca	17	85
Parda	2	10
Negra	1	5
Tipo de priorização		
DVA	8	40
BIA	11	55
Câmara técnica	1	5
Etiologia da Insuficiência Cardíaca		
Chagas	9	45
Miocardiopatia dilatada idiopática	6	30
Cardiomiopatia hipertrófica	1	5
Mixoma recidivado	1	5
Doença Valvar	1	5
Displasia arritmogênica de VD	1	5

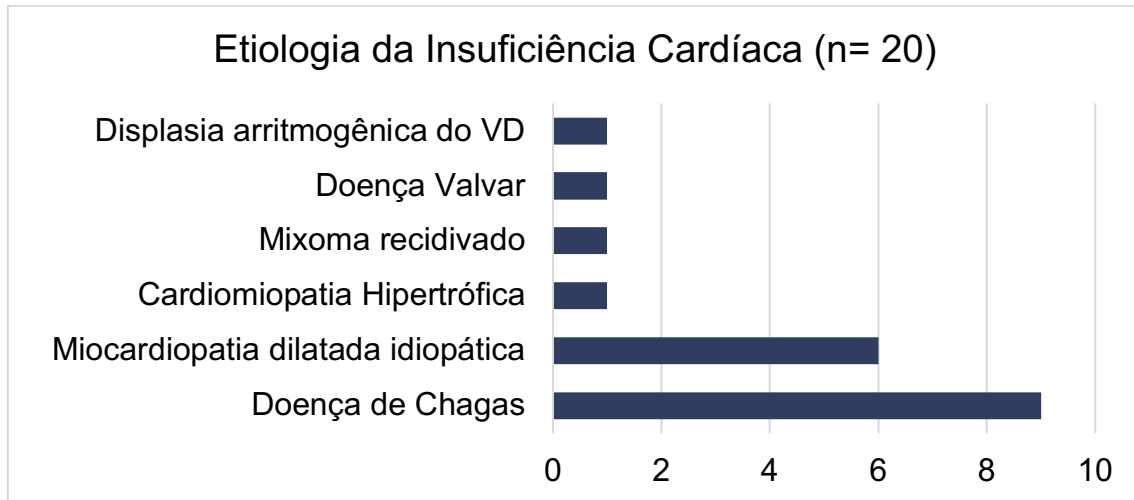


Gráfico 1 - Etiologias da Insuficiência Cardíaca na amostra estudada

4.5.2 Descrição dos dados dos doadores

Em relação aos dados dos doadores, foram identificadas as seguintes características: idade, gênero, peso, altura, etnia, tipo sanguíneo, causa da morte encefálica, uso de drogas vasoativas, tabagismo, etilismo, uso de drogas ilícitas, presença de parada cardiorrespiratória (PCR) prévia, função renal, dosagem de sódio sérico e dados ecocardiográficos.

Os dados estão dispostos na Tabela 2. A maioria (75%) era do sexo masculino e com mediana de idade de 21,5 anos. O índice de massa corpórea teve mediana de 26,1 e 65% eram do grupo sanguíneo O. O traumatismo crânio encefálico foi a causa da morte encefálica em 70% dos doadores e 30% faziam uso de algum tipo de droga ilícita. Os diferentes tipos de morte encefálica estão dispostos no Gráfico 2. 90% dos doadores estavam em uso de antibiótico. Sobre os exames laboratoriais, a mediana da creatinina foi 1, variando entre 0,83 e 1,47. A mediana da fração de ejeção dos doadores foi de 66%.

Tabela 2 - Dados relacionados aos doadores

Doador - características	n mediana	% IQR
Idade mediana (IQR)	21,5	19 - 35,5
IMC mediana (IQR)	26,1	23,7 - 27,7
Sexo		
Masculino	15	75
Feminino	5	25
ABO		
A	5	25
B	2	10
O	13	65
Etnia		
Branca	13	65
Parda	6	30
Negra	1	5
Tipo de ME		
TCE	14	70
HSA	3	15
Encefalopatia anóxica	2	10
AVCH	1	5
Hipertensão arterial sistêmica	1	5
Diabetes mellitus	0	0
Etilismo	2	10
Tabagismo	5	25
Uso de drogas	6	30
Parada Cardiorespiratória	6	30
Tempo de parada (min) mediana (IQR)	8	1 - 15
Dose noradrenalina (ug/kg/min) mediana (IQR)	0,145	0.045 - 0.255
Uso de vasopressina	11	55
Uso de antibiótico	18	90
Exames laboratoriais	Mediana	IQR (25 -75)
Ureia	39,5	28 - 58
Creatinina	1,01	0,83 - 1,47
Sódio	149	138,5 - 160
Ecocardiograma		
Fração de Ejeção VE (%)	66	59 - 68

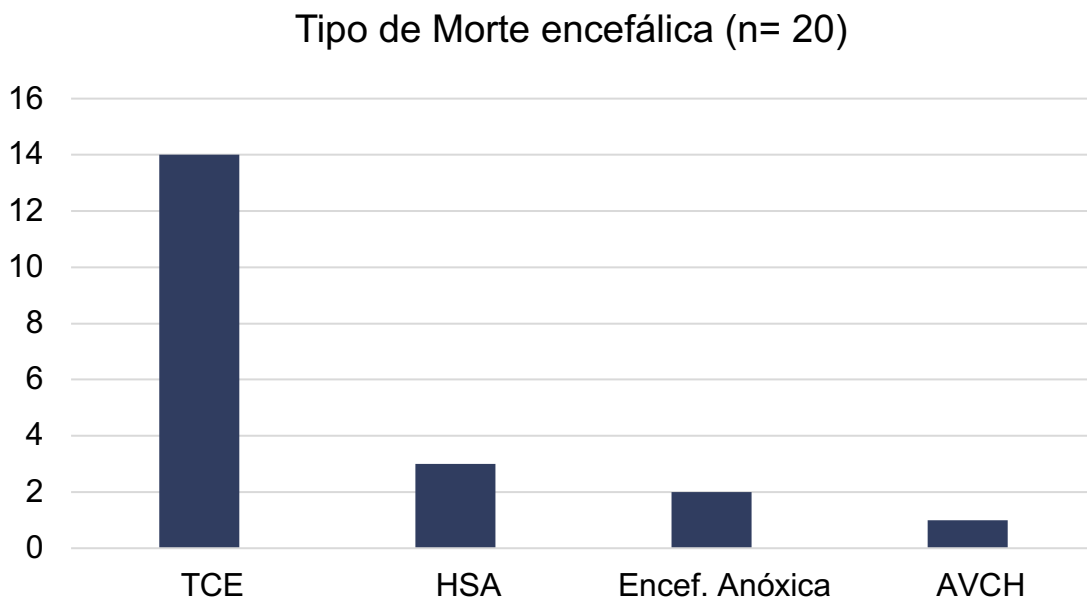


Gráfico 2 - Tipos de Morte Encefálica dos doadores da amostra

4.5.3 Dados do procedimento cirúrgico

Foram coletados os seguintes dados relativos ao procedimento cirúrgico: tempo de circulação extracorpórea, tempo total de isquemia do enxerto, necessidade de assistência circulatória mecânica e dados hemodinâmicos através do cateter de artéria pulmonar.

4.6 Análise da expressão gênica

Conforme descrito previamente, foram coletados 2 fragmentos de ventrículo esquerdo para análise da expressão gênica (transcriptomas). O método para a análise gênica segue especificada a seguir.

4.6.1 Extração do RNA

Após homogeneização do tecido e através da utilização de colunas de preparo Qiagen, RNA total foi extraído. As amostras de tecido muscular cardíaco foram homogeneizadas em de Trizol (Invitrogen) (1mL/100mg de tecido), utilizando protocolo por isopropanol e clorofórmio, de acordo com instruções do fabricante. Após extraído, o RNA foi checado para sua relativa qualidade e quantidade em equipamento Agilent Bionalyzer e Qubit. Bibliotecas de RNA total foram preparadas utilizando o kit TruSeq Total RNA (Illumina). As bibliotecas foram então quantificadas através de equipamento Qubit, Bioanalyzer e Fragment Analyzer e multiplexadas para corrida em equipamento Illumina HiSeq2500, com aproximadamente 40M de reads por biblioteca (biópsia). Os resultantes arquivos fastq foram alinhados utilizando algoritmos standard (bwa/gtak) utilizando como genoma de referência hg19. Para análise de bioinformática trabalhamos inicialmente com feature counts e o pacote DESEQ2 (Differential Expression Analysis for Sequence Cont Data), que é uma análise paramétrica.

