Hui-Tzu Lin Wang

**Estudo sequencial do perfil de expressão gênica em biópsias
endomiocárdicas parafinadas: associação com rejeição humoral
e vasculopatia do aloenxerto cardíaco**

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese
de Cardiologia, Entidade Associada da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Programa de Medicina, Tecnologia e
Intervenção em Cardiologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

©reprodução autorizada pelo autor

Lin-Wang, Hui Tzu

Estudo sequencial do perfil de expressão gênica em biópsias endomiocárdicas parafinadas: associação com rejeição humoral e vasculopatia do aloenxerto cardíaco / Hui-Tzu Lin Wang.-- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Universidade de São Paulo
Área de Concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em
Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata

Descritores: 1.Transplante de Coração. 2. Rejeição de Enxerto.
3.Expressão Gênica. 4. RNA Mensageiro. 5. Biópsia. 6. Inclusão em
Parafina. 7. Reação em Cadeia da Polimerase. 8. Receptores de
Adiponectina. 9. Citocinas.

USP/IDPC/Biblioteca/034 /14

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Jung-Hui e Chhing-Jung, a minha profunda gratidão pelos sacrifícios que fizeram ao longo de suas vidas para proporcionar a mim e aos meus irmãos um futuro melhor do que eles tiveram. Os seus espíritos de perseverança e amor ao próximo são exemplos eternos para nós.

Aos meus irmãos, Hui-Lin, Hui-Ching, Yu-Chih e Yu-San, muito obrigada pelo carinho, companheirismo e cumplicidade que sempre existiram entre nós.

Ao meu marido Ming-Chhang, o pilar da nossa família, o companheiro compreensivo e amoroso que me proporcionou os momentos mais felizes da minha vida, e aos nossos filhos, Gabriel e Christiane, dádivas de Deus e que nos enchem de orgulho e alegria.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à comissão do programa de pós-graduação em Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia, USP/IDPC, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Amanda Guerra de Moraes Rego Sousa, pela oportunidade de fazer parte do corpo discente deste curso. Meu carinho especial à Mabília, Janeide e Valquíria, pela competência, paciência e incansáveis esforços em me auxiliar nos assuntos inerentes à pós-graduação.

Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata, pelo modo cordial com que me recebeu no laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia do IDPC e também por orientar este trabalho. Muito obrigada pelas críticas e sugestões construtivas, que certamente, foram importantes para a finalização deste trabalho.

Prof. Dr. Jarbas Jackson Dinkhuysen, pela efetiva participação na busca do financiamento. Muito obrigada pela confiança em relação à administração e execução desse projeto de pesquisa. Também aos médicos do setor de transplante cardíaco, Dr. Reginaldo Cipullo, Dr. João Manoel Rossi, Dr. Marco Aurélio Finger e também à Dra. Edileide Correia do setor de miocárdio, pelas valiosas contribuições na discussão dos dados clínicos que enriqueceram os resultados desse trabalho.

Aos pacientes transplantados cardíacos do IDPC, pelo convívio e pela lição de vida que muito me ensinaram. Em especial à Márcia Ferreira Maluf, a primeira mulher transplantada em nosso serviço, cuja vida é um exemplo de luta e perseverança para todos que a conhecem. Muito obrigada pela amizade e também por auxiliar na revisão e correção deste trabalho.

Aos colegas do setor de anatomia patológica do IDPC, Dra. Lilian e Dra. Mabel pela leitura das lâminas de imuno-histoquímica para o diagnóstico de rejeição humoral. À Abigail, cujo apelido carinhoso de “Bia”, amiga e confidente que este trabalho nos aproximou, obrigada por preparar com dedicação e perfeição quase oitocentas lâminas de biópsias que

fizeram parte deste trabalho. Também à Otanisia, Tatiana e Luiz, pelo carinho em que me receberam no setor, sem a colaboração de vocês, não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os funcionários, colegas, alunos e estagiários do Laboratório de Investigação em Cardiologia do IDPC, obrigada por não medirem esforços em auxiliar-me na realização deste trabalho. Em especial, Paula Lima, Jéssica Cassilla, Denise Cibeles da Silva e Aécio Braga, pela troca de ideias, sugestões e discussões que enriqueceram muito este trabalho. Principalmente, pela nossa amizade que foi responsável pelos melhores momentos de descontração durante essa árdua jornada. Aprendemos muito uns com os outros, certamente, levaremos conosco essas boas lembranças que não serão esquecidas mesmo que o futuro guie cada um por um caminho distinto.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia e Estatística do IDPC, especialmente, Valdir, Roberta, João Ítalo e Hayala, muito obrigada pela assistência na análise estatística e assuntos de informática, sem o apoio de vocês, este trabalho não teria o mesmo resultado.

Carinho especial à querida amiga Helena Teixeira, muito obrigada pela amizade e pela ajuda na correção e tradução deste trabalho.

Aos colegas da biblioteca, por me acolher com carinho todas as vezes que frequento o espaço da biblioteca. Especialmente à bibliotecária Anna pelo auxílio na busca dos artigos e na preparação da ficha catalográfica desta tese.

A todos os amigos e colegas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, muito obrigada pelo carinho, apoio e principalmente por contribuírem para o meu crescimento pessoal e profissional. Este trabalho é o resultado da confiança e incentivo de cada um de vocês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas, não esqueço de que a minha vida é a maior empresa do mundo, e posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um “não”.

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

Fernando Pessoa

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS E QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Terapia imunossupressora no transplante.....	4
1.2. Classificação e diagnóstico de rejeição	6
1.3. Vasculopatia do Alogenxerto Cardíaco	8
1.4. Receptores da adiponectina: sinalização e função	10
1.5. Gene <i>HMOX-1</i> codifica heme oxigenase-1	13
1.6. Função anti-apoptótica do Gene <i>BCL2L1</i>	14
1.7. Fator de crescimento endotelial vascular	15
1.8. Gene <i>NOS2</i> codifica Óxido nítrico sintetase induzida	16
1.9. Os genes associados à inflamação	18
2. OBJETIVOS	23
3. MÉTODOS	27
3.1. Delineamento experimental.....	27
3.2. Comitê de ética em pesquisa científica.....	28
3.3. Critérios de inclusão	29

3.4. Critérios de exclusão	29
3.5. Casuística	30
3.6. Esquema de imunossupressão usado nos pacientes	30
3.7. Biópsias endomiocárdicas bloqueadas em parafina	31
3.8. Diagnóstico e classificação da vasculite	32
3.9. Detecção de C3d e C4d pela reação de imuno-histoquímica.....	32
3.10. Obtenção de RNA de tecido embebido em parafina	34
3.11. Análise da integridade de RNA	37
3.12. Síntese de cDNA.....	37
3.13. Determinação do volume ideal de cDNA para RT-PCR.....	38
3.14. Escolha do gene de referência	39
3.15. Análise da expressão gênica por qPCR.....	42
3.16. Análise estatística	45
4. RESULTADOS	49
4.1. Dados demográficos e clínicos da população de estudo	49
4.2. Variação do tempo de transplante entre as amostras	50
4.3. Variabilidade da expressão gênica ao longo do tempo.....	51
4.4. Frequência de indivíduos segundo os níveis de expressão gênica.....	56
4.5. Frequência de positividade para C3d e C4d	58
4.6. Análise comparativa: expressão gênica e C4d do complemento	62
4.7. Frequência de rejeição celular na população de estudo	67
4.8. Frequência de vasculite na população de estudo.....	72

4.9. Correlação entre presença de C4d e grau de vasculite.....	73
4.10. Análise comparativa da expressão gênica na vasculite	73
4.11. Comportamento da expressão gênica na vasculopatia do aloenxerto cardíaco	77
4.12. Comportamento da expressão gênica: pulsoterapia	80
4.13. Análise de correlação entre as expressões dos genes	83
4.14. Relação entre expressões de ADIPOR1, ADIPOR2 e dados clínicos.....	83
4.15. Perfil de expressão gênica nas rejeições	84
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÕES	109
7. APÊNDICE.....	113
8. ANEXOS.....	123
9. REFERÊNCIAS	127

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ADIPOR1	-	Receptor tipo 1 da adiponectina
ADIPOR2	-	Receptor tipo 2 da adiponectina
AMPK	-	5' <i>adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
AIF-1	-	<i>Allograft inflammatory factor-1</i>
BCL2L1	-	Gene anti-apoptótico localizado na posição 20q11.21 do cromossomo humano
CT	-	<i>Cycle threshold</i>
C3d	-	Fragmento C3 do sistema complemento
C4d	-	Fragmento C4 do sistema complemento
cDNA	-	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
ECA	-	Enzima conversora da angiotensina
FFPE	-	<i>Formalina fixed paraffin embedded</i> – tecidos fixados com formol tamponado e embebidos em parafina
HLA	-	<i>Human leukocyte antigen</i>
HUVEC	-	<i>Human umbilical vein endotelial cell</i>
HMOX-1	-	Gene codificador da enzima heme oxigenase 1
IDPC	-	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IL-6	-	Interleucina seis
IHQ	-	Imuno-histoquímica
INF γ	-	Gene codificador da citocina interferon gama
ISLHT	-	<i>International Society for Heart and Lung Transplantation</i>
MCP-1	-	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
mRNA	-	Ácido ribonucleico mensageiro

NO	- Óxido nítrico
NOS	- <i>Nitric oxide synthases</i>
NOS2	- Gene codificador da enzima óxido nítrico sintetase induzida
PBMC	- <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PDGF	- <i>Platelet activating factor</i>
qPCR	- Reação em cadeia pela Polimerase quantitativa
RT-PCR	- Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase
PPAR α	- <i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
PRA	- Painel de reatividade de anticorpos
RAL	- Rejeição aguda leve
RAM	- Rejeição aguda moderada
RNA	- Ácido ribonucleico
Tx	- Transplante
TGF β	- <i>Transforming growth factor beta</i>
TNF α	- Gene codificador do fator necrose tumoral alfa
VAC	- vasculopatia do aloenxerto cardíaco
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
μ l	- microlitro
mg/Kg	- Miligrama por quilograma de peso

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 - Vias de sinalização da adiponectina	12
Figura 2 - Delineamento experimental	28
Figura 3 - Análise da integridade de RNA no Tape Station	37
Figura 4 - Determinação do volume ideal para RT-PCR	39
Figura 5 - Escolha do gene de referência	40
Figura 6 - Seleção do gene de referência no geNorm	41
Figura 7 - Distribuição das amostras de biópsias segundo o tempo de transplante	51
Figura 8 - Variabilidade da expressão gênica ao longo do tempo.....	54
Figura 9 - Frequências de indivíduos transplantados segundo a intensidade da expressão gênica.....	57
Figura 10 - Imagens microscópicas dos resultados da reação de imuno-histoquímica.....	59
Figura 11 - Análise comparativa da expressão gênica na rejeição humoral.....	65
Figura 12 - Análise comparativa da expressão gênica na rejeição celular	71
Figura 13 - Análise comparativa da expressão gênica na vasculite	76
Figura 14 - Comparação do comportamento da expressão gênica entre indivíduos com e sem doença vascular do enxerto	79
Figura 15 - Comparação do comportamento da expressão gênica entre indivíduos com e sem tratamento com pulsoterapia imunossupressora	81
Figura 16 - Análise de correlação entre <i>ADIPOR1</i> , <i>ADIPOR2</i> e <i>VEGF</i>	83

Figura 17 - Perfil de expressão gênica agrupados em genes protetores e inflamatórios nos grupos de vasculopatia do aloenxerto cardíaco, rejeição humoral e rejeição celular.....	85
---	----

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	Páginas
Tabela 1 - Especificações dos iniciadores usados na qPCR	44
Tabela 2 - Análise comparativa dos genes em 5 tempos de pós transplante	53
Tabela 3 - Distribuição das frequências dos indivíduos transplantados segundo o tempo de transplante e grau de rejeição humoral	62
Tabela 4 - Análise comparativa entre a expressão gênica e presença de C4d	63
Tabela 5 - Distribuição das 300 amostras de biópsias segundo o grau de rejeição celular e o período de transplante	67
Tabela 6 - Análise comparativa da expressão gênica na rejeição celular	69
Tabela 7 - Distribuição das frequências de biópsias de 63 indivíduos transplantados segundo o tempo de transplante e grau de vasculite e quantidade de vasos acometidos	72
Tabela 8 - Análise comparativa da expressão gênica na vasculite ao longo do tempo	74
Quadro 1 - Resultados da análise de C3d e C4d de 63 indivíduos transplantados cardíacos distribuídos segundo o tempo de transplante	61

RESUMO

Lin-Wang H.T. "Estudo sequencial do perfil de expressão gênica em biópsias endomiocárdicas parafinadas: associação com rejeição humoral e vasculopatia do aloenxerto cardíaco" [Tese]. São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia/ Universidade de São Paulo; 2014.