4.6.2 A diferenciação da expressão gênica utilizando o pacote DESEQ2

O DESEQ2 usa um modelo binominal negativo que inclui estimativas na dispersão da contagem dos genes. Os parâmetros da distribuição binominal negativa assumem que cada gene lido em um sequenciamento de RNA segue um padrão específico, definidas por dois principais fatores: a média no número de vezes que o gene foi lido e o fator de dispersão do gene, o que tem relação

com a variabilidade dos dados analisados. Cada gene existente tem um padrão característico e esse grau de dispersão do gene é essencial para identificar os diferentes graus de expressão.

A demonstração do grau de expressão de cada gene foi identificada através dos valores de P, ajustados pela magnitude da diferença, expressos pelo $\log_2$ fold change (l2FC), o que ranqueou os genes de acordo com suas expressões, comparando os dois grupos (com e sem DPE).

A representação gráfica se deu através de dois métodos, sendo o primeiro a comparação do “fold change” com o número normal de contagem (MA plots) e o outro a comparação do valor de P com o “fold change”(Volcano plots).

4.7 Análise estatística

Todos os dados foram tabulados e analisados estatisticamente. Os dados contínuos de cada variável foram comparados com a curva normal através do teste de distância Kolmogorov-Smirnov e classificados em paramétricos e não paramétricos. Os dados paramétricos foram representados através de média e desvio padrão da amostra e os grupos independentes comparados entre si através do teste t de *Student* para medidas não repetidas. Os dados assimétricos foram representados através de mediana e intervalo interquartil, quartil inferior (percentil 25) e quartil superior (percentil 75) e os grupos independentes comparados entre si através do teste de Mann-Whitney.. Foi considerado para o estudo nível de significância de 5 % nos testes de hipótese. A análise gênica foi realizada através de software citado anteriormente, que possui capacidade específica para avaliação de sequenciamento de RNA. Os gráficos

confeccionados com os dados dos genes foram o MA e Volcano plot. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SPSS (*Software Statistical Package for the Social Science*) for Windows versão 13.0 e GraphPad Prism versão 8.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação e evolução após o transplante

Os 20 casos foram divididos quanto a presença ou não de DPE, após a aplicação dos critérios da ISHLT, conforme identificado no fluxograma abaixo (Figura 8).

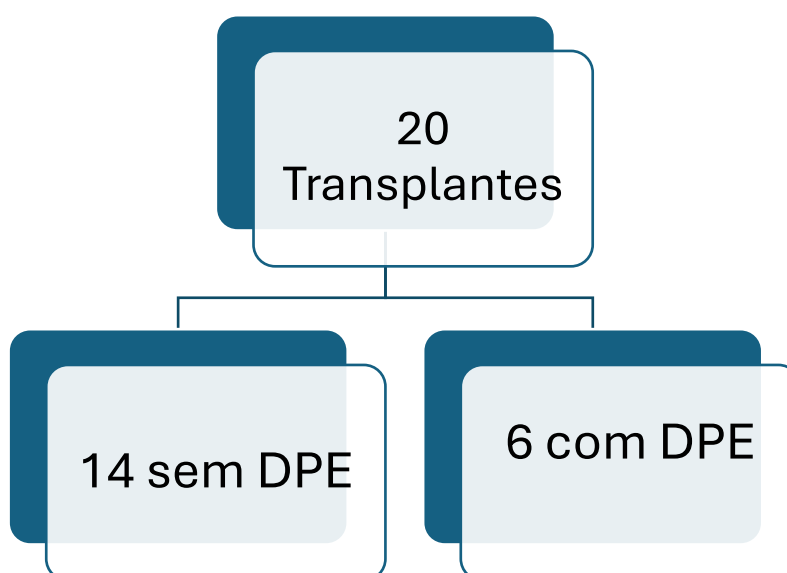


Figura 8 - Distribuição das amostras analisadas no estudo

5.2 Dados relacionados ao perioperatório

A Tabela 3 demonstra as características gerais dos pacientes após serem classificados quanto a presença ou não de DPE. Dentre todos os dados gerais, destaca-se que todos os pacientes que desenvolveram DPE possuíam tempo

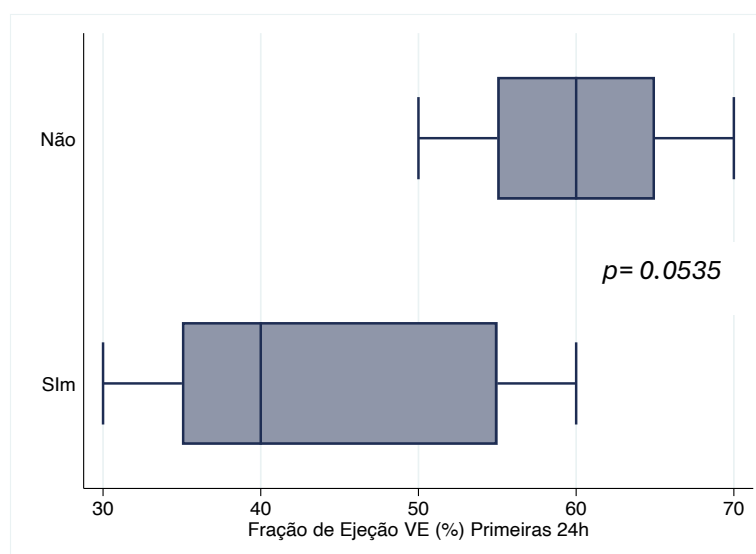
de isquemia menor que 4 horas. Os dados relacionados ao procedimento cirúrgico estão dispostos na Tabela 4. Identificamos que a mediana do tempo de CEC foi de 83 minutos e da fração de ejeção nas primeiras 24 horas de 55%. Essa última, quando separada entre os grupos com e sem DPE, demonstra-se menor fração de ejeção nos pacientes com DPE, conforme o Gráfico 3. Dois pacientes precisaram de um novo BIA e quatro de assistência circulatória com ECMO, sendo os primeiros casos de disfunção moderada do enxerto e os últimos casos de disfunção grave, totalizando os 6 casos de DPE da amostra.

Tabela 3 - Características gerais dos pacientes com e sem Disfunção Primária do Enxerto

Receptor	Disfunção Primária do Enxerto	
	Sim (n= 6)	Não (n= 14)
	n (%)	n (%)
Idade mediana (IQR)	43,5 (29 - 55)	49 (39 - 55)
Sexo		
Masculino	4 (66,7)	7 (50,0)
Feminino	2 (33,3)	7 (50,0)
Etnia		
Branca	5 (83,3)	13 (92,9)
Parda	1 (16,7)	0 (0,00)
Negra	0 (0,00)	1 (7,1)
IMC mediana (IQR)	26,9 (9,8)	25,4 (5,5)
Tipo de priorização		
DVA	2 (33,3)	6 (42,9)
BIA	4 (66,7)	7 (50,0)
Câmara técnica	0 (0,00)	1 (7,1)
Tempo de Isquemia		
< 4h	6 (100)	9 (64,3)
≥ 4h	0 (0,00)	5 (35,7)

Tabela 4 - Dados relacionados ao perioperatório do transplante cardíaco

	Mediana	IQR (25-75)
Tempo de CEC	83	60,5 - 120
Primeiras 24h pós-operatório		
PSAP (mmHg)	30	24 - 43
PVC (mmHg)	13,5	10 - 17.5
PAM (mmHg)	70	56.5 - 77.5
PCP (mmHg)	13,5	12 - 20
Escore Inotrópico	27,5	6 - 50
Fração de Ejeção VE (%)	55	52 - 70
	n	%
Necessidade de assistência circulatória mecânica		
Novo BIA	2	10
ECMO	4	20
Disfunção Primária do Enxerto		
Moderada	2	10
Importante	4	20

**Gráfico 3** - Comparação da fração de ejeção nas primeiras 24 horas após o transplante cardíaco

Ao compararmos os dados hemodinâmicos das primeiras 24 horas, identificamos que os pacientes com DPE tiveram maiores pressões pulmonares e maiores PVC quando comparados com os pacientes sem DPE, porém sem

significância estatística. Esses valores hemodinâmicos estão representados nos Gráficos 4 e 5. O escore inotrópico teve mediana de 27,5 e, ao compararmos os grupos, os pacientes com DPE possuíram valor significativamente mais alto, como demonstrado no Gráfico 6.