O transplante cardíaco é a última opção terapêutica para pacientes portadores de insuficiência cardíaca grave. Apesar dos avanços na terapia imunossupressora, a rejeição continua sendo o principal obstáculo para o sucesso do transplante. No presente estudo, propõe-se avaliar o perfil de expressão gênica no tecido cardíaco. Com isso, espera-se contribuir para o melhor entendimento do processo de rejeição a nível molecular. Foram analisadas as amostras sequenciais (1, 3 e 6 meses, 1 e 2 anos pós-transplante) de biópsias endomiocárdicas em parafina de 63 indivíduos transplantados cardíacos. O diagnóstico de rejeição humoral foi realizado pela detecção de C3d e C4d do complemento na reação de imuno-histoquímica, e as expressões dos genes protetores (*ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *HMOXO-1*, *BCL2L1* e *VEGF*) e genes associados à inflamação (*IL-6*, *TNF α* , *IFN γ* , *TGF- β* , *AIF-1*, *NOS2*, *ICAM*, *VCAM* e *MCP-1*); foram avaliadas pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). As frequências de indivíduos positivos para C4d (28,6%) e vasculite (20,0%) foram significativamente maiores em relação ao teste de reatividade de anticorpos realizado nos receptores antes do transplante (6,3%). Houve mudança no perfil de expressão gênica no tecido cardíaco após o transplante, com aumento da expressão dos genes inflamatórios (*AIF-1*, *TNF α* , *IL-6*, *NOS2* e *VCAM*) e diminuição da expressão dos genes protetores (*ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1* e *VEGF*). Além disso, as expressões dos

genes *ADIPOR1* e *ADIPOR2* foram significativamente menores nos indivíduos positivos para C4d ($p<0,001$) e gene *VEGF* ($p<0,001$) no grupo com vasculite. Houve também uma correlação positiva entre a expressão do gene *VEGF* e *ADIPOR1* ($r=0,5688$) e *ADIPOR2* ($r=0,5191$). Por outro lado, a expressão aumentada do gene *VCAM* ($p<0,001$) foi detectada em todos os tipos de rejeição. Conclui-se que, depois do transplante, o sistema imune do receptor passou a reconhecer os antígenos do órgão transplantado. Com isso, ocorreu uma mudança no perfil de expressão gênica no enxerto cardíaco, caracterizada pela expressão aumentada dos genes inflamatórios e diminuição dos genes protetores. A expressão aumentada do gene *VCAM* associada à baixa expressão dos genes protetores: *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1* e *VEGF* resultaram em maior gravidade da rejeição celular, humoral e vasculopatia do aloenxerto cardíaco.

Descritores: Transplante de coração; Rejeição de enxerto; Expressão gênica; RNA mensageiro; Biópsia; Inclusão em parafina; Reação em cadeia da polimerase; Receptores de adiponectina; Citocinas.

ABSTRACT

Lin-Wang H.T. Sequential study of gene expression profiles in paraffin embedded endomyocardial biopsies: association with humoral rejection and cardiac allograft vasculopathy [Thesis]. São Paulo: "Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia / Universidade de São Paulo"; 2014.

Heart transplantation is the ultimate treatment for patients with severe heart failure. Despite advances in immunosuppressive therapy, rejection still remains the main obstacle to successful transplant. The purpose of this study is to evaluate the gene expression profile in cardiac tissue. With this we hope to contribute to a better understanding of the rejection process at the molecular level. Sequential samples (1, 3, and 6 months, 1 to 2 years post-transplant) endomyocardial biopsies paraffin of 63 heart transplant subjects were analyzed. The diagnosis of humoral rejection was performed by detection of C3d and C4d complement in immunohistochemistry and the expression of protective genes (*ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *HMOXO-1*, and *VEGF BCL2L1*) and genes associated with inflammation (*IL-6*, *TNF α* , *IFN γ* , *TGF- β* , *AIF-1*, *NOS2*, *ICAM*, *VCAM* and *MCP-1*); were evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). The frequency of individuals positive for C4d (28.6%) and vasculitis (20.0%) were significantly higher compared to antibodies reactivity test conducted in the recipients before transplantation (6.3%). There was a change in the gene expression profile in cardiac tissue after transplantation, with increased expression of inflammatory genes (*AIF-1*, *TNF α* , *IL-6*, *NOS2*, and *VCAM*) and a decreased expression of protective genes (*ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1*, and *VEGF*). Furthermore, the expressions of *ADIPOR1* and *ADIPOR2* genes were

significantly lower in C4d positive individuals ($p<0,001$), and *VEGF* ($p<0,001$) in the group with vasculitis. There was also a positive correlation between *VEGF* expression and *ADIPOR1* ($r=0.5688$) and *DIPOR2* ($r=0.5191$). Moreover, increased expression of *VCAM* ($p<0,001$) was detected in all types of rejection. We conclude that, after transplantation, the recipient's immune system began to recognize the antigens of the transplanted organ. Thus, a change in gene expression profile in cardiac graft is characterized by increased inflammatory genes and decreased expression of protective genes. Increased *VCAM* gene associated with lower expression of protective genes expression: *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1* and *VEGF* resulted in increased severity of cellular and humoral rejection and cardiac allograft vasculopathy.

Descriptors: Heart transplantation; Graft rejection; Gene expression; RNA messenger; Biopsy; Paraffin embedding; Polymerase chain reaction; Adiponectin receptors; Cytokines.

1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O transplante do coração é a última opção terapêutica para os pacientes portadores de doenças cardíacas terminais refratários ao tratamento farmacológico e cirúrgico. Após o transplante, a maioria dos pacientes tem uma qualidade de vida restabelecida, e muitos voltam a ter um vínculo empregatício (1-3).

O primeiro transplante de coração humano foi realizado em 1967, na cidade do Cabo, na África do Sul, pela equipe do Dr. Christian Barnard a um comerciante de 54 anos que recebeu o coração de uma mulher de 25 anos mortalmente ferida, horas antes em um acidente de aviação (4).

O primeiro transplante cardíaco no Brasil, e também da América Latina (17º. do mundo) foi realizado pelo Dr. Euryclides de Jesus Zerbine e a sua equipe no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 26 de maio de 1968. O receptor foi um homem de 32 anos que tinha miocardiopatia chagásica, porém ele faleceu 28 dias após a cirurgia (5).

Na década de 70, os pacientes transplantados sobreviviam pouco, faleciam principalmente por causa das complicações decorrentes de imunossupressão, e esse procedimento foi praticamente abandonado, sendo que poucos centros continuaram com o programa de transplante cardíaco ao redor do mundo (6;7). Com a disponibilidade da ciclosporina no início da década de 80, o transplante cardíaco retornou como uma alternativa atraente para o tratamento da insuficiência cardíaca avançada. Segundo o registro da Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão

(ISHLT – *International Society of Heart and Lung Transplantation*), 407 hospitais de todo o mundo registraram 110.486 casos de transplante de coração no período de 1982 até julho de 2012 (8).

Em um estudo retrospectivo realizado com 80 pacientes que receberam transplante cardíaco ortotópico no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) no período de 1991 a 2000, observou-se que as diversas formas de miocardiopatia representam 88,75% das causas do transplante cardíaco, sendo, a forma idiopática (37,5%), isquêmica (33,7%), e chagásica (17,5%). Em nosso país essa frequência é maior devido à doença de Chagas, pois segundo os dados da *ISHLT*, na América do Norte, 50% do transplante tem como causa a miocardiopatia e na Europa e em outros países é de 58% (9). A taxa de sobrevida da população de transplante cardíaco é de 72,7%, 61,5% e 56,4% no primeiro, quinto e sétimo anos de transplante, respectivamente. A sobrevida a curto e a longo prazo dos pacientes transplantados no IDPC mostrou-se semelhante a de outros centros transplantadores nacionais e internacionais (9-12).

1.1. *Terapia imunossupressora no transplante*

Os fármacos imunossupressores atuais reduzem eficientemente a resposta imune do receptor contra os antígenos do doador, diminuindo assim, a incidência de rejeição celular. Em geral, esses medicamentos têm como alvo os sinais intracelulares envolvidos na ativação de linfócitos e células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, linfócito B e células dendríticas. Porém, o uso da imunossupressão também tem vários efeitos

Introdução

colaterais, podendo contribuir para a redução da sobrevida do órgão transplantado (13;14)

O esquema tríptico incluindo corticosteroide, inibidor de calcineurina e antiproliferativo é utilizado de maneira rotineira na grande maioria dos serviços. Mais recentemente, estratégias incluindo inibidores do sinal de proliferação têm sido propostas (15).

Os corticosteróides são hormônios pleitrópicos com ação anti-inflamatórias e imunorreguladoras que inibem a ação dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1, os quais estão envolvidos na transcrição de inúmeras citocinas e quimiocinas (16).

A ciclosporina e o Tacrolimus são conhecidos como os inibidores de calcineurina. Ambos se ligam primeiramente às imunofilinas no citoplasma celular, formando um complexo que se liga à fosfatase da calcineurina. Esse complexo inibe a desfosforilação catalizada pela calcineurina que é essencial para recrutamento do fator nuclear das células T ativadas (NFAT) para o núcleo. O NFAT é necessário para a transcrição de IL-2, IL-4 e outras citocinas associadas à diferenciação e proliferação dos linfócitos T (17).

As moléculas derivadas da rapamicina, sirolimus e everolimus, são inibidoras da via de sinalização desencadeada pela IL-2. Esses fatores agem no mTOR (*mammalian target of rapamycin*) prevenindo a progressão do ciclo celular do estágio G1 para S (18).

O ácido micofenólico, metabólito ativo do micofenolato Mofetil (MMF) é um inibidor da inosina monofosfatase desidrogenase. Essa enzima inibe a síntese de nucleotídeos de purina e a depleção de trifosfato de guanosina de

linfócitos e monócitos (19). Desta forma, o ácido micofenólico reduz o recrutamento de linfócitos e monócitos aos sítios de inflamação, contribuindo para sua ação imunossupressora em rejeição de transplante.

1.2. Classificação e diagnóstico de rejeição

Considerando os componentes imunológicos envolvidos na rejeição ao enxerto, se a rejeição for mediada por linfócito T, ela é denominada de rejeição celular. O diagnóstico desse tipo de rejeição é bem estabelecido, e a resposta às drogas imunossupressoras aplicadas também é bastante satisfatória (20), portanto, não é mais a barreira intransponível para uma boa evolução do transplante.

A rejeição humoral é mediada por anticorpos pré-existentes ou que surgem após o transplante. Por isso, também é denominada de rejeição mediada por anticorpos (AMR - *Antibody-mediated rejection*). A reatividade desses anticorpos é dirigida principalmente aos antígenos do doador. Vale ressaltar que é possível também observar a coparticipação da resposta humoral e celular no processo de rejeição ao enxerto (21-23).

Os mecanismos efetores de anticorpos na rejeição aos enxertos incluem: citotoxicidade, recrutamento de células inflamatórias e ativação do sistema complemento (24). O diagnóstico da AMR é feito principalmente por meio da detecção de fragmentos do complemento (C3d e/ou C4d) e imunoglobulinas (IgG, IgM e/ou IgA) por método de imunofluorescência ou imunohistoquímica (25-27). Os estudos histológicos de disfunção endotelial,

Introdução

com a observação da presença de edema e vasculite em biópsia também sugerem uma AMR em atividade (28).

No caso do transplante renal, sabe-se que há um número considerável de pacientes que apresentam quadro clínico de AMR, porém negativos para teste de detecção de C4d do complemento na biópsia dos mesmos (29;30). Isto sugere que outros alvos não HLA (*human leukocyte antigen*) do doador, ou a via alternativa do complemento pode estar envolvida na agressão ao endotélio vascular do enxerto (31).

Em modelos experimentais de transplante renal foi observado que não só os componentes do sistema complemento produzidos pelo fígado e presentes no soro, mas os produzidos localmente pelas células do sistema imunes infiltradas no enxerto também poderiam ser responsáveis pela lesão do órgão transplantado (32;33). No transplante cardíaco, analisaram-se a expressão dos genes relacionados à síntese de elementos do sistema complemento em tecidos de biópsias endomiocárdicas congelados, e observaram que os genes codificadores das proteínas da via alternativa do sistema complemento; o fator B, C3, properdina, e os receptores para C3a e C5a estavam significativamente mais expressos em indivíduos com rejeição moderada (grau 3 ISHLT) do que naqueles com grau leve ou sem rejeição (31).

A ISHLT tem se esforçado para a padronização dos critérios de diagnóstico da AMR (26). Porém, o método de diagnóstico da AMR ainda é bastante divergente entre os centros transplantadores.

1.3. Vasculopatia do Aloenxerto Cardíaco

A maior complicação que limita uma boa evolução em longo prazo de um transplante cardíaco é a vasculopatia do aloenxerto cardíaco (VAC), ou também denominada de rejeição crônica ou doença vascular do enxerto (34). Segundo o registro realizado pela ISHLT em aproximadamente 80.000 pacientes transplantados cardíacos de todo o mundo, após cinco anos de seguimento, 33% desses pacientes tiveram VAC (12). No Brasil, a prevalência da VAC observada pelo grupo do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foi de 38% (35), dado que se assemelha aos de outros países (36-40).

A VAC caracteriza-se por um espessamento intimal difuso e obliterativo, frequentemente, distal das artérias coronárias, capaz de promover isquemia responsável pela deterioração aguda ou progressiva do enxerto (41). Quando se analisa o aspecto histológico da lesão coronariana da VAC, observa-se predominância de macrófagos e linfócitos T citotóxicos, com a proliferação de células musculares lisas e hiperplasia concêntrica da camada íntima da artéria, resultando em estenose luminal cujo aspecto é semelhante à reestenose pós-angioplastia (35;42;43).

Os mecanismos envolvidos na patogênese da VAC ainda carecem de evidências objetivas. Sabe-se que a vasculopatia ocorre progressivamente desde o primeiro ano de transplante (44;45) e geralmente é acompanhada de lesão do endotélio causada por mecanismos imunológicos e/ou não imunológicos que resulta em recrutamento e ativação de linfócitos, macrófagos e células musculares lisas(46-48). Provavelmente, as rejeições

Introdução

celulares e humorais prévias também favorecem o surgimento da VAC (47;49;50).

Segundo o consenso da *ISHLT* de 2010 (51), o padrão ouro para o diagnóstico da VAC é realizado por testes funcionais e de imagem. Alguns desses testes, como a angiografia coronária e o ultrassom intravascular são procedimentos invasivos que expõem pacientes ao maior risco. Outros testes não invasivos como eco cardiografia por stress com dobutamina, ou tomografia computadorizada com perfusão de tecnécio-99m sestamibi são preferencialmente usados para seguimento de pacientes transplantados (52). A comunidade científica tem buscado novas abordagens para o diagnóstico e tratamento de VAC. Alguns pesquisadores focaram suas pesquisas nos biomarcadores protéicos como: troponina (53), proteína C-reativa (54) e peptídeo natriurético tipo B (55;56). Porém, esses marcadores não são específicos para VAC, porque sofrem interferência de variáveis como: obesidade, sexo e função renal do indivíduo (57).

Tendo em vista que o processo de rejeição é mediado, principalmente, pelos linfócitos citotóxicos ou anticorpos do receptor, resultando em lesão endotelial crônica e remodelamento fibroproliferativo do vaso (58), e que uma boa evolução do enxerto não depende somente do controle da resposta imune exacerbada do receptor, mas também da capacidade do órgão transplantado de se proteger das agressões do sistema (59). Sabe-se que alguns genes são descritos na literatura como protetores, devido aos seus transcritos possuírem a capacidade de controlar o processo inflamatório local, diminuir a apoptose e proliferação das células endoteliais e células

musculares lisas vasculares do órgão transplantado. Por isso, para o presente estudo, foram selecionados os seguintes genes para a análise de perfil de expressão gênica em indivíduos transplantados cardíacos: os genes protetores (*ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *HMOXO-1*, *BCL2L1* e *VEGF*) e genes associados à inflamação e adesão celular (*IL-6*, *TNF α* , *IFN γ* , *TGF- β* , *AIF-1*, *NOS2*, *ICAM*, *VCAM* e *MCP-1*).

1.4. Receptores da adiponectina: função e sinalização

Adiponectina, também denominada de Acrp30, AdipoQ ou GBP28, é uma glicoproteína produzida pelo tecido adiposo, e a sua concentração no plasma de um indivíduo humano saudável varia de 3 a 30 $\mu\text{g/ml}$ (60-62).

A adiponectina é formada por uma estrutura de colágeno em forma de haste no domínio N-terminal, e outra estrutura globular no C-terminal da proteína (63). Existem três isoformas de adiponectina, trímero de 90 kDa (adiponectina de baixo peso molecular), o hexâmero que geralmente é gerado a partir do trímero (adiponectina de médio peso molecular) e complexo de 12 a 18 monómeros que forma adiponectina de alto peso molecular. Qualquer uma das isoformas de adiponectina circulante pode sofrer a proteólise e clivada em um produto menor, contendo somente o fragmento globular da proteína (63). Tsao e colaboradores observaram que somente as isoformas de peso molecular médio e alto da adiponectina são capazes de ativar o fator nuclear NF κ B na linhagem celular em cultura (64). O efeito biológico da adiponectina também foi observado somente com isoforma de alto peso molecular em indivíduos transplantados renais, em

Introdução

que os valores elevados de adiponectina correlacionaram com a maior sensibilidade à insulina (65).

A adiponectina é uma adipocina que tem a ação conhecida principalmente no metabolismo lipídico e sensibilidade à insulina, além do efeito anti-inflamatório e anti-aterogênico (66). A ligação da adiponectina aos receptores ADIPOR1 e ADIPOR2, presentes principalmente no músculo e fígado, respectivamente, é feita por meio do domínio globular da adiponectina, desse modo, o metabolismo da glicose e oxidação de ácidos graxos são ativada vias AMPK e PPAR alfa (67).

No campo da pesquisa do transplante cardíaco experimental, Ishihara e colaboradores (68) avaliaram o efeito da adiponectina sobre a VAC em camundongos transgênicos submetidos ao transplante cardíaco ectópico com incompatibilidade total da molécula MHC de classe II (*Major Histocompatibility Complex*). Em comparação com o grupo controle, observou-se que o grupo transgênico apresentou maior nível plasmático de adiponectina associado a maior expressão de receptores ADIPOR1 e ADIPOR2 em tecido cardíaco desses animais. Soma-se a esse resultado, observaram menor expressão das citocinas inflamatórias (IL-6, TNF α , IFN γ , TGF- β e MCP-1) no coração transplantado, indicando o menor recrutamento das células do sistema imune, consequentemente, menor produção de citocinas inflamatórias. O estudo histológico também evidenciou menor grau de espessamento da neoíntima, indicando menor gravidade da VAC. Além disso, a adição da adiponectina em cultura de células musculares lisas estimuladas com linfócitos T ativados foi capaz de suprimir a proliferação

dessas células, mostrando que realmente adiponectina tem um papel benéfico na redução da progressão da VAC (68).

As vias de sinalização da adiponectina nas células do sistema imunológico e cardiovascular estão ilustradas na figura 1. O esquema foi adaptado do artigo publicado pelo Hopkins e colaboradores na revista Cardiovascular Research de 2007 (66).

Figura 1: vias de sinalização da adiponectina nas células do sistema imunológico e cardiovascular. O efeito anti-inflamatório da adiponectina é obtido pela supressão da sinalização do NF-κB em monócitos e macrófagos. Também por essa mesma via é capaz de inibir ativação das células endoteliais e reduzir a progressão da aterosclerose. Além disso, a adiponectina é capaz de ativar a AMPK, reduzindo a apoptose e induzir a produção de óxido nítrico nas células endoteliais. No coração, adiponectina ativa AMPK e reduz a resposta da hipertrofia por meio da supressão da síntese proteica. Ativação da COX-2 pela adiponectina diminui a expressão do TNFα no coração. Finalmente, a adiponectina diminui a proliferação e migração das células musculares lisas, consequentemente, diminui a gravidade da aterosclerose.

1.5. Gene *HMOX-1* codifica heme oxigenase-1

Há três isoformas de heme oxigenase descritas na literatura: HO-1, HO-2 e HO-3. Elas são codificadas pelos diferentes genes que também são regulados distintamente. Na grande maioria dos tipos celulares, a expressão da HO-1 é baixa, exceto no baço, onde a expressão constitutiva da HO-1 é elevada. A expressão aumentada de HO-1 é induzível em resposta às situações de estresse. Acredita-se que HO-1 tem função de proteger as células contra os danos causados pela oxidação e inflamação. HO-2 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos de um indivíduo, e a HO-3 possui a estrutura proteica semelhante ao HO-2, no entanto, com atividade enzimática menor (69).

A HO-1 ou proteína de choque térmico 32 (Hsp32) é codificada pelo gene *HMOX-1* cuja ação enzimática é responsável pela conversão da molécula heme da hemoglobina em biliverdina, monóxido de carbono e íon ferro. Estes metabólitos participam do controle do tônus vascular e exercem importantes funções anti-oxidante, anti-inflamatória e anti-apoptótica (70-72).

Em animais, o efeito citoprotetor da HO-1 durante a isquemia-reperfusão tem sido descrito em diferentes modelos de transplante de órgãos sólidos (73;74). No transplante renal, os pacientes que receberam um rim de doador com perfil genético para alta produção de HO-1 apresentaram melhor sobrevida do enxerto após cinco anos de transplante (75). Assim, HO-1 tem sido apontada como alvo terapêutico promissor para o tratamento das doenças cardiovasculares (76).

1.6. Função anti-apoptótica do Gene *BCL2L1*

Apoptose é um processo de morte celular programada, podendo ser iniciada ou inibida por uma série de estímulos fisiológicos ou patológicos, cujo objetivo é manter a homeostase do organismo, bem como defender-se das infecções. O mecanismo de apoptose pode ser ativado via receptor celular (extrínseca) ou mitocondrial (intrínseca) (77).

Há vários genes envolvidos no mecanismo de apoptose, entre eles, a família de genes *BCL-2* que têm a função de regular uma série de estímulos indutores de morte celular em situações de privação de fator de crescimento, e na presença de glicocorticoides, receptor de anticorpos ou agentes quimioterápico ou radioterápico (78).

Alguns genes da família *BCL-2* são anti-apoptóticos, como *BCL2*, *MCL1*, *BCL2A1* e *BCL2L1*, outros são apoptóticos, por exemplo: *BAX*, *BAK*, *BAD* e *BCLXS*. As proteínas codificadas por esses genes, as mais conhecidas são Bcl-2 e Bcl-xL que tem o efeito anti-apoptótico, e por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas que têm ação apoptóticas (79).

As proteínas da família de *BCL-2* também formam os homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), acredita-se que o equilíbrio entre esses dímeros determina o efeito pró ou anti-apoptótico em diversos tipos celulares (80;81),

As proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xL têm ação sobre a regulação da membrana mitocondrial, controlando a produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de citocromo C pela mitocôndria, essas substâncias são potentes indutores de apoptose celular (82). A literatura tem

Introdução

mostrado que a desregulação no mecanismo de apoptose favorece o surgimento de doenças autoimunes, degenerativas, câncer (83-85) e rejeição do enxerto cardíaco (86).

1.7. Fator de crescimento endotelial vascular

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - *vascular endothelial growth factor*) é produzido pelas células endoteliais, monócitos, linfócitos T ativados (87-89), cardiomiócitos (90) e células epiteliais (91).

VEGF é um indutor da angiogênese crucial na manutenção dos capilares peritubulares, garantindo o aporte sanguíneo adequado para os túbulos renais e interstício (92-94). Em modelo murino de nefropatia crônica, a redução da expressão de VEGF está diretamente relacionada à diminuição da densidade de capilares peritubulares e o desenvolvimento de fibrose intersticial e atrofia tubular (95). Já os pacientes de transplante renal com fenótipo de alto produtor de VEGF apresentaram melhor sobrevida do enxerto após cinco anos de transplante (96). Além da função de angiogênese, VEGF também tem efeito sobre as células endoteliais em cultura, prevenindo contra apoptose e senescência (97;98).

No transplante cardíaco, tem sido apontado o efeito pró-inflamatório do VEGF no processo da rejeição celular e na VAC (90;99). Uma das hipóteses é o recrutamento das células progenitoras hematopoiéticas e vasculares provenientes do receptor para o enxerto, esse processo é mediado pelos fatores angiogênicos, como VEGF (*vascular endothelial growth*

fator), Ang 1 (*angiopoetin-1*) e PDGF (*platelet-derived growth factor*) produzidos localmente em resposta à inflamação. Assim, essas células progenitoras proliferam descontroladamente, resultando em desenvolvimento da VAC no coração transplantado (90).

1.8. Gene NOS2 codifica Óxido nítrico sintetase induzida

O óxido nítrico (NO - *nitric oxide*) é um radical livre, inorgânico e lipofílico gerado a partir do precursor L-arginina pelas três isoformas da enzima NOS (*nitric oxide synthases*): tipo1 ou neuronal (nNOS ou NOS1); tipo 2 ou induzido (iNOS ou NOS2) e tipo 3 ou endotelial (eNOS ou NOS3). As três NOS diferem funcionalmente, sendo as isoformas NOS1 e NOS3 são constitutivas e reguladas pela concentração intracelular de cálcio (100).