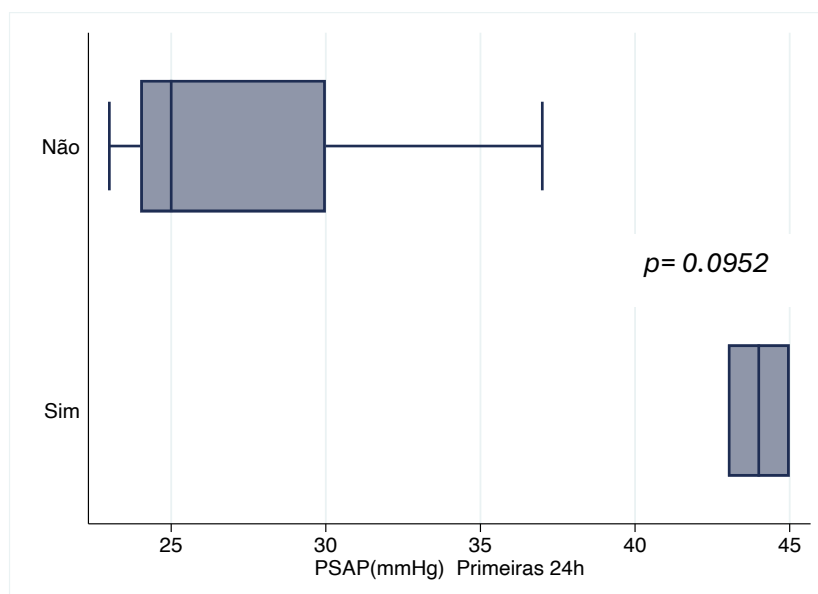


Gráfico 4 - Comparação das pressões pulmonares dos pacientes com e sem DPE

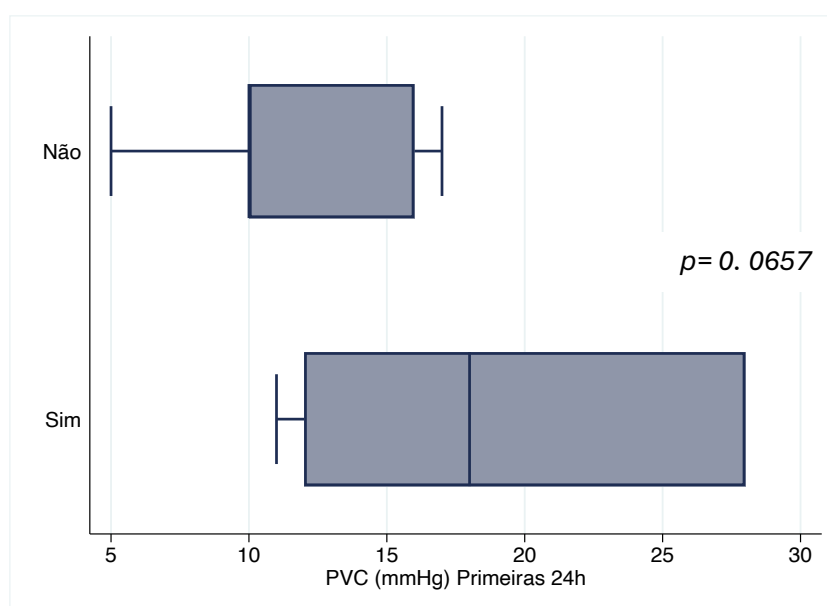


Gráfico 5 - Comparação da PVC dos pacientes com e sem DPE

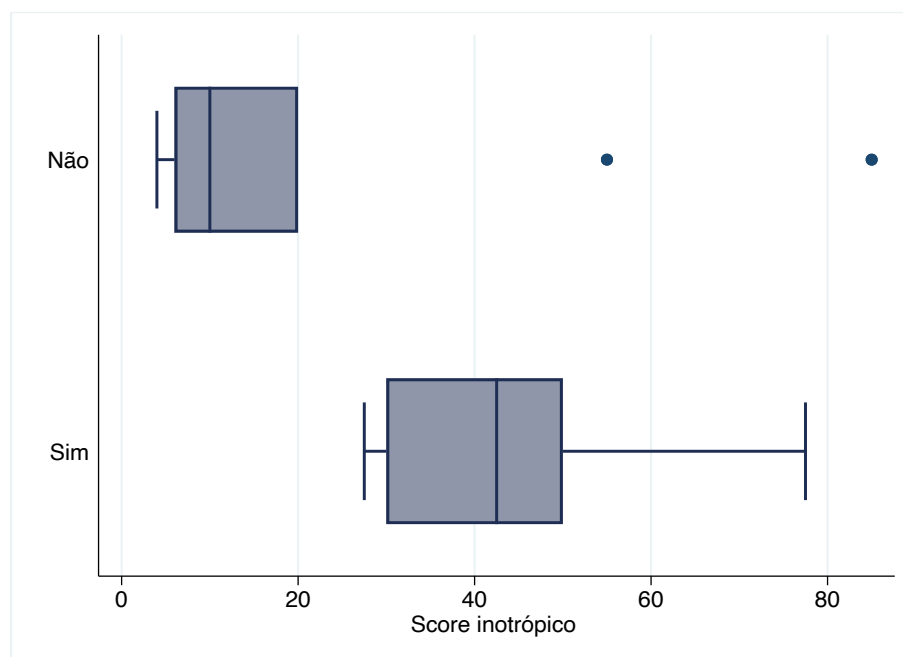


Gráfico 6 - Comparação do escore inotrópico dos pacientes com e sem DPE

5.3 Análise da expressão gênica

Foram identificadas no tecido cardíaco 28.311 transcritos, sendo que após medidas de controle de qualidade e normalização da expressão, foram identificados 11 transcritos (CADPS2, KCNA7, SPOCK1, FAM177A1, MYL4, SLC5A9, B3GALT5, PCDHAC2, GGTA1P, AC109779.1 e STC2) associados à ocorrência de disfunção primária de enxerto. Os genes MYL4, SLC5A9, SPOCK1, GGTA1P, AC109779.1 e STC2 estavam menos expressos e os genes B3GALT5, PCDHAC2, KCNA7, CADPS2 e FAM177A1 mais expressos.

No Gráfico 7 identificamos a distribuição dos 11 genes com diferente expressão e o peso estatístico. A variável Log2fold Change demonstra a relação do grau de expressão gênica entre os pacientes com e sem DPE. Dessa forma, valores negativos possuem menor expressão e valores positivos, maior

expressão. Destaca-se o alto valor estatístico do gene MYL4, mostrando a sua baixa expressão nos pacientes com DPE e o alto valor estatístico da expressão do gene B3GALT5, com maior expressão no grupo DPE.