O benefício do NO sobre o sistema vascular foi demonstrado pela administração de arginina (precursor de NO) em coelhos hipercolesterolêmicos. Esses animais desenvolvem espontaneamente a lesão vascular aterosclerótica, porém, aqueles que receberam a arginina tiveram a atividade do NO restaurada, com diminuição da quantidade de macrófagos infiltrados na parede vascular (101).

Em condições patológicas, as alterações funcionais da enzima NOS3 afetam a síntese do NO, e por consequência, disfunção endotelial, favorecendo o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, como aterosclerose, diabetes e hipertensão (102). Além disso, em lesões de aterosclerose foram detectados altos níveis de peroxinitrito (ONOO-) que é um produto da interação do NO com superóxido. O peroxinitrito atua

Introdução

desviando a produção natural de NO pela NOS3 para produzir composto de superóxido, reduzindo assim, níveis adequados de NO para a manutenção da homeostase do tecido vascular (102;103).

Em relação à forma induzida de NOS, a NOS2. Pieper e colaboradores administraram a sepiapterina, um composto químico precursor do BH4 (*tetrahydrobiopterin*) que é um cofator da NOS2 na regulação da síntese de NO em ratos submetidos ao alotransplante cardíaco. Observaram aumento da biodisponibilidade de BH4 que foi associado à diminuição significativa de células inflamatórias infiltradas, apoptose e grau de rejeição celular (104). Em concordância com esses resultados, outros pesquisadores mostraram que a atividade anti-inflamatória do NO é pelo menos em parte, pela inibição da expressão das moléculas de adesão (VCAM e ICAM), quimiocina MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) e outros fatores teciduais (105;106).

O gene NOS2 não é expresso em tecidos no estado fisiológico, mas é altamente expressa em diversos tecidos quando estimulados com LPS ou citocinas inflamatórias, gerando uma grande quantidade de NO (107;108). Alguns pesquisadores acreditam que a produção excessiva de NO pela NOS2 resultaria em resistência à vasoconstrição e pode causar danos à parede vascular (109;110), além do forte efeito negativo sobre a contractilidade do cardiomiócito (108;111-113). Provavelmente, o equilíbrio das atividades da NOS e a biodisponibilidade adequada do NO confere o efeito protetor ao tecido, e o desequilíbrio contribuiria para o desenvolvimento e progressão das doenças cardiovasculares.

1.9. Os genes associados à inflamação

Alguns genes como *AIF-1* (*Allograft inflammatory factor-1*) cujos transcritos são responsáveis pela inflamação local e proliferação de células musculares lisas. A expressão elevada desse gene tem sido associada à rejeição celular (114;115) e VAC (116). A expressão aumentada de algumas citocinas e moléculas de adesão celular, como: IL-6, TNF α , IFN γ , TGF- β , VEGF e MCP-1 também têm sido associada à maior gravidade da VAC por favorecer o processo inflamatório e proliferação celular (68).

A proteína *AIF-1* (*allograft inflammatory fator-1*) foi identificada originalmente em macrófagos e neutrófilos infiltrados na parede vascular do coração de ratos submetidos ao alotransplante em processo de rejeição crônica. Em cultura, os macrófagos estimulados com a citocina IFN γ aumentaram seis vezes a expressão do gene *AIF-1* quando comparada à condição basal (117).

A expressão constitutiva do *AIF-1* foi observada em podócito renal, a expressão aumentada de *AIF-1* em nefrite é devido principalmente às células inflamatórias infiltrantes (118). A expressão da proteína *AIF-1* também foi observada em células Kupffers de camundongos transplantados hepático, e a expressão de *AIF-1* na fase inicial do transplante era duas vezes maior do que na fase crônica. Essas células Kupffers colocadas em cultura e estimuladas com citocinas inflamatórias apresentaram maior expressão de *AIF-1*, sugerindo possível participação da *AIF-1* em rejeição hepática (119). Em linfócitos T transfectados com o gene *AIF-1*, observou-

Introdução

se uma maior infiltração dessas células com produção de citocinas capaz de induzirem os fibroblastos a adquirirem o fenótipo fibrótica (120).

No contexto do transplante cardíaco, a isquemia e reperfusão inicial do transplante podem estimular a expressão da AIF-1 e causar a lesão dos cardiomiócitos. Além disso, os indivíduos com grau grave de rejeição celular (3A) em comparação com grau leve (1A) apresentaram a expressão do gene *AIF-1* aumentada em 2,4 vezes em monócitos obtidos do sangue periférico e 4,2 vezes em biópsias endomiocárdicas (114). Soma-se a isto, Zhou (115) e colaboradores observaram que além das células mononucleares, os cardiomiócitos também expressam *AIF-1* e correlacionou-se com a maior gravidade da rejeição celular. A expressão de *AIF-1* também foi observada na artéria coronariana de indivíduos com VAC (116;121).

Sabe-se que há uma rede complexa de citocinas regulando a resposta imune do receptor, desde os danos de isquemia e reperfusão no início do transplante, ou na inflamação e na rejeição, até mesmo na tolerância do enxerto (122). Por exemplo, a expressão de AIF-1 é regulada pela citocina INF γ no contexto do transplante cardíaco (117) e hepático (119). A citocina TNF α regula outras citocinas inflamatórias e molécula de adesão no transplante pulmonar (123). E a citocina IL-6 liberada em resposta ao estímulo da infecção aguda, condições inflamatórias crônicas, obesidade e estresse fisiológico tem o papel central na propagação das vias inflamatórias responsáveis pela patogênese da aterosclerose (124).

Em face ao exposto, acredita-se que o desequilíbrio entre os fatores protetores e da inflamação leva a maior recrutamento das células imune,

acompanhado de lesão do tecido cardíaco ou vascular no órgão transplantado. Como consequência, uma incidência maior de rejeição celular, humoral, e a VAC na fase tardia do transplante.

Nesse sentido, a proposta deste trabalho foi analisar longitudinalmente a expressão dos genes protetores e inflamatórios no contexto do transplante, assim, verificar a associação dos resultados morfológicos, imuno-histoquímicos e da expressão gênica com os dados clínicos, principalmente vasculite, rejeição celular, rejeição humoral e VAC.

2 – OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de expressão gênica em tecidos de biópsias endomiocárdicas parafinados e associar com os dados clínicos de rejeição humoral e vasculopatia do aloenxerto cardíaco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Detecção dos fragmentos C3d e C4d do complemento por imuno-histoquímica nas amostras de biópsias endomiocárdicas parafinadas. A positividade dessas marcações indicará a presença de rejeição humoral.

- b) Avaliar a expressão de mRNA dos genes considerados protetores (*ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *HMOXO-1*, *BCL2L1*, *VEGF*, *TGF- β*), genes associados à inflamação (*IL-6*, *TNF α* , *IFN γ* , *NOS2*, , *AIF-1*) e os genes codificadores das moléculas de adesão (*ICAM1*, *VCAM1* e *MCP-1*) em amostras de biópsias endomiocárdicas parafinadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR).

3 – MÉTODOS

MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

O estudo foi delineado com base no trabalho anterior do nosso grupo (125) utilizando as amostras de biópsias endomiocárdicas fixadas com formol tamponado e embebidas em parafina (*formalina fixed paraffin embedded* - FFPE) obtidas no arquivo histórico do setor de anatomia patológica do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC).

Os tecidos FFPE incluídos neste estudo foram obtidos de pacientes submetidos a transplante cardíaco, e selecionados segundo os critérios de inclusão e exclusão propostos neste projeto. Para detecção de C4d e C3b por método de imuno-histoquímica, obteve-se os cortes histológicos de 4 µm de espessura utilizando micrótomo (*American Optical y Reichert*, New York, EUA) e depois fixados em lâminas de vidro silanizadas para a análise. Foram obtidos mais 20 cortes com 8 µm de espessura para extração de RNA utilizando kit FFPE RNeasy (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).

Após a quantificação e verificação da qualidade do RNA obtido do tecido de FFPE, a síntese de cDNA foi realizada com o reagente *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster, EUA).

As expressões dos genes: *HMOXO-1*, *NOS2*, *BCL2L1*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2*, *IL-6*, *TNFα*, *IFNγ*, *TGF-β*, *AIF-1*, *VEGF*, *ICAM1*, *VCAM1* e *MCP-1* foram analisadas por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) utilizando-se o termociclador em tempo real modelo RotorGene (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).

Os resultados foram analisados por métodos convencionais de análise estatística utilizando programa do Microsoft Office Excel para gerenciamento do banco de dados, e o programa *Graph Pad Prisma®* e *SPSS®* para execução dos cálculos estatísticos e a elaboração dos gráficos (Figura 2).

Figura 2. Delineamento Experimental: Os tecidos de biópsias endomiocárdicas fixados em formol e embebidos em parafina (FFPE) foram cortados no micrótomo, e os fragmentos de tecidos foram utilizados para reação de imuno-histoquímica (IHQ) e a análise de expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

3.2. Comitê de ética em pesquisa científica

Este projeto de pesquisa foi submetido à avaliação do comitê de ética em pesquisa (CEP) do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, e aprovado em reunião ordinária do dia 23 de novembro de 2010 sob o número de processo 4013 (Anexo 1).

Métodos

Devido à utilização das amostras de FFPE arquivadas que fizeram parte da rotina de monitoramento de rejeição do enxerto, e principalmente, não havendo necessidade de novas coletas de amostras biológicas, este trabalho foi dispensado da aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aos sujeitos de pesquisa pelo CEP, conforme a resolução do Conselho Nacional de Saúde número 441, de 12 de maio de 2011.

3.3. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo, o material biológico obtido de pacientes submetidos ao transplante cardíaco no IDPC no período de 10 de janeiro de 2002 a 10 de janeiro de 2009, e também a disponibilidade de biópsias endomiocárdicas em FFPE no arquivo de patologia que correspondem aos períodos de T1 (30 dias); T2 (90 dias); T3 (180 dias); T4 (360 dias) e T5 (720 dias), ou pelo menos os quatro primeiros tempos.

3.4. Critérios de exclusão

Foram excluídos material biológico de indivíduos com menos de 4 amostras sequenciais, e também aqueles que não tinham dados de evolução clínica disponíveis para a consulta ou as amostras de FFPE com tecidos insuficientes para a análise.

3.5. Casuística

Com base nos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 63 indivíduos para o presente estudo. Destes, 48 tiveram cinco amostras sequenciais completas, e 15 tiveram somente as primeiras quatro amostras. No total, 300 amostras de FFPE foram analisadas.

Foram excluídos do estudo 81 indivíduos. Destes, 56 indivíduos não tinham número de amostra suficiente, 18 faleceram antes do primeiro ano de transplante, em 3 indivíduos, as amostras estavam em condições inadequadas para a análise, 1 indivíduo recebeu novo transplante, outro teve recidiva de doença de Chagas e 2 pacientes foram monitorados por métodos não invasivos.

3.6. Esquema de imunossupressão usado nos pacientes

Os pacientes foram acompanhados pela mesma equipe médica durante o período do estudo, e todos tiveram seguimento clínico completo até a data final da pesquisa.

A imunossupressão foi iniciada antes do transplante com metilprednisolona 20mg/kg, via endovenosa, dividida em duas doses: a primeira cerca de 30 minutos antes da indução anestésica, e a segunda ao chegar à unidade de terapia intensiva.

A partir do primeiro pós-operatório, a dose de metilprednisolona foi reduzida para 10 mg/kg em dose única, e mantida dessa forma até o sétimo dia pós-operatório, quando se iniciou a redução gradual desse fármaco em 100mg por dia até a substituição desse corticóide endovenoso por

Métodos

Prednisona 1mg/kg administrado por via oral, e essa dose foi progressivamente reduzida até a dose da alta hospitalar de 0,4mg/kg.

No primeiro dia pós-operatório também foi introduzido o micofenolato de mofetil em doses entre um e dois gramas ao dia por via oral, e essa dose foi mantida até a alta hospitalar. A ciclosporina foi iniciada entre o terceiro e quarto dias pós-operatório em pacientes com creatinina plasmática $\leq$ a 1,5 mg/dl, inicialmente na dose de 1 mg/kg, aumentando progressivamente de acordo com a tolerância e a função renal do paciente, até atingir a dose alvo de 4mg/kg.

Todos os sujeitos desta pesquisa usaram esquema triplice de imunossupressão, sendo micofenolato de mofetil, ciclosporina e prednisona comum a todos. Nenhum paciente dessa população amostral usou Azatioprina.

3.7. Preparo de biópsias endomiocárdicas bloqueadas em parafina

Os blocos de tecidos de biópsias endomiocárdicas em parafina foram preparados inicialmente com o objetivo de diagnóstico e monitoramento da rejeição celular aguda. Em cada avaliação, colheu-se uma média de cinco fragmentos de tecidos provenientes de diferentes regiões septal do ventrículo direito. As amostras obtidas foram fixadas imediatamente em solução de formol a 10% tamponada (pH 7,4) e depois embebidas em parafina para formar blocos de FFPE.

3.8. Diagnóstico e classificação da vasculite

O diagnóstico da vasculite foi realizado em amostras de biópsias endomiocárdicas preparadas em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). O grau de vasculite seguiu-se a classificação definida por Cipullo e colaboradores (125) que levou em consideração as características do infiltrado inflamatório encontrada na parede dos vasos, sendo:

1. Negativo: sem sinais de vasculite.
2. Vasculites leves: infiltrado inflamatório focal, afetando parcialmente o perímetro formado pelas paredes do vaso, sem sinais de necrose vascular ou formação de trombos na luz do vaso.
3. Vasculites moderadas: infiltrado inflamatório afetando todo o perímetro formado pelas paredes do vaso, sem sinais de necrose vascular ou formação de trombos na luz do vaso.
4. Vasculites graves: infiltrado inflamatório presente na parede do vaso associado à necrose de sua parede ou formação de trombos no interior do vaso.

3.9. Detecção de C3d e C4d pela reação de Imuno-histoquímica

Imuno-histoquímica (IHQ) é um método amplamente utilizado para reconhecer a distribuição e localização de proteínas biomarcadoras expressas em diversos tecidos biológicos.

Métodos

Uma boa preparação da lâmina é essencial para obter resultados fidedignos, para isso, cortou-se 4 µm de espessura de tecidos em FFPE utilizando o micrótomo (*American Optical y Reichert*, New York, EUA), em seguida, esses cortes foram fixados em lâminas silanizadas.

A desparafinação das lâminas foi feita em estufa a 70°C por 1 hora, seguida de imersão em xilol (3 banhos de 10 minutos cada); e reidratada em concentrações decrescentes (100%, 90%, 75%) de álcool etílico.

A recuperação antigênica foi feita utilizando o tampão Trilogy® (Cell Marque, Califórnia, EUA) em panela Decloaker a 90 °C por 40 minutos (Biocare Medical, Califórnia, EUA).

Para o bloqueio da peroxidase endógena e da proteína, utilizou-se bloqueadores específicos (Erviegas EasyPath, DuraEdge, EUA). Logo depois, as lâminas foram incubadas com os seus respectivos anticorpos primários previamente titulados e diluídos em diluente universal (Erviegas EasyPath, DuraEdge, EUA). Os anticorpos primários (*Cell Marque*, Califórnia, EUA) usados para a reação foram: anticorpo policlonal de coelho anti C3d (código RUO40317001) na diluição de 1:500 e o anticorpo monoclonal de coelho anti C4d (SP 91, código RUO40431000) na diluição de 1:300.

Com o objetivo de monitorar as possíveis reações inespecíficas, o controle negativo da reação foi realizado por uma das lâminas da rotina onde se omitiu a etapa de aplicação do anticorpo primário. Por outro lado, para o controle positivo, utilizou-se um tecido renal de um indivíduo com diagnóstico confirmado de rejeição humoral.

A reação de Imunoperoxidase foi detectada utilizando Kit MACH4 Universal HRP Polymer + DAB (Biocare Medical, Califórnia, EUA). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de *Harris* (Erviegas EasyPath, DuraEdge, EUA), e a montagem feita em resina sintética Erv-Mount (Erviegas EasyPath, DuraEdge, EUA). Identificou-se a positividade da reação pelo produto colorido marrom, dado pelo cromógeno.

As lâminas marcadas para C4d e C3d foram analisadas por duas patologistas experientes no modo cego, no caso de discordância de resultados, as lâminas eram analisadas novamente e os laudos discutidos para se chegar ao consenso. A positividade da reação foi determinada de forma semi-quantitativa, seguindo o seguinte *score*: 0 (negativo); 1 (discreto e focal); 2 (moderado e focal) e 3 (intenso e difuso). Todas as lâminas foram analisadas no microscópio Leica DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), em aumento de 200X e 400X.

3.10. Obtenção de RNA de tecido embebido em parafina

Para obtenção de RNA a partir dos tecidos fixados em parafina, utilizou-se o *kit* RNeasy FFPE da QIAGEN (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) que foi desenvolvido especificamente para essa finalidade. Os procedimentos para obtenção de RNA seguiram o protocolo do fabricante, e estão descritos em seguida;

1. Por meio de um micrótomo histológico cortou-se 20 fragmentos de tecido com espessura de 8 μ m e colocou-se em tubo de Eppendorf contendo 1,0 ml de xileno para desparafinação.

Métodos

2. Os tubos foram centrifugados a 20.000 x g por 1 minuto à 25°C e o sobrenadante foi cuidadosamente removido para não desfazer o botão de tecido no fundo dos tubos.
3. Adicionou-se 1 ml de xilol e repetiu-se o procedimento do item 2.
4. Pipetou-se 1 ml de etanol (96-100%) nos tubos contendo pellet de tecido, misturado por Vortex, centrifugando à 20.000 x g por 2 minutos à 25°C e todo o etanol foi removido.
5. Os tubos foram colocados com as tampas abertas em um dessecador (Eppendorf) por 3 minutos para evaporar totalmente resíduos de etanol nos tecidos.
6. Adicionou-se 240 µL de tampão PKD e 10 µL de proteinase K aos tubos e homogeneizou por Vortex. Os tubos foram incubados a 56 °C por 15 minutos seguida de incubação de 80 °C por 15 minutos.
7. Os tubos foram resfriados rapidamente em banho de gelo por 2 minutos, seguido de centrifugação de 20.000 x g à 25°C por 15 minutos.
8. Adicionou-se 500µL de Tampão RBC nos tubos, homogeneizados por pipetagem e todo o volume foi transferido para tubo de 2 ml contendo coluna gDNA para eliminar DNA.
9. Nos tubos contendo o filtrado, adicionou-se 1200 µL de etanol 100% que foi homogeneizado imediatamente por pipetagem.
10. Transferiu-se 600 µL da amostra para a coluna (RNeasy MinElute Spin column) colocada em um tubo coletor de 2 mL. As tampas foram

fechadas com cuidado e os tubos centrifugados à 20.000 x g, à 25°C por 1 minuto. Após a centrifugação, desprezou-se o filtrado.

11. O procedimento do item 10 foi repetido mais duas vezes até terminar toda a solução.
12. Adicionou-se 500 uL de tampão RPE na coluna (RNeasy MinElute Spin column) e centrifugou-se à 20.000 x g, à 25°C por 1 minuto.
13. Adicionou-se mais 500 uL de tampão RPE na coluna (RNeasy MinElute Spin column) e centrifugou-se à 20.000 x g, à 25°C por 5 minutos.
14. A coluna (RNeasy MinElute Spin column) foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL. Os tubos contendo as colunas foram centrifugados com a tampa aberta a 20.000 x g a 25°C por 5 minutos para a coluna secar totalmente.
15. A coluna (RNeasy MinElute Spin column) foi transferida para um tubo coletor de 1,5 mL. Adicionou-se 24 uL de água livre de RNase diretamente na camada de sílica da coluna. As tampas foram fechadas com cuidado e centrifugada a 20.000 x g, à 25°C por 1 minuto.
16. As amostras de RNA foram quantificadas por espectrometria de fluorescência no aparelho Qubit (Life Applied, CA, EUA) e guardadas rapidamente no freezer a -80 °C até o momento do experimento.

3.11. Análise da integridade de RNA obtido do FFPE

Após a obtenção das amostras de RNA, analisou-se a integridade no sistema de eletroforese capilar utilizando o equipamento *Tape Station 2200* (Agilent Technologies, Inc. UK) e reagente *R6K Screen Tape* (Agilent Technologies, Inc. UK). Observou-se que os mRNAs obtidos sofreram fragmentação durante o processo de conservação e recuperação. O tamanho do fragmento variou entre 100 a 200 nucleotídeos (Figura 3).

Figura 3. Exemplo da análise da integridade de RNA extraído da amostra de biópsia bloqueada em parafina. Utilizou-se equipamento *Tape Station 2200* (Agilent Technologies, Inc. UK) e reagentes *R6K Screen Tape* (Agilent Technologies, Inc. UK). A primeira coluna (A0) corresponde ao marcador de massa molecular. A coluna (H1) e o gráfico representam a corrida eletroforética da amostra e número de integridade de RNA (RNA integrity number -RIN).

3.12. Síntese de cDNA

Após a quantificação e constatação da qualidade do RNA, foi realizada transcrição reversa utilizando 200 ng de RNA de cada amostra. O reagente empregado foi *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Applied

Biosystems, Foster City, EUA) que contém os iniciadores aleatórios (*random primers*), dNTPs, transcriptase reversa e tampão da enzima. A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler Personal* para 25 tubos de 200 µl (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), obedecendo aos seguintes ciclos de temperatura e tempo: 25° C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min.

As amostras de cDNA obtidas foram armazenadas a -20°C até a utilização.

3.13. Determinação do volume ideal de cDNA para qPCR

Com o objetivo de determinar o volume ideal de cDNA a ser utilizado na reação de qPCR, preparou-se inicialmente um “pool” com 10 amostras de cDNA escolhidas aleatoriamente entre a população amostral. Depois, a expressão de mRNA dos genes PPIA, INFg e ADIPOR1 foram avaliadas por qPCR utilizando volumes crescentes de cDNA: 0,5; 1, 2, 4 e 8 µl, conforme a figura 4.

Os resultados permitiram escolher com segurança, o volume de 2 µl de cDNA como ideal para ser utilizado na reação de qPCR, a fim de avaliar as expressões de mRNA dos genes escolhidos para este estudo.

Métodos

Figura 4: Determinação do volume ideal de cDNA para RT-PCR. Análise de expressão dos genes PPIA, INFg e ADIPOR1 em volumes crescentes de cDNA para determinar o volume ideal para a reação de qPCR em tempo real. Concluiu-se que o volume ideal é de 2 µL.

3.14. Escolha do gene de referência para reação de qPCR

O gene de referência, também denominado de gene endógeno ou gene “house keeping” é usado como controle interno da reação em cadeia pela polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). A normalização da expressão de um gene alvo por meio de um gene de referência permite minimizar as variações causadas por degradação de RNA, presença de inibidores na amostra de RNA, deficiências na transcrição reversa ou na recuperação de ácido nucléico, além de possíveis erros de manipulação do ensaio.

Para a escolha do gene endógeno utilizou-se uma placa comercial contendo 32 genes endógenos mais utilizados em amostras biológicas humanas (TaqMan array 96 well fast plate – Applied Biosystems, Foster, EUA). Os 32 genes avaliados com os respectivos ciclos de *threshold* (CT) em duas amostras de tecidos em parafina (FFPE) e uma amostra de sangue total estão na figura 5.

O número e a sigla dos genes testados são: 1-*GAPDH*; 2-*HPRT1*; 3-*GUSB*; 4-*ACTB*; 5-*B₂M*; 6-*HMBS*; 7-*IPO8*; 8-*PGK1*; 9-*RPLP0*; 10-*TBP*; 11-*TFRC*; 12- *UBC*; 13-*YWHAZ*; 14-*PPIA*; 15-*POLR2A*; 16-*CASC3*; 17-*CDKN1A*; 18-*CDKN1B*; 19-*GADD45A*; 20-*PUM1*; 21-*PSMC4*; 22-*EIF2B1*; 23-*PES1*; 24-*ABL1*; 25-*ELF1*; 26-*MT-ATP6*; 27-*MRPL19*; 28-*POP4*; 29-*RPL37A*; 30-*RPL30*; 31-*RPS17*.