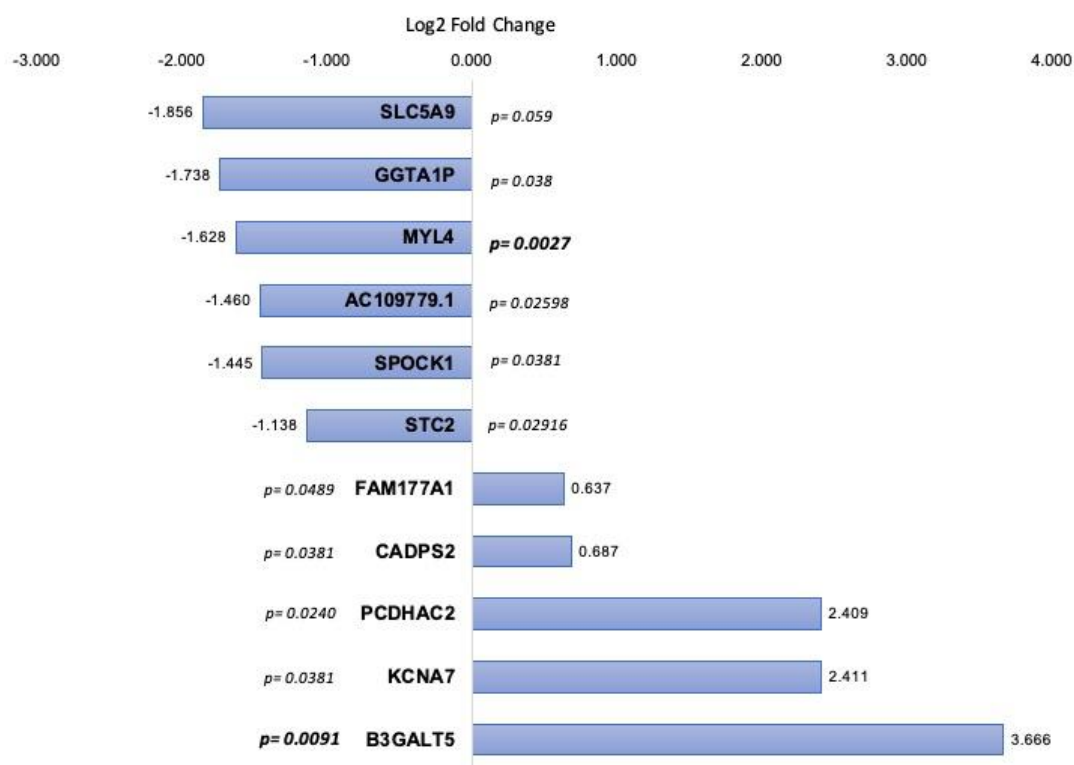


Gráfico 7 - Distribuição dos genes diferentemente expressos nos corações com DPE, em uma análise comparativa, separados quanto a sua expressão e valor de P

O Gráfico 8, conhecido como MA plots, demonstra a média de expressão de todos os 28.311 transcritos encontrados nas amostras, comparados com o Log2Fold Change. Dessa forma, no eixo X temos a média normal de expressão e no eixo Y a magnitude da diferença, representada pelo “log2 fold change”. Os 11 genes diferentemente expressos estão representados por pontos vermelhos.

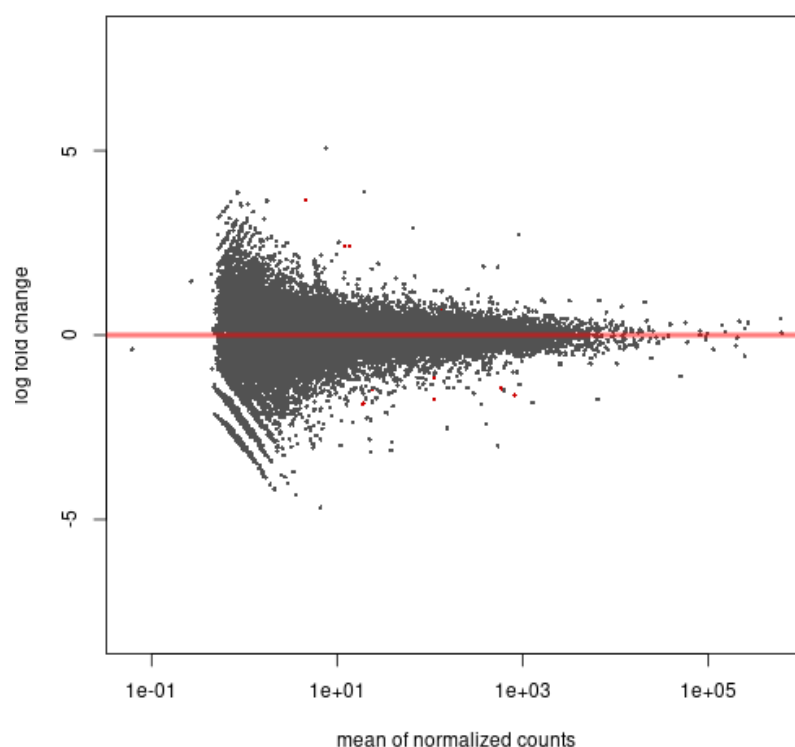


Gráfico 8 - MA plot: Distribuição de todos os transcritos identificados, com destaque para aqueles associados a DPE

No Gráfico 9 (“volcano plot”), a identificação da maior ou menor expressão dos genes e o impacto estatístico fica demonstrada, uma vez que o gráfico contempla os valores de P com os valores do “log2 fold change”. Os genes pouco expressos ficam à esquerda da curva e os genes mais expressos a direita da curva. Superiormente estão demonstrados os genes que foram expressos estatisticamente diferentes no grupo da DPE. Destacam-se assim dois genes específicos: o MYL 4 foi o que estava estatisticamente menor expresso e o gene B3GALT 5 estatisticamente muito expresso.

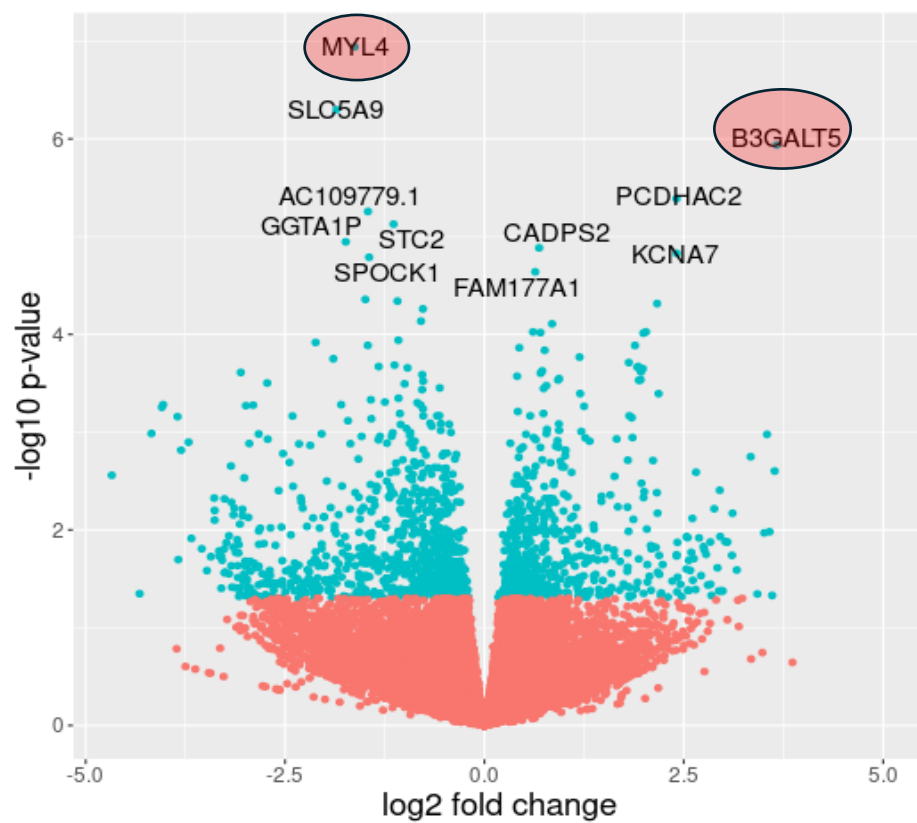


Gráfico 9 - “Volcano plot” demonstrando os genes com maior ou menor expressão, com significância estatística

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

No presente estudo identificamos onze genes associados ao desenvolvimento da DPE após o Transplante Cardíaco utilizando análise proteômica de tecido cardíaco obtido imediatamente antes do implante do órgão. O gene significativamente com menor expressão foi o MYL4 (Myosin Light Chain 4) e o gene com significativa maior expressão o B3GALT5 (Beta-1,3-Galactosyltransferase 5). Uma vez que todas as biopsias miocárdicas analisadas dos pacientes com Disfunção Primária do Enxerto foram de pacientes sem indícios de rejeição imunológica aguda, traduzidas pelo Cross Match negativo, entendemos que essas alterações estão relacionadas à DPE.