	FFPE				FFPE				Sangue Total			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MC Ct. 22,95	1 Ct. 32,45	2 Ct. Undetermi.	3 Ct. 37,49	MC Ct. 22,87	1 Ct. 31,95	2 Ct. Undetermi.	3 Ct. 37,21	MC Ct. 8,61	1 Ct. 20,98	2 Ct. 27,97	3 Ct. 26,3
B	4 Ct. 36,86	5 Ct. 28,85	6 Ct. 36,98	7 Ct. 35,88	4 Ct. 38,27	5 Ct. 28,97	6 Ct. 37,07	7 Ct. 36,98	4 Ct. 16,92	5 Ct. 17,6	6 Ct. 29,72	7 Ct. 28,5
C	8 Ct. 33,69	9 Ct. 32,94	10 Ct. Undetermi.	11 Ct. 35,94	8 Ct. 32,95	9 Ct. 32,86	10 Ct. Undetermi.	11 Ct. 35,56	8 Ct. 23,94	9 Ct. 21,94	10 Ct. 28,93	11 Ct. 28,54
D	12 Ct. 31,96	13 Ct. Undetermi.	14 Ct. 31,97	15 Ct. 35,08	12 Ct. 32,45	13 Ct. Undetermi.	14 Ct. 31,57	15 Ct. 35,54	12 Ct. 23,09	13 Ct. 27,01	14 Ct. 20,7	15 Ct. 28,96
E	16 Ct. 34,99	17 Ct. 35,73	18 Ct. 36,15	19 Ct. 37,03	16 Ct. 34,22	17 Ct. 35,76	18 Ct. 36,88	19 Ct. 38,22	16 Ct. 25,69	17 Ct. 28,98	18 Ct. 25,38	19 Ct. 28,66
F	20 Ct. 35,85	21 Ct. 35,84	22 Ct. 36,92	23 Ct. 35,87	20 Ct. 35,95	21 Ct. 35,88	22 Ct. 35,9	23 Ct. 35,96	20 Ct. 26,31	21 Ct. 26,94	22 Ct. 27,75	23 Ct. 28,15
G	24 Ct. 35,97	25 Ct. 35,84	26 Ct. 28,99	27 Ct. 34,93	24 Ct. 35,29	25 Ct. 36,04	26 Ct. 28,96	27 Ct. 35,48	24 Ct. 28,56	25 Ct. 23,66	26 Ct. 21,66	27 Ct. 28,69
H	28 Ct. 35,61	29 Ct. 32,38	30 Ct. 36,2	31 Ct. 34,14	28 Ct. 35,33	29 Ct. 31,81	30 Ct. 36,97	31 Ct. 35,99	28 Ct. 27,95	29 Ct. 21,95	30 Ct. 27,06	31 Ct. 23,91

Figura 5.: Escolha do gene de referência para qPCR. Análise da expressão de mRNA de 32 genes endógenos em duas amostras de tecidos de biópsias parafinadas (FFPE) e uma amostra de sangue total utilizando placa TaqMan array (Applied Biosystems, Foster, EUA).

Entre os genes avaliados, foram selecionados 6 genes (*GAPDH*, *ACTB*, *B₂M*, *UBC*, *MT-ATP6* e *PPIA*) com base no menor número de ciclos que cruzam um limiar de detecção da fluorescência (CT - *threshold cycle*) e a importância funcional desses genes no tecido do miocárdio. Após a seleção, avaliou-se a expressão destes seis genes em 10 amostras distintas de cDNA transcritos a partir de RNA extraído dos tecidos de FFPE. Os resultados da expressão foram analisados no programa geNorm (Primer

Métodos

Design, CO, UK), e foram identificados os genes *B2M* (Beta₂ microglobulina) e *PPIA* (ciclofilina) como genes mais estáveis, ou seja, com menor variação entre as amostras testadas (Figura 6). Escolheu-se o gene *B₂M* como gene de referência deste trabalho, porque no contexto do transplante, a expressão do gene *PPIA* poderia ser influenciada pelos medicamentos da terapia imunossupressora utilizado pelos pacientes transplantados.

Figura 6: Seleção do gene de referência utilizando o programa geNorm (PrimerDesign, CO, UK) que baseia-se na análise comparativa das expressão dos genes *GAPDH*, *ACTB*, *B2M*, *UBC*, *MT-ATP6* e *PPIA* em 10 amostras de biópsias endomiocárdicas em parafina. Os genes *B₂M* e *PPIA* foram identificados como mais estáveis.

3.15. Análise da expressão gênica por qPCR

Avaliou-se a expressão de mRNA dos genes selecionados por reação em cadeia pela polimerase quantitativa em tempo real (*real time- polymerase chain reaction* ou qPCR) utilizando reagentes *Multiplex PCR kit Fast* (400 reações x 25 µl) para *Rotor-Gene* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha). Essa tecnologia consiste na detecção do produto de amplificação por meio de uma sonda fluorescente específica para a sequência alvo flanqueada por um par de iniciadores. A sonda utilizada no sistema é um oligonucleotídeo marcado com fluorocromo repórter (fluorescente) e um *quencher* (que absorve o sinal fluorescente gerado pelo repórter). Quando o primer hibridiza na região 5', a sonda também o faz no meio da sequência, à medida em que a Taq polimerase avança sintetizando a fita nova, ela vai degradando a sonda à sua frente, liberando o repórter da sonda, permitindo que absorva energia e emita luz.

O equipamento utilizado para a reação de qPCR foi RotorGene® (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) cujo princípio de funcionamento baseia-se na emissão de feixe de laser que excita o fluorocromo da sonda, gerando assim, sinais de amplificação. Os sinais são captados pelo aparelho e processados no programa de *software* fornecido pelo próprio fabricante do equipamento.

Os iniciadores ou *primers* que são essenciais para a reação de qPCR foram adquiridos da Applied TaqMan® (*Life Technologies*, CA, EUA). As especificações desses reagentes encontram-se na tabela 1.

Métodos

O protocolo utilizado para qPCR foi constituído das seguintes etapas:

- 1- Tempo de incubação de 10 minutos a 95°C para ativação da enzima *Hot Star Taq*, também para outros reagentes atingirem a temperatura ideal da reação.
- 2- 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, que corresponde à fase de desnaturação, seguido de 15 segundos a 60°C que corresponde à fase de hibridização e extensão.
- 3- Os sinais de fluorescência foram detectados nos filtros verde (FAM) e amarelo (VIC) no equipamento Rotor-Gene (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).
- 4- Foi determinada uma linha de corte na região logarítmica da curva, e o número de ciclos onde essa linha se cruza corresponde ao CT (*cycle threshold*). O valor de CT é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra.

Os critérios de validação interna das RT-PCR foram: **(i)** presença de controles brancos adequados, sem amplificação, **(ii)** curva de amplificação com padrão exponencial e com platô, com o seu início de aumento antes do CT de 30, **(iii)** ocorrência de amplificação do gene de interesse com CT até 40, **(iv)** desvio padrão dos CT das duplicatas menor que 0,30. **(iv)** As eficiências das reações do gene de referência e do gene alvo devem ser semelhantes. Caso não atendessem a qualquer dos itens dos critérios de validação, os ensaios eram refeitos.

A quantificação relativa (QR) de cada amostra de mRNA foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (126). Para isso, usou-se o gene de referência *B₂M*

(Beta 2 microglobulina) na normalização do cálculo de ΔCT ($CT_{\text{gene alvo}} - CT_{B2M}$), e sete amostras de RNA do tecido cardíaco do doador foi usado como calibrador, ou seja, $2^{(\text{média do calibrador}) - (CT_{\text{gene alvo}} - CT_{B2M})}$. Considerou-se maior ou menor expressão todo o valor de QR >2 ou QR <0,5, respectivamente.

Tabela 1: As especificações dos iniciadores (*primers*) usados para reação de qPCR. A relação dos genes e os respectivos códigos de especificações dos reagentes da Applied TaqMan® utilizados para a análise de expressão gênica.

Genes	Identificação	Número do catálogo	Referência da sequência	Tamanho do amplicon
IL6	Hs00985639_m1	4453320	NM_000600.3	66
TNF	Hs00174128_m1	4453320	NM_000594.2	80
IFNG	Hs00989291_m1	4453320	NM_000619.2	73
TGFB1	Hs00998133_m1	4453320	NM_000660.4	57
VEGFA	Hs00900055_m1	4453320	NM_001171622.1	59
AIF1	Hs00610419_g1	4453320	NM_004847.3	92
ICAM1	Hs00164932_m1	4453320	NM_000201.2	87
VCAM1	Hs01003372_m1	4453320	NM_001199834.1	62
CCL2 (MCP-1)	Hs00234140_m1	4331182	NM_002982.3	99
HMOX1	Hs01110250_m1	4453320	NM_002133.2	82
BCL2L1	Hs00236329_m1	4453320	NM_138578.1	65
NOS2	Hs01075529_m1	4453320	NM_000625.4	67
ADIPOR1	Hs01114951_m1	4453320	NM_015999.3	84
ADIPOR2	Hs00226105_m1	4453320	NM_024551.2	60
B2M	Hs00984230_m1	4331182	NM_004048.2	81

* O número do catálogo, referência da sequência dos pares de iniciadores, sondas e o tamanho do amplicon foram obtidos no site da Applied Biosystems (Foster, CA, EUA). <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html>.

3.16. Análise estatística

Para gerenciamento do banco de dados foi utilizado o programa Excel da *Microsoft Office*, e para execução dos cálculos estatísticos e a elaboração dos gráficos foram utilizados os programas *Graph Pad Prism* (*California Corporation, CA, EUA*) e *IBM SPSS Statistics for Windows*, versão 20 (*IBM Corporation, Armonk, NY, EUA*). As variáveis categóricas foram apresentadas como números absolutos e relativos, e as variáveis contínuas apresentadas como média e desvio-padrão ou mediana e valores máximos e mínimos, conforme a normalidade da distribuição da amostra avaliada pelo teste *Kolmogorov-Smirnov*.

As variáveis contínuas dependentes com distribuição normal foram analisadas pelo teste T pareado, e as amostras que não tinham distribuição normal foram analisadas pelo teste não paramétrico de Friedman.

Para as variáveis contínuas independentes com distribuição normal, a análise foi feita por teste *t de Student*, e as variáveis sem distribuição normal foram analisadas por método não paramétrico de *Mann Whitney* ou *Kruskal Wallis* dependendo do número de grupos a ser analisado.

As correlações entre as expressões dos genes foram analisadas pelo teste de correlação de Spearman.

Analisou-se o comportamento da expressão gênica ao longo do tempo entre os grupos: com e sem VAC que receberam não pulsoterapia imunossupressora utilizando o método estatístico de variância não paramétrica de dados ordinais com medidas repetidas (ANOVA np). Esse

método calcula a significância efetiva relativa e transforma os dados em uma medida adimensional de zero a um para fazer a análise comparativa (127). Mais informações sobre o método de ANOVA np encontra-se no site <http://www.ime.usp.br/~jmsinger/> .

Em todas as análises, o nível de significância considerado foi de 5%.

4- RESULTADOS

Resultados

4.1. Dados demográficos e clínicos da população de estudo

Do total de 144 pacientes submetidos ao transplante cardíaco no período de 10 de janeiro de 2002 a 10 de janeiro de 2009, 63 indivíduos foram incluídos no presente estudo. Destes, 16 (25,4%) eram do sexo feminino e 47 (74,6%) do sexo masculino. A média de idade do grupo no momento do transplante foi de 48 anos, sendo o mais novo foi transplantado com 16 anos e o mais velho com 65 anos.

Em relação à doença base da população de estudo, as frequências observadas em diversas formas de miocardiopatia foram: dilatada idiopática 27 (43%); isquêmica 20 (32%); chagásica 13 (21%) e valvar 3 (5%).

O teste de painel linfocitário realizado antes do transplante que avaliou a resposta imunológica do receptor dirigida ao doador, permitiu identificar 3 indivíduos com leve reatividade contra MHC classe I (3%, 6% e 12%), e somente um indivíduo apresentou 17% de reatividade contra a molécula MHC classe II.

O esquema de imunossupressão tríplice; ciclosporina, micofenolato de mofetil e prednisona foi administrado em 55 pacientes (87,3%), e sirolimus, micofenolato mofetil e prednisona em 7 pacientes (11,1%), e apenas em 1 paciente (1,6%), a imunossupressão foi composta por tacrolimus, micofenolato mofetil e prednisona.

Dos 81 indivíduos excluídos, 63 foram excluídos devido ao número insuficiente de amostras inerente ao pouco tempo do transplante ou amostras inadequadas para realização do teste (baixo rendimento ou qualidade ruim de RNA). Outros 18 indivíduos que faleceram precocemente

(antes de um ano de transplante), 3 foram por causa da doença vascular do enxerto, 3 por septicemia, 2 por rejeição celular aguda, 7 indivíduos tiveram morte súbita sem causa determinada, e um indivíduo para cada doença seguinte: insuficiência renal, tuberculose e insuficiência cardíaca dilatada.

4.2. Variação do tempo de transplante entre as amostras

O tempo de transplante foi calculado em quantidade de dias depois do transplante, e as amostras de biópsias endomiocárdicas em parafina foram classificadas em cinco períodos: T1 (30 dias); T2 (90 dias); T3 (180 dias); T4 (360 dias) e T5 (720 dias).

Observou-se que houve pouca variação entre as amostras do mesmo período (Figura 7). A mediana e os respectivos percentis 25 e 75 do T1 foram: 29 dias (23 e 36 dias). No T2, 93 dias (87 e 101 dias). No T3, 181 dias (169 e 191 dias). No T4, 365 dias (337 e 387 dias) e no T5, 729 dias (715 e 808 dias).

Resultados

Figura 7: Distribuição das amostras de biópsias endomiocárdicas de 63 indivíduos transplantados ($n = 300$) segundo o tempo de transplante: T1 (30 dias), T2 (90 dias), T3 (180 dias), T4 (360 dias) e T5 (720 dias).

4.3. Variabilidade da expressão gênica ao longo do tempo

Com o objetivo de verificar a variabilidade da expressão gênica (mRNA) em função do tempo no contexto do transplante cardíaco. As expressões relativas de 14 genes: *AIF-1*, *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1*, *HMOXO-1*, *IL-6*, *NOS2*, *ICAM*, *VCAM*, *INF γ* , *MCP1*, *TGF β* , *TNF α* e *VEGF*, em cinco tempos sequenciais: T1 (30 dias); T2 (90 dias); T3 (180 dias); T4 (360 dias) e T5 (720 dias) foram analisados pelo método estatístico de Friedman para dados contínuos emparelhados, considerou o nível de significância de 5%. Os resultados da análise, contendo os valores da mediana, percentil 25 e 75 de cada gene em cinco diferentes períodos de transplante, assim como nível descritivo (valor de p), que permite aceitar ou rejeitar a hipótese nula, estão na tabela 2.

A variabilidade da expressão gênica em relação ao tempo foi estatisticamente significativa em 4 genes (*AIF*, *HMOXO1*, *MCP1* e *TGF β*),

onde se observou uma diminuição gradativa da expressão relativa ao longo do tempo, chegando a níveis significantes ($p < 0,001$) no segundo ano de pós transplante (T5).

É interessante observar que além da diferença significativa entre as expressões do gene *MCP1* em cinco diferentes tempos de transplante, a maioria dos indivíduos transplantados teve menor expressão do gene *MCP1* em relação aos doadores saudáveis desde o primeiro tempo de transplante, e persistiram em outros quatro tempos mais tardios (Figura 8-l).

A maioria dos indivíduos transplantados teve as expressões relativas do gene *TGFβ* semelhante aos dos doadores saudáveis em todos os cinco tempos de transplante (Figura 8-m).

A variabilidade da expressão gênica entre os indivíduos foi maior em cinco genes (36%), *AIF*, *IL-6*, *NOS₂*, *INFγ* e *TNF*. Na maioria dos genes (9/14 ou 64%) a dispersão das amostras foi menor, isto significa que os indivíduos transplantados tiveram níveis semelhantes de expressão desses genes (Figura 8).

Resultados

Tabela 2: As expressões relativas dos genes: *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *AIF-1*, *IL-6*, *VEGF*, *ICAM*, *VCAM*, *MCP1*, *BCL2L1*, *HMOXO-1*, *NOS2*, *TNF α* , *INF γ* e *TGF β* em cinco tempos sequenciais: T1 (30 dias); T2 (90 dias); T3 (180 dias); T4 (360 dias) e T5 (720 dias) foram avaliadas por método estatístico de Friedman para dados contínuos emparelhados ($\alpha = 0,05$).

Período	VEGF Mediana (per 25; per 75)	ICAM1 Mediana (per 25; per 75)	VCAM1 Mediana (per 25; per 75)	MCP1 Mediana (per 25; per 75)
T1	0,35 (0,24; 0,48)	1,19 (0,80; 1,85)	2,50 (1,82; 3,53)	0,26 (0,13; 0,39)
T2	0,36 (0,25; 0,51)	1,17 (0,82; 1,47)	2,45 (1,80; 3,05)	0,26 (0,19; 0,37)
T3	0,43 (0,29; 0,60)	1,13 (0,76; 1,68)	2,50 (1,83; 3,01)	0,22 (0,13; 0,32)
T4	0,39 (0,28; 0,55)	1,08 (0,77; 1,61)	2,22 (1,58; 2,85)	0,20 (0,12; 0,28)
T5	0,35 (0,22; 0,48)	0,96 (0,65; 1,41)	2,07 (1,55; 2,75)	0,14 (0,10; 0,23)
$\alpha = 0,05$	$p = 0,124$	$p = 0,510$	$p = 0,201$	$p < 0,001$

Período	ADIPOR1 Mediana (per 25; per 75)	ADIPOR2 Mediana (per 25; per 75)	AIF-1 Mediana (per 25; per 75)	IL-6 Mediana (per 25; per 75)
T1	0,33 (0,21; 0,47)	0,50 (0,17; 1,00)	1,21 (0,64; 3,16)	0,32 (0,13; 0,90)
T2	0,38 (0,24; 0,55)	0,50 (0,21; 1,00)	1,16 (0,53; 2,06)	0,26 (0,11; 0,84)
T3	0,44 (0,29; 0,66)	0,51 (0,25; 1,00)	0,91 (0,32; 1,88)	0,28 (0,06; 1,61)
T4	0,42 (0,27; 0,66)	1,00 (0,25; 1,00)	0,79 (0,33; 1,42)	0,28 (0,09; 1,46)
T5	0,38 (0,24; 0,53)	0,50 (0,16; 1,00)	0,52 (0,26; 1,34)	0,26 (0,08; 1,24)
$\alpha = 0,05$	$p = 0,052$	$p = 0,825$	$p < 0,001$	$p = 0,475$

Período	BCL2L1 Mediana (per 25; per 75)	HMOXO-1 Mediana (per 25; per 75)	NOS2 Mediana (per 25; per 75)
T1	0,39 (0,24; 0,60)	1,65 (0,76; 3,48)	0,84 (0,18; 2,27)
T2	0,46 (0,24; 0,78)	0,89 (0,62; 1,62)	1,59 (0,56; 3,63)
T3	0,49 (0,29; 0,73)	0,80 (0,44; 1,40)	1,96 (0,28; 6,59)
T4	0,41 (0,29; 0,77)	0,74 (0,44; 1,38)	1,19 (0,20; 2,53)
T5	0,36 (0,28; 0,69)	0,62 (0,39; 1,07)	1,22 (0,39; 3,41)
$\alpha = 0,05$	$p = 0,266$	$p < 0,001$	$p = 0,125$

Período	TNF α Mediana (per 25; per 75)	INF γ Mediana (per 25; per 75)	TGF β Mediana (per 25; per 75)
T1	0,34 (0,02; 0,79)	0,41 (0,19; 2,20)	0,66 (0,55; 0,90)
T2	0,51 (0,11; 1,23)	0,52 (0,19; 1,73)	0,66 (0,57; 0,74)
T3	0,38 (0,01; 1,15)	0,38 (0,18; 2,33)	0,64 (0,52; 0,81)
T4	0,42 (0,04; 0,81)	0,48 (0,20; 2,55)	0,62 (0,53; 0,71)
T5	0,32 (0,01; 1,14)	0,59 (0,28; 2,45)	0,53 (0,42; 0,71)
$\alpha = 0,05$	$p = 0,259$	$p = 0,480$	$p < 0,001$

A continuação da figura 8 segue na página seguinte.

Resultados

Figura 8: Variabilidade da expressão gênica ao longo do tempo. As expressões de mRNA dos genes: *AIF-1* (a), *ADIPOR1* (b), *ADIPOR2* (c), *BCL2L1* (d), *HMOXO-1* (e), *IL-6* (f), *NOS2* (g), *ICAM* (h), *VCAM* (i), *INF γ* (j), *MCP1* (l), *TGF β* (m), *TNF α* (n) e *VEGF* (o) foram analisadas pelo sistema de qPCR em tempo real. Os resultados obtidos foram normalizados com a expressão do gene de referência (*B₂M*), e depois calculados pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando a expressão de mRNA do tecido cardíaco do doador como calibrador para calcular a expressão relativa de cada amostra. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo, e as linhas pontilhadas indicam a faixa (<2 e >0,5) onde a expressão relativa da amostra é semelhante ao do calibrador.

4.4. Frequência de indivíduos segundo os níveis de expressão gênica

Classificou-se a população de estudo com base no tempo de transplante e níveis de expressão relativa em: aumento, equivalente e diminuição. A distribuição da frequência em número de indivíduos e porcentagem estão no apêndice 1.

Os indivíduos com aumento de expressão relativa foram identificados em nove genes (*AIF1*, *HMOXO-1*, *IL-6*, *NOS₂*, *ICAM*, *VCAM*, *INF γ* , *TGF β* e *TNF α*). Destes, chamou a atenção o gene *VCAM* devido à proporção significativa de indivíduos com aumento de expressão relativa em todos os cinco períodos de observação (Figura 8), ou seja, no período T1; 41 indivíduos (65%), T2; 42 indivíduos (67%), T3; 44 indivíduos (70%), T4; 37 indivíduos (59%) e T5; 26 indivíduos (54%).

Destacou-se também o gene *NOS₂* pelo maior número de indivíduos com expressão aumentada, as proporções foram: 17 indivíduos (27%) do primeiro período (T1); 25 indivíduos (40%) do T2; 31 indivíduos (49%) do T3; 24 indivíduos (38%) do T4 e 19 indivíduos (40%) do T5.

Por outro lado, a diminuição da expressão gênica em relação aos tecidos cardíacos antes do transplante foi observada nos genes: *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1*, *IL-6*, *INF γ* , *MCP1*, *TNF* e *VEGF* em mais de 50% dos indivíduos transplantados.

Em relação à expressão dos genes *AIF*, *HMOXO1*, *ICAM* e *TGF β* , uma grande maioria dos indivíduos (superior a 50%) teve a expressão relativa em níveis equivalentes aos tecidos cardíacos antes do transplante (Figura 9).

Resultados

Continuação da figura 9 segue na página seguinte.

Figura 9: As frequências de indivíduos transplantados segundo a intensidade de expressão gênica avaliada por qPCR em tempo real de 14 genes (*AIF-1*, *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1*, *HMOXO-1*, *IL-6*, *NOS2*, *ICAM*, *VCAM*, *INFγ*, *MCP1*, *TGFβ*, *TNFα* e *VEGF*) em 5 períodos de pós transplante: (a) T1 (30 dias); (b) T2 (90 dias); (c) T3 (180 dias); (d) T4 (360 dias) e (e) T5 (720 dias).

4.5. Frequência de positividade para C3d e C4d

A reação de imuno-histoquímica baseia-se no reconhecimento do antígeno pelo anticorpo específico conjugado a uma enzima (peroxidase), cuja função é catalisar a reação química que resulta em uma coloração marrom visível ao microscópio.

Resultados

No presente trabalho, utilizou-se o tecido de biópsia renal de um paciente com rejeição humoral como controle positivo da reação de imunohistoquímica. Observou-se uma forte marcação para C4d na região do mesângio glomerular (Figura 10-A) e para o controle negativo usou-se o mesmo tecido, no entanto, sem adição do anticorpo primário na reação (Figura 10-B). No tecido de biópsia endomiocárdica de um dos pacientes deste estudo foi detectada a presença de C4d na luz da arteríola (Figura 10-C) e o controle negativo do mesmo paciente (Figura-10 D).

Figura 10. Imagens dos resultados da reação de Imuno-histoquímica: (A) tecido de biópsia renal com rejeição humoral foi usado como controle positivo da reação, a seta mostra a positividade para C4d no mesângio glomerular e (B) o seu controle negativo. (C) o tecido de biópsia endomiocárdica de indivíduo transplantado cardíaco foi detectado C4d na luz da arteríola como mostra a seta e (D) o controle negativo correspondente.

Na análise da frequência, observou-se que 25 indivíduos (39,7%) foram positivos para o fragmento C3d do complemento, destes, três

indivíduos (4,8%) tiveram marcação moderada e focal (grau 2), e 22 indivíduos (34,9%) tiveram marcação discreta e focal (grau 1). A maioria da população, ou seja, 38 indivíduos (60,3%) foram negativos (grau 0) para C3d (Quadro 1).

Entre os 25 indivíduos positivos para C3d, a grande maioria de 20 indivíduos também teve positividade para C4d, exceto cinco indivíduos (nº 33, 44, 46, 54 e 58) que tiveram somente marcação discreta e focal (grau 1) para C3d.

Na pesquisa da presença do fragmento C4d do complemento, identificou-se 42 indivíduos (66,7%) positivos, destes 18 (28,6%) tiveram marcação moderada e focal (grau 2) e/ou marcação intensa e difusa (grau 3), outros 24 indivíduos (38,1%) tiveram somente marcação discreta e focal (grau 1) e 21 (33,3%) foram totalmente negativos (grau 0).

Devido ao reduzido número de indivíduos com grau moderada de positividade para C3d (somente 3), na análise comparativa entre os dados da expressão gênica e rejeição humoral foram considerados apenas o C4d como diagnóstica de rejeição humoral (Quadro 1).

Resultados

Quadro 1: Resultados da análise de C3d e C4d de 63 indivíduos transplantados cardíacos distribuídos segundo o tempo de transplante: T1 (30 dias); T2 (90 dias); T3 (180 dias); T4 (360 dias) e T5 (720 dias) e a intensidade da reação: quadrados brancos (grau 0 = negativa); azuis (grau 1 = discreta e focal); amarelos (grau 2 = moderada e focal); vermelhos (grau 3 = intensa e difusa).