O gene MYL4 faz parte de uma grande família de síntese de proteínas que possuem funções semelhantes, como hidrólise do ATP através da enzima ATPase, ligação da actina e tradução do potencial de energia celular cinética. Originalmente isolada de células musculares, as miosinas estão presentes em praticamente todas as células eucariotas⁷³. O gene em questão codifica a cadeia de miosina encontrada no músculo atrial cardíaco. Doenças já estudadas e associadas a disfunção do MYL4 incluem a Fibrilação Atrial e Insuficiência Cardíaca, de forma geral⁷³. Em um estudo atual, McDonald e colaboradores observaram várias alterações histológicas em corações explantados que apresentaram DPE e que o retransplante foi necessário. Um dos principais achados foi a presença de lesões multifocais de isquemia biventriculares, variando desde estágios inflamatórios com uma grande presença de neutrófilos, até focos de necrose bem estabelecidos. Eles também relataram a presença de

inflamação linfocítica difusa, com presença variada de linfócitos, células T CD3+, células B CD20+, todos não compatíveis com quadros de rejeição, justificando o diagnóstico de DPE⁷⁴. Tal processo inflamatório impactou na função miocárdica e isso foi concordante com vários outros estudos na literatura que demonstraram aumento da inflamação do tecido miocárdico em pacientes com DPE⁷⁵. Tais achados histológicos são, provavelmente, reflexos de um processo genético tecidual, que levou a uma expressão gênica diferente nesses pacientes. Se a função da miosina e sua baixa expressão gênica representada pelo MYL4 é um fato consequente ou causador da inflamação, ainda é incerto, mas certamente intensificar estudos sobre essa alteração gênica específica poderá clarear melhor o mecanismo celular existente no miocárdio que desenvolveu DPE. Dessa forma, a fisiopatologia da doença será mais bem conhecida.

O B3GALT5 pertence a um grupo de genes que codifica glicoproteínas responsáveis pela síntese de antígenos Lewis tipo 1 nos seres humanos. Particularmente, o B3GALT 5 participa da biossíntese dos antígenos Lewis a, Lewis b e sialyl-Lewis A. Esse último é o antígeno tetrassacarídeo (NeuAc α 2-3Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc) que constitui o epítipo do CA19.9, um marcador tumoral presente e elevado em pacientes com cânceres pancreático e gastrointestinal⁷⁶. Essa expressão aumentada do gene nas biópsias dos corações que apresentaram DPE, levanta a hipótese de que esses antígenos também estariam presentes no sangue dos doadores em que o órgão estará sob risco de desenvolvimento de DPE. Essa constatação deve ser amplamente estudada visando clarear qual a função da expressão gênica aumentada do B3GALT5 no coração, quais as vias celulares reguladoras dessa expressão e qual o papel dessa expressão no miocárdio. Além disso, testar se o marcador

tumoral CA 19.9 está aumentado nos doadores de alto risco para DPE. Dessa forma, além de clarear processos da fisiopatologia da DPE, o estudo detalhado desse gene poderá identificar possíveis biomarcadores, o que seria de grande valia para os pacientes que serão submetidos ao transplante cardíaco.

Obviamente, os dados genéticos coletados foram limitados ao coração dos doadores e não considerou as possíveis interações entre dados genéticos do receptor na análise proteômica. Porém, a hipótese do estudo é que o risco de desenvolvimento de PGD pode ser detectado através da análise dessas proteínas codificadas, como potenciais biomarcadores, direto nos doadores. Poucos estudos na atualidade investigaram potenciais biomarcadores de PGD em pacientes submetidos a transplante cardíaco. Um estudo reportou a diferença de expressão de 176 proteínas, sugerindo vias de respostas imunes agudas, principalmente aumento das vias de expressão da interleucina 6 nos pacientes com DPE. Em concordância com o nosso estudo, esse também tinha uma amostra pequena, mas a análise foi focada nos receptores e não no enxerto implantado⁷⁷. Um outro estudo recente publicado por Truby e colaboradores mostrou que um gene específico também estava muito expresso e relacionado aos pacientes com DPE. Diferentemente do nosso estudo, eles também analisaram amostras sanguíneas apenas dos receptores no momento do implante do coração e compararam os resultados através da aplicação do escore RADIAL⁷⁸. Essa análise realizada por Truby demonstra, em concordância com nosso estudo, que alterações genicas estão presentes nos pacientes que desenvolvem DPE. Ao passo que eles analisaram amostras dos receptores, o presente estudo focou em análises relacionadas aos doadores, o que traz a possibilidade de avaliar o risco da DPE lidando diretamente com o contexto do

pré transplante. Entendemos que tal fato é um passo importante para a melhoria dos resultados do transplante, com a possibilidade de prever ou se preparar para o cuidado de pacientes com DPE, a principal causa de mortalidade precoce do transplante cardíaco.

Estudos para predizer, ou até mesmo entender melhor a fisiopatologia da DPE, são extremamente importantes, tendo em vista o impacto dessa condição nos pacientes transplantados. Acreditamos que pesquisas futuras com foco nos doadores, seja com análises sanguíneas ou mesmo biópsias conforme o nosso estudo, através da análise de biomarcadores genéticos, poderá ajudar na tomada de decisão sobre o uso ou não daquele enxerto específico.

A utilidade clínica da análise de risco da DPE é mais efetiva quando realizada fora do ambiente do receptor, antes mesmo de deflagrar o procedimento cirúrgico, trazendo uma possibilidade de identificar no pré transplante o risco de desenvolver DPE. Uma vez que existe uma alta demanda de ofertas de corações, a utilização de doadores marginais, de alto risco, é uma realidade em grandes centros transplantadores. Conduzir estudos que possam oferecer análises de risco efetivas para o desenvolvimento de PGD torna-se crucial para atingir resultados satisfatórios no pós transplante. Se o risco de DPE puder ser previsto com apenas uma análise sanguínea dos doadores, os resultados dos transplantes com certeza melhorariam. Isso não apenas pela possibilidade do descarte do órgão, mas permitiria a implementação de táticas para recuperação e condicionamento do enxerto previamente ao início do procedimento cirúrgico.

A análise gênica é onerosa e fontes de financiamento são necessárias para aumentar o número de casos estudados, o que não foi possível no atual

estudo, uma vez que ele foi realizado no momento da pandemia do COVID 19, quando as agências financiadoras priorizaram pesquisas relacionadas ao coronavírus. Apesar disso, os nossos achados demonstraram importantes novos conhecimentos genéticos sobre a doença o que poderá nortear futuras pesquisas, principalmente nos quesitos fisiopatologia e biomarcadores.

6.1 Limitações

Esse estudo apresenta algumas limitações que são importantes de serem relatadas. A mais significativa é o tamanho pequeno da amostra utilizada, apesar da capacidade do nosso centro transplantador do Instituto do Coração ser alta, fazendo em média 50 transplantes por ano. O principal fator que contribuiu para o número limitado da amostra foi a falta de um financiamento apropriado para o trabalho, inviabilizando a realização das análises genéticas. Sabendo-se do alto custo das análises proteômicas e gênicas, estudos futuros considerando tal proposta deverão ter, previamente ao início, a garantia do financiamento específico. Sem dúvidas uma parceria com instituições estrangeiras, com acesso maior e consistente a essas análises gênicas será o caminho mais adequado para conseguir concretizar estudos com grande número de amostras.

Além da questão financeira, uma outra limitação do estudo está no fato do nosso trabalho ter avaliado a expressão gênica apenas do tecido miocárdico do doador, não considerando possíveis interações genéticas entre o doador e receptor, o que poderia trazer mais detalhes sobre o desenvolvimento da DPE. Isso pois a fisiopatologia conhecida inclui processos que ocorrem tanto nos doadores, quanto nos receptores, ou até interações entre ambos. Além disso, o

fato de o trabalho ser unicêntrico, faz com que a validação dos nossos achados seja restrita à nossa população, trazendo a necessidade de estudos futuros incluindo diferentes centros.

6.2 Perspectivas futuras

Visando a aplicação dos nossos resultados, entendemos que a integração da análise de risco para o desenvolvimento da DPE na avaliação de rotina pré transplante é um avanço significativo. Estudos futuros devem focar na validação de marcadores genéticos relacionados aos genes MYL4 e B3GALT5 identificados no presente trabalho. Adicionalmente explorar a possibilidade de usar esses marcadores através de testes rápidos, pouco invasivos, com amostras de sangue, facilitando o uso na prática clínica. Prevendo de forma específica o risco do desenvolvimento da DPE, os centros transplantadores poderão não só evitar doadores de alto risco, mas também ajustar o manejo no pós-operatório caso esse doador seja utilizado, preparando o centro transplantador visando a recuperação do enxerto de forma ativa, diminuindo o impacto da DPE. Finalmente, esses avanços poderão melhorar os resultados e a sobrevida dos receptores submetidos a transplante cardíaco.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Nesse estudo, utilizando análises proteômicas de amostras de tecido miocárdico de corações transplantados, observou-se que a expressão gênica tecidual foi diferente nos enxertos que evoluíram com DPE quando comparada com os que não apresentaram DPE.

Nos enxertos que desenvolveram DPE, os principais genes envolvidos foram o MYL4, que apresentou pouca expressão tecidual e o B3GALT5, que teve sua expressão aumentada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Bacal F, Marcondes-Braga FG, Rohde LEP, Xavier Júnior JL, Brito FS, Moura LAZ, Colafranceschi AS, Lavagnoli CFR, Gelape CL, Almeida DR, Gaiotto FA, Atik FA, Figueira FAMS, Souza GEC, Rodrigues H, Campos IW, Souza Neto JD, Rossi Neto JM, Gasparetto J, Goldraich LA, Benvenuti LA, Seguro LFBC, Uihôa Júnior MB, Moreira MDCV, Ávila MS, Carneiro R, Mangini S, Ferreira SMA, Strabelli TM. 3ª Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. *Arq Bras Cardiol*. 2018 Aug;111(2):230-89. Erratum in: *Arq Bras Cardiol*. 2019 Jan;112(1):116.
2. Hunt SA. Taking heart—cardiac transplantation past, present, and future. *N Engl J Med*. 2006; 355(3):231-5.
3. Kfoury AG, Snow GL, Budge D, Alharethi RA, Stehlik J, Everitt MD, Miller DV, Drakos SG, Reid BB, Revelo MP, Gilbert EM, Selzman CH, Bader FM, Connelly JJ, Hammond MEH. A longitudinal study of the course of asymptomatic antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31:46–51.
4. Taylor DO, Edwards LB, Aurora P, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Kucheryavaya AY, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult heart transplant report—2008. *J Heart Lung Transplant*. 2008; 27(9):943.
5. Khush KK, Valentine HA. New developments in immunosuppressive therapy for heart transplantation. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2009;14(1):1-21.
6. Sulemanjee NZ, Merla R, Lick SD, Aunon SM, Taylor M, Manson M, Czer LSC, Schwarz ER. The first year post-heart transplantation: use of immunosuppressive drugs and early complications. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2008; 13(1):13-31.
7. Hunt SA, Haddad F. The changing face of heart transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2008;19;52(8):587-98.
8. Caves PK, Stinson EB, Graham AF, Billingham ME, Grehl TM, Shumway NE. Percutaneous transvenous endomyocardial biopsy. *JAMA*. 1973;225(3):288-91.

9. Kobashigawa J, Zuckermann A, Macdonald P, Leprince P, Esmailian F, Luu M, Mancini D, Patel J, Razi R, Reichenspurner H, Russell S, Segovia J, Smedira N, Stehlik J, Wagner F, Consensus Conference participants. Report from a consensus conference on primary graft dysfunction after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33(4):327-40.
10. Russo MJ, Iribarne A, Hong KN, Ramlawi B, Chen JM, Takayama H, Mancini DM, Naka Y. Factors associated with primary graft failure after heart transplantation. *Transplantation*. 2010;90(4):444-50.
11. Ibrahim M, Hendry P, Masters R, Rubens F, Lam B-K, Ruel M, Davies R, Haddad H, Veinot JP, Mesana T. Management of acute severe perioperative failure of cardiac allografts: a single-centre experience with a review of the literature. *Can J Cardiol*. 2007;23(5):363-7.
12. Schechter MA, Watson MJ, Feger BJ, Southerland KW, Mishra R, Dibernardo LR, Kuchibhatla M, Schroder JN, Daneshmand MA, Patel CB, Rogers JG, Milano CA, Bowles DE. Elevated Cardiac Troponin I in Preservation Solution Is Associated With Primary Graft Dysfunction. *J Card Fail*. 2016;22(2):158-62.
13. George TJ, Arnaoutakis GJ, Beaty CA, Shah AS, Conte JV, Halushka MK. A novel method of measuring cardiac preservation injury demonstrates University of Wisconsin solution is associated with less ischemic necrosis than Celsior in early cardiac allograft biopsy specimens. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31(4):410-8.
14. Patarroyo M, Simbaqueba C, Shrestha K, Starling RC, Smedira N, Tang WHW, Taylor DO. Pre-operative risk factors and clinical outcomes associated with vasoplegia in recipients of orthotopic heart transplantation in the contemporary era. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31:282-7.
15. Segovia J, Cosio MD, Barcelo JM, Bueno MG, Pavía PG, Burgos R, Serrano-Fiz S, García-Montero C, Castedo E, Ugarte J, Alonso-Pulpón L. RADIAL: a novel primary graft failure risk score in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(6):644-51.
16. Iyer A, Kumarasinghe G, Hicks M, Watson A, Gao L, Doyle A, Keogh A, Kotlyar E, Hayward C, Dhital K, Granger E, Jansz P, Pye R, Spratt P, Macdonald PS. Primary graft failure after heart transplantation. *J Transplant*. 2011;2011:175768.
17. Atkinson C, Floerchinger B, Qiao F, Casey S, Williamson T, Moseley E, Stoica S, Goddard M, Ge X, Tullius SG, Tomlinson S. Donor brain death exacerbates complement-dependent ischemia/reperfusion injury in transplanted hearts. *Circulation*. 2013;127(12):1290-9.

18. Altamirano F, Wang ZV, Hill JA. Cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation. *J Physiol.* 2015;593(17):3773-88.
19. Lecour S, Bøtker HE, Condorelli G, Davidson SM, Garcia-Dorado D, Engel FB, Ferdinandy P, Heusch G, Madonna R, Ovize M, Ruiz-Meana M, Schulz R, Sluijter JPG, Van Laake LW, Yellon DM, Hausenloy DJ. ESC working group cellular biology of the heart: position paper: improving the preclinical assessment of novel cardioprotective therapies. *Cardiovasc Res.* 2014;104(3):399-411.
20. Raghow R. An 'Omics' Perspective on Cardiomyopathies and Heart Failure. *Trends Mol Med.* 2016;22(9):813-27.
21. Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J.* 1967;41(48):1271-4.
22. Bazopoulou-Kyrkanidou E. Chimeric creatures in Greek mythology and reflections in science. *Am J Med Genet.* 2001;100(1):66-80.
23. Hardy JD, Kurrus FD, Chavez CM, Neely WA, Eraslan S, Turner MD, Fabian LW, Labecki TD. Heart transplantation in man. developmental studies and report of a case. *JAMA.* 1964;188:1132-40.
24. Thomson JG. Production of severe atheroma in a transplanted human heart. *Lancet.* 1969; 2(7630):1088-92.
25. Blaiberg P. *Looking at my heart.* London: William Heinemann; 1969.
26. Kantrowitz A, Haller JD, Joos H, Cerruti MM, Carstensen HE. Transplantation of the heart in an infant and an adult. *Am J Cardiol.* 1968;22(6):782-90.
27. Stinson EB, Dong Jr E, Schroeder JS, Harrison DC, Shumway NE. Initial clinical experience with heart transplantation. *Am J Cardiol.* 1968; 22(6):791-803.
28. Stolf NAG. History of heart transplantation: a hard and glorious journey. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2017;32(5):423-7.
29. Di Bardino DJ. The history and development of cardiac transplantation. *Tex Heart Inst J.* 1999;26(3):198-205.
30. Elzinga K. Major medical milestones leading up to the first human heart transplantation. In: *Proceedings of the 18th Annual History of Medicine*

Days Conference 2009: The University of Calgary Faculty of Medicine, Alberta: Cambridge Scholars Publishing, 2011.

31. Patterson C, Patterson KB. The history of heart transplantation. *Am J Med Sci.* 1997;314(3):190-7.
32. Chambers DC, Perch M, Zuckermann A, Cherikh WS, Harhay MO, Hayes D Jr, Hsich E, Khush KK, Potena L, Sadavarte A, Lindblad K, Singh TP, Stehlik J, International Society for Heart and Lung Transplantation. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-eighth adult lung transplantation report - 2021; Focus on recipient characteristics. *J Heart Lung Transplant.* 2021;40(10):1060-72.
33. Demiralp G, Arrigo RT, Cassara C, Johnson MR. Heart transplantation-postoperative considerations. *Crit Care Clin.* 2024 Jan;40(1):137-57. Epub 2023 Sep 9.
34. Hwang NC, Sivathasan C. Review of postoperative care for heart transplant recipients. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2023 Jan;37(1):112-26. Epub 2022 Sep 19.
35. Truby LK, Khazanie P, Farr M. Addressing United States heart transplant allocation in an era of rapid innovation. *JACC Heart Fail.* 2024 Jan;12(1):216-221. Epub 2023 Oct 7.
36. Yuzefpolskaya M, Schroeder SE, Houston BA, Robinson MR, Gosev I, Reyentovich A, Koehl D, Cantor R, Jorde UP, Kirklin JK, Pagani FD, D'Alessandro DA. The Society of Thoracic Surgeons Intermacs 2022 Annual Report: Focus on the 2018 Heart Transplant Allocation System. *Ann Thorac Surg.* 2023 Feb;115(2):311-27. Epub 2022 Dec 1.
37. Marcondes-Braga FG, Bonatto MG, Andrade CRA, Bacal F. Implementation of Heart Transplantation Program to Advanced Heart Failure Patients in Brazil. *Curr Heart Fail Rep.* 2019;16(1):7-11.
38. Awad MA, Shah A, Griffith BP. Current status and outcomes in heart transplantation: a narrative review. *Rev Cardiovasc Med.* 2022;23(1):11.
39. Birati EY, Rame JE. Post-heart transplant complications. *Crit Care Clin.* 2014;30(3):629-37.
40. Velleca A, Shullo MA, Dhital K, Azeka E, Colvin M, DePasquale E, Farrero M, García-Guereta L, Jamero G, Khush K, Lavee J, Pouch S, Patel J, Michaud CJ, Shullo MA, Schubert S, Angelini A, Carlos L, Mirabet S, Patel J, Pham M, Urschel S, Kim KH, Miyamoto S, Chih S, Daly K, Grossi P,

- Jennings DL, Kim IC, Lim HS, Miller T, Potena L, Velleca A, Eisen H, Bellumkonda L, Danziger-Isakov L, Dobbels F, Harkess M, Kim D, Lyster H, Peled Y, Reinhardt Z. The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2023 May;42(5):e1-e141. Epub 2022 Dec 20.
41. Ludhwani D, Abraham J, Sharma S, Kanmanthareddy A. Heart Transplantation Rejection. 2024 Aug 11. In: *StatPearls*. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2024.
 42. Cassady SJ, Ramani GV. Right Heart Failure in Pulmonary Hypertension. *Cardiol Clin*. 2020;38(2):243-55.
 43. Shad R, Fong R, Quach N, Bowles C, Kasinpila P, Li M, Callon K, Castro M, Guha A, Suarez EE, Lee S, Jovinge S, Boeve T, Shudo Y, Langlotz CP, Teuteberg J, Hiesinger W. Long-term survival in patients with post-LVAD right ventricular failure: multi-state modelling with competing outcomes of heart transplant. *J Heart Lung Transplant*. 202;40(8):778-85.
 44. Lee F, Nair V, Chih S. Cardiac allograft vasculopathy: Insights on pathogenesis and therapy. *Clin Transplant*. 2020;34(3):e13794.
 45. Foroutan F, Ross HJ. Primary graft dysfunction: the devil is in the details. *Transplantation*. 2019;103(2):229-30.
 46. Sabatino ME, Williams ML, Okwuosa IS, Akhabue E, Kim JH, Russo MJ, Setoguchi S. Thirty-year trends in graft survival after heart transplant: modeled analyses of a transplant registry. *Ann Thorac Surg*. 2022 May;113(5):1436-44. Epub 2021 Sep 21.
 47. Steffen SP, Tenório DF, Cirillo GCG, Gaspar SF, Oliveira KAS, Gaiotto FA, Jatene FB. Severe and Moderate Primary Graft Dysfunction in Adult Heart Recipients. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2023;38(2):214-8.
 48. Benck L, Kransdorf EP, Emerson DA, Rushakoff J, Kittleson MM, Klapper EB, Megna DJ, Esmailian F, Halprin C, Trento A, Ramzy D, Czer LSC, Chang DH, Ebinger JE, Kobashigawa JA, Patel JK. Recipient and surgical factors trigger severe primary graft dysfunction after heart transplant. *J Heart Lung Transplant*. 2021;40(9):970-80.
 49. Siddiqi HK, Trahanas J, Xu M, Wells Q, Farber-Eger E, Pasrija C, Amancherla K, Debose-Scarlett A, Brinkley DM, Lindenfeld J, Menachem JN, Ooi H, Pedrotty D, Punnoose L, Rali AS, Sacks S, Wigger M, Zalawadiya S, McMaster W, Devries S, Shah A, Schlendorf K. Outcomes

- of heart transplant donation after circulatory death. *J Am Coll Cardiol*. 2023;82(15):1512-20.
50. Hull TD, Crowley JC, Villavicencio MA, D'Alessandro DA. Primary graft dysfunction in heart transplantation: How to recognize it, when to institute extracorporeal membrane oxygenation, and outcomes. *JTCVS Open*. 2021;8:128-33.
51. Sicim H, Tam WSV, Tang PC. Primary graft dysfunction in heart transplantation: the challenge to survival. *J Cardiothorac Surg*. 2024;19(1):313.
52. Smith M. Physiologic changes during brain stem death—lessons for management of the organ donor. *J Heart Lung Transplant*. 2004;23(9 Suppl):S217-22.
53. Dictus C, Vienenkoetter B, Esmaeilzadeh M, Unterberg A, Ahmadi R. Critical care management of potential organ donors: our current standard. *Clin Transplant*. 2009;23(Suppl 21):2-9.
54. Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, Tjandra-Maga TB, Borgers M, Plets C, Flameng W. Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circulation*. 1993;87(1):230-9.
55. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988;45(4):673-6.
56. Marasco SF, Kras A, Schulberg E, Vale M, Lee GA. Impact of warm ischemia time on survival after heart transplantation. *Transpl Proc*. 2012;44(5):1385-9.
57. Banner NR, Thomas HL, Curnow E, Hussey JC, Rogers CA, Bonser RS, teering Group of the United Kingdom Cardiothoracic Transplant Audit. The importance of cold and warm cardiac ischemia for survival after heart transplantation. *Transplantation*. 2008;86(4):542-7.
58. Singh SSA, Dalzell JR, Berry C, Al-Attar N. Primary graft dysfunction after heart transplantation: a thorn amongst the roses. *Heart Fail Rev*. 2019;24(5):805-20.
59. Toldo S, Quader M, Salloum FN, Mezzaroma E, Abbate A. Targeting the innate immune response to improve cardiac graft recovery after heart transplantation: implications for the donation after cardiac death. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):958.

60. Smith NF, Salehi Omran S, Genuardi MV, Horn ET, Kilic A, Sciortino CM, Keebler ME, Kormos RL, Hickey GW. Primary Graft Dysfunction in Heart Transplant Recipients-Risk Factors and Longitudinal Outcomes. *ASAIO J.* 2022;68(3):394-401.
61. Guo A, Kotkar K, Jocher B, Botkin KW, Britt D, Fischer I, Masood MF, Schilling J, Itoh A. Increased severe primary graft dysfunction in left ventricular assist device patients following united network for organ sharing allocation changes. *Clin Transplant.* 2023 Jan;37(1):e14833. Epub 2022 Nov 25.
62. Truby LK, Takeda K, Topkara VK, Takayama H, Garan AR, Yuzefpolskaya M, Colombo P, Naka Y, Farr M. Risk of severe primary graft dysfunction in patients bridged to heart transplantation with continuous-flow left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant.* 2018 Dec;37(12):1433-42. Epub 2018 Jul 26.
63. Wright M, Takeda K, Mauro C, Jennings D, Kurlansky P, Han J, Lauren Truby 1, Samantha Stein 1, Veli Topkara 3, Arthur R Garan 3, Melana Yuzefpolskaya 3, Paolo Colombo 3, Yoshifumi Naka 1, Maryjane Farr 3, Hiroo Takayama. Dose-dependent association between amiodarone and severe primary graft dysfunction in orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2017;36(11):1226-33.
64. Cosío Carmena MD, Gómez Bueno M, Almenar L, Delgado JF, Arizón JM, González Vilchez F, Crespo-Leiro MG, Mirabet S, Roig E, Pérez Villa F, Fernández-Yañez JF, Lambert JL, Manito N, Fuente L, Sanz Julve ML, Pascual D, Rábago G, Millán I, Alonso-Pulpón LA, Segovia J. Primary graft failure after heart transplantation: characteristics in a contemporary cohort and performance of the RADIAL risk score. *J Heart Lung Transplant.* 2013;32(12):1187-95.
65. Moayedi Y, Truby LK, Foroutan F, Han J, Guzman J, Angleitner P, Sabatino M, Felius J, VAN Zyl JS, Rodenas-Alesina E, Fan CP, Devore AD, Miller R, Potena L, Zuckermann A, Farrero M, Chih S, Farr M, Hall S, Ross HJ, Khush KK. The International Consortium on Primary Graft Dysfunction: Redefining Clinical Risk Factors in the Contemporary Era of Heart Transplantation. *J Card Fail.* 2024 Jun;30(6):805-15. Epub 2023 Oct 30.
66. Takeda K, Li B, Garan AR, Topkara VK, Han J, Colombo PC, Farr MA, Naka Y, Takayama H. Improved outcomes from extracorporeal membrane oxygenation versus ventricular assist device temporary support of primary graft dysfunction in heart transplant. *J Heart lung Transplant.* 2017;36(6):650-6.

67. DeRoo SC, Takayama H, Nemeth S, Garan AR, Kurlansky P, Restaino S, Colombo P, Farr M, Naka Y, Takeda K. Extracorporeal membrane oxygenation for primary graft dysfunction after heart transplant. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2019;158(6):1576-84.
68. Dhillon A, Singh A, Bhalla VK. A systematic review on biomarker identification for cancer diagnosis and prognosis in multi-omics: from computational needs to machine learning and deep learning. *Arch Comput Methods Eng.* 2023;30(2):917-49.
69. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
70. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* 2008;18(9):1509-17.
71. Liu S, Lu M, Li H, Zuo Y. Prediction of gene expression patterns with generalized linear regression model. *Front Genet.* 2019;10:120.
72. Farcas AO, Stoica MC, Maier IM, Maier AC, Sin AI. Heart transplant rejection: from the endomyocardial biopsy to gene expression profiling. *Biomedicines.* 2024;12(8):1926.
73. Zhong Y, Tang K, Nattel S, Zhai M, Gong S, Yu Q, Zeng Y, E G, Maimaitiaili N, Wang J, Xu Y, Peng W, Li H. Myosin light-chain 4 gene-transfer attenuates atrial fibrosis while correcting autophagic flux dysregulation. *Redox Biol.* 2023;60:102606.
74. McDonald MM, Mihalj M, Zhao B, Nathan S, Matejin S, Ottaviani G, Jezovnik MK, Radovancevic R, Kar B, Gregoric ID, Buja LM. Clinicopathological correlations in heart transplantation recipients complicated by death or re-transplantation. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:1014796.
75. Holmström EJ, Syrjälä SO, Dhaygude K, Tuuminen R, Krebs R, Nykänen A, Lemström KB. Severe primary graft dysfunction of the heart transplant is associated with increased plasma and intragraft proinflammatory cytokine expression. *J Heart Lung Transplant.* 2023;42(6):807-18.
76. Trinchera M, Zulueta A, Caretti A, Dall'Olio F. Control of Glycosylation-Related Genes by DNA Methylation: the Intriguing Case of the B3GALT5 Gene and Its Distinct Promoters. *Biology (Basel).* 2014;3(3):484-97.

77. Giangreco NP, Lebreton G, Restaino S, Farr MJ, Zorn E, Colombo PC, Patel J, Levine R, Truby L, Soni RK, Leprince P, Kobashigawa J, Tatonetti NP, Fine BM. Plasma kallikrein predicts primary graft dysfunction after heart transplant. *J Heart Lung Transplant*. 2021;40(10):1199-211.
78. Truby LK, Kwee LC, Agarwal R, Grass E, DeVore AD, Patel CB, Chen D, Schroder JN, Bowles D, Milano CA, Shah SH, Holley CL. Proteomic profiling identifies CLEC4C expression as a novel biomarker of primary graft dysfunction after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2021;40(12):1589-98.

ANEXO

ANEXO

ANEXO 1 – Submissão do artigo já com as correções sugeridas

JHLT OPEN – Impact Factor 6.4

JHLT Open

Gene Expression Analysis of Primary Graft Dysfunction in Adult Heart Transplant Recipients: A Cohort Study --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JHLTO-D-24-00157R1
Full Title:	Gene Expression Analysis of Primary Graft Dysfunction in Adult Heart Transplant Recipients: A Cohort Study
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Heart Transplantation, Primary Graft Dysfunction, Gene Expression, Transcriptomics, MYL4.
Corresponding Author:	Samuel Padovani Steffen, MD University of Sao Paulo Heart Institute Sao Paulo, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Sao Paulo Heart Institute
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Samuel Padovani Steffen, MD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Samuel Padovani Steffen, MD Alvaro Monteiro Perazzo, MD, MSc Shirlyne Fabianni Dias Gaspar, MD Ronaldo Honorato Barros Santos, MD Domingos Dias Lourenço Filho, MD, PhD Luis Fernando Bernal da Costa Seguro, MD, PhD Alexandre da Costa Pereira, MD, PhD Fabiana Goulart Marcondes Braga, MD, PhD Fernando Bacal, MD, PhD Jose Eduardo Krieger, MD, PhD Fabio Antonio Gaiotto, MD, PhD Fabio Biscegli Jatene, MD, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Introduction: Cardiac transplantation remains the primary treatment for advanced heart failure, with Primary Graft Dysfunction (PGD) being the leading cause of early mortality. While PGD's exact pathogenesis is unclear, ischemia/reperfusion injury is a key factor. Donor hearts undergo multiple stresses, such as brain death, hypothermia, and ischemia, contributing to PGD and reduced graft survival. Many centers are studying PGD's pathophysiology through epidemiological, biomarker, and transcriptome analyses. This study aims to evaluate, via proteomic analysis of myocardial biopsies, the gene expression profile of patients with PGD and compare it with those without PGD. Methods: Adult heart transplant patients were included in the study after signing the Informed Consent. The diagnosis of PGD followed International Society for Heart and Lung Transplant (ISHLT) criteria. Clinical and laboratory data from donors and

	recipients were evaluated. We included 20 consecutive heart transplant patients in the protocol. Gene expression analysis was performed via biopsies at donor heart implantation. Results: Eleven genes had their expression significantly different in patients with PGD, with MYL4 the less expressed gene, and related to the myosin function and the gene B3GALT 5 the most expressed one and associated to inflammatory response. Conclusion: The gene expression in patients with PGD is different when compared to patients without PGD. MYL4 gene was much less expressed in these patients and B3GALT5 was overexpressed. Future studies regarding gene expression on PGD may clarify the pathophysiology and provide possible biomarkers of the disease.
Response to Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Please confirm that you understand that the special ISHLT member open access APC is only valid if the corresponding author is an active ISHLT member. To join immediately and take advantage of that special price, please visit: https://www.isHLT.org/membership<a>	Yes, I understand