C3d						C4d					
	T1	T2	T3	T4	T5		T1	T2	T3	T4	T5
1						1					
2						2					
3						3					
4						4					
5						5					
6						6					
7						7					
8						8					
9						9					
10						10					
11						11					
12						12					
13						13					
14						14					
15						15					
16						16					
17						17					
18						18					
19						19					
20						20					
21						21					
22						22					
23						23					
24						24					
25						25					
26						26					
27						27					
28						28					
29						29					
30						30					
31						31					
32						32					
33						33					
34						34					
35						35					
36						36					
37						37					
38						38					
39						39					
40						40					
41						41					
42						42					
43						43					
44						44					
45						45					
46						46					
47						47					
48						48					
49						49					
50						50					
51						51					
52						52					
53						53					
54						54					
55						55					
56						56					
57						57					
58						58					
59						59					
60						60					
61						61					
62						62					
63						63					

4.6. Análise comparativa: expressão gênica e C4d do complemento

A presença de C4d foi usada como diagnóstico de rejeição humoral, e de acordo com a intensidade da marcação e a quantidade de vasos acometidos, a classificação adotada foi o seguinte: grau 0 (negativa), grau 1 (discreta e focal), grau 2 (moderada e focal) e grau 3 (intensa e difusa).

Para a análise estatística, definiu-se como grupo sem rejeição humoral, os indivíduos com grau 0 ou 1, e o grupo com rejeição, aqueles com grau 2 ou 3. As frequências de indivíduos em cada grupo estão na tabela 3. É notável a diminuição do número de indivíduos com rejeição humoral moderada e intensa ao longo do tempo, chegando a aproximadamente 7% no segundo ano de transplante.

Os valores de expressão relativa representados em mediana, percentil 25 e 75 dos grupos com e sem rejeição humoral, assim como os níveis críticos (valor de p) em cinco tempos de transplante estão descritos na tabela 4.

Tabela 3. Distribuição das frequências dos indivíduos transplantados segundo o tempo de transplante: T1 (30 dias); T2 (90 dias); T3 (180 dias); T4 (360 dias) e T5 (720 dias) e grau de rejeição baseada na detecção de C4d por imuno-histoquímica: sem rejeição humoral (grau 0 e 1) e com rejeição humoral (grau 2 e 3).

Tempo de Transplante	Rejeição Humoral (C4d)	
	Número de indivíduos	
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)
T1 (30 dias)	53 (84,1%)	10 (15,9%)
T2 (90 dias)	55 (87,3%)	8 (12,7%)
T3 (180 dias)	58 (92,1%)	5 (7,9%)
T4 (360 dias)	59 (93,7%)	4 (7,3%)
T5 (720 dias)	45 (93,7%)	3 (7,3%)

Resultados

Tabela 4. Análise comparativa entre a expressão gênica e presença de C4d. A expressão dos genes *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1*, *HMOXO1*, *IL-6*, *NOS₂*, *VCAM*, *ICAM*, *TGF β* e *VEGF* entre os grupos de indivíduos com e sem rejeição humoral, a classificação seguiu os critérios da *ISHLT*. A comparação foi feita separando a população amostral por rejeição e período de transplante. O método estatístico utilizado foi teste de Mann-Whitney U ($\alpha = 0,05$).

ADIPOR1	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	1,00 (0,22; 1,00)	0,12 (0,11; 0,25)	P < 0,001
T2	1,00 (0,23; 1,00)	0,23 (0,16; 0,25)	P = 0,009
T3	1,00 (0,28; 1,00)	0,25 (0,11; 0,25)	P = 0,011
T4	1,00 (0,31; 1,00)	0,19 (0,06; 0,29)	P = 0,011
T5	0,50 (0,16; 1,00)	0,16 (0,13; ---)	P = 0,229

ADIPOR2	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	0,33 (0,21; 0,49)	0,30 (0,19; 0,47)	P = 0,592
T2	0,40 (0,26; 0,58)	0,30 (0,19; 0,42)	P = 0,081
T3	0,46 (0,31; 0,66)	0,23 (0,12; 0,41)	P = 0,043
T4	0,42 (0,29; 0,65)	0,30 (0,06; 0,76)	P = 0,359
T5	0,38 (0,24; 0,53)	0,30 (0,25; ---)	P = 0,599

AIF-1	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	1,16 (0,60; 3,02)	1,65 (0,89; 3,39)	P = 0,211
T2	1,21 (0,56; 2,16)	0,68 (0,47; 1,37)	P = 0,134
T3	0,92 (0,32; 1,86)	0,40 (0,32; 3,12)	P = 0,873
T4	0,82 (0,33; 1,89)	0,51 (0,36; 0,75)	P = 0,345
T5	0,54 (0,26; 1,35)	0,44 (0,05; ---)	P = 0,302

BCL2L1	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	0,42 (0,26; 0,60)	0,35 (0,17; 0,68)	P = 0,566
T2	0,49 (0,28; 0,83)	0,23 (0,15; 0,30)	P = 0,003
T3	0,49 (0,31; 0,74)	0,24 (0,16; 0,52)	P = 0,038
T4	0,41 (0,29; 0,77)	0,46 (0,24; 0,77)	P = 0,989
T5	0,39 (0,28; 0,70)	0,26 (0,16; ---)	P = 0,082

HMOXO1	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	1,57 (0,73; 3,65)	1,86 (0,75; 3,83)	P = 0,679
T2	0,93 (0,63; 1,66)	0,58 (0,53; 0,68)	P = 0,031
T3	0,85 (0,46; 1,41)	0,51 (0,32; 4,73)	P = 0,256
T4	0,79 (0,44; 1,38)	0,47 (0,34; 5,76)	P = 0,522
T5	0,62 (0,39; 1,05)	0,52 (0,30; ---)	P = 0,841

IL-6	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	0,35 (0,13; 1,22)	0,26 (0,15; 0,72)	P = 0,452
T2	0,31 (0,14; 0,87)	0,09 (0,07; 0,20)	P = 0,030
T3	0,32 (0,07; 1,66)	0,10 (0,04; 5,68)	P = 0,465
T4	0,28 (0,09; 1,00)	0,76 (0,002; 3,18)	P = 0,615
T5	0,33 (0,08; 1,31)	0,09 (0,01; ---)	P = 0,131

NOS ₂	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	1,13 (0,33; 2,84)	0,23 (0,08; 0,67)	P = 0,035
T2	1,61 (0,56; 3,95)	1,08 (0,43; 2,04)	P = 0,337
T3	2,07 (0,48; 6,80)	1,31 (0,05; 5,19)	P = 0,326
T4	1,32 (0,20; 2,53)	0,79 (0,25; 2,30)	P = 0,734
T5	1,28 (0,48; 3,56)	0,38 (0,37; ---)	P = 0,571

ICAM	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	0,76 (1,27; 1,89)	1,02 (0,87; 1,57)	P = 0,529
T2	1,81 (0,81; 1,60)	1,12 (0,89; 1,37)	P = 0,765
T3	1,11 (0,74; 1,68)	1,21 (0,99; 1,46)	P = 0,777
T4	1,08 (0,75; 1,54)	2,87 (1,04; 5,38)	P = 0,101
T5	0,96 (0,64; 1,42)	1,00 (0,80; ---)	P = 1,00

VCAM	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	2,33 (1,77; 3,56)	2,71 (1,89; 3,56)	P = 0,858
T2	2,33 (1,74; 2,97)	3,17 (2,19; 3,78)	P = 0,044
T3	2,50 (1,77; 3,06)	2,34 (2,10; 2,86)	P = 0,951
T4	2,16 (1,58; 2,77)	2,75 (1,26; 4,20)	P = 0,405
T5	2,04 (1,54; 2,71)	2,73 (2,62; ---)	P = 0,143

INF γ	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	0,39 (0,18; 2,23)	0,42 (0,25; 1,38)	P = 0,728
T2	0,54 (0,19; 1,78)	0,37 (0,13; 0,66)	P = 0,409
T3	0,38 (0,18; 2,58)	0,38 (0,09; 0,67)	P = 0,364
T4	0,48 (0,23; 2,57)	0,39 (0,09; 1,07)	P = 0,470
T5	0,57 (0,26; 3,36)	1,08 (0,62; ---)	P = 0,413

Continuação da tabela 4 segue na página seguinte.

Continuação da tabela 4.

MCP1	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	0,24 (0,12; 0,38)	0,34 (0,20; 0,49)	P= 0,267
T2	0,25 (0,19; 0,37)	0,26 (0,17; 0,38)	P= 0,861
T3	0,21 (0,12; 0,33)	0,29 (0,25; 0,31)	P= 0,179
T4	0,20 (0,12; 0,26)	0,20 (0,03; 0,50)	P= 0,946
T5	0,13 (0,10; 0,23)	0,20 (0,03; ---)	P= 0,748

TNF α	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	0,34 (0,02; 0,91)	0,27 (0,02; 0,61)	P= 0,566
T2	0,56 (0,05; 1,59)	0,34 (0,15; 0,52)	P= 0,190
T3	0,34 (0,01; 1,22)	0,75 (0,15; 0,84)	P= 0,873
T4	0,44 (0,04; 0,81)	0,15 (0,02; 0,69)	P= 0,420
T5	0,31 (0,01; 1,28)	0,54 (0,009; ---)	P= 0,968

TGF β	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	0,65 (0,55; 0,88)	0,68 (0,56; 1,22)	P= 0,821
T2	0,67 (0,57; 0,75)	0,58 (0,48; 0,64)	P= 0,069
T3	0,65 (0,54; 0,82)	0,44 (0,42; 0,55)	P= 0,007
T4	0,62 (0,54; 0,70)	0,64 (0,49; 1,25)	P= 0,903
T5	0,52 (0,42; 0,71)	0,61 (0,46; ---)	P= 0,463

VEGF	Rejeição Humoral (C4d) mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0 e 1)	Rejeição (Grau 2 e 3)	
T1	0,38 (0,24; 0,47)	0,31 (0,19; 0,62)	P= 0,792
T2	0,36 (0,25; 0,51)	0,30 (0,13; 0,52)	P= 0,348
T3	0,44 (0,29; 0,63)	0,29 (0,17; 0,40)	P= 0,050
T4	0,34 (0,28; 0,55)	0,48 (0,25; 0,82)	P= 0,430
T5	0,36 (0,23; 0,49)	0,23 (0,18; ---)	P= 0,463

As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os dois grupos foram observados nos seguintes genes e respectivos tempos de transplante: *ADIPOR1* (T1, T2, T3 e T4), *ADIPOR2* (T2 e T3), *BCL2L1* (T2 e T3), *HMOX1* (T2) e *IL-6* (T2), *NOS₂* (T1), *VCAM* (T2), *TGF β* (T3) e *VEGF* (T3). Destes, oito genes apresentaram expressão diminuída no grupo de indivíduos com rejeição humoral, exceto o gene *VCAM*, o qual se observou um aumento de expressão no grupo de indivíduos com rejeição humoral (Figura 11).

Resultados

Continuação da figura 11 segue na página seguinte.

Continuação da figura 11.

Figura 11: Análise comparativa da expressão gênica na rejeição humoral. As expressões de mRNA dos genes *ADIPOR1* (a), *ADIPOR2* (b), *BCL2L1* (c), *HMOXO1* (d), *IL-6* (e), *NOS₂* (f), *VCAM* (g), *TGFb* (h) e *VEGF* (i) foram normalizadas com o gene de referência (*B₂M*) e o tecido do doador saudável utilizado como calibrador para o cálculo de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Os grupos de indivíduos transplantados sem rejeição humoral (grau 0 e 1 na marcação de C4d) e com rejeição humoral moderada ou grave (grau 2 e 3) foram comparados em cinco períodos de pós-transplante. O método estatístico utilizado para a análise foi Mann-Whitney para medidas não paramétricas ($\alpha = 0,05$).

Resultados

4.7. Frequência de rejeição celular na população de estudo

O diagnóstico de rejeição celular baseou-se na classificação recomendada pelo *ISHLT* de 2005 (21), cujo grau (0) corresponde à biópsia sem evidências de rejeição; (1R), rejeição leve; (2R) rejeição moderada e (3R) rejeição grave.

No total de 300 amostras de biópsias endomiocárdicas incluídas neste estudo, 56 amostras (18,7%) tiveram diagnóstico histopatológico de grau 0, 237 amostras (79%) de grau 1R e 7 amostras (2,3%) de grau 2R ou 3R de rejeição. A distribuição dos números das amostras segundo o período de transplante e o diagnóstico de rejeição celular encontra-se na tabela 5.

Tabela 5: Distribuição das 300 amostras de biópsias endomiocárdicas de 63 indivíduos transplantados segundo o grau de rejeição celular e o período de transplante.

Grau de rejeição	Tempo de pós transplante					Total
	T 1	T 2	T 3	T 3	T 5	
0	14 (22,2 %)	8 (12,7 %)	12 (19,0 %)	15 (23,8 %)	7 (14,6 %)	56 (18,7 %)
1R	47 (74,6 %)	53 (84,1 %)	51 (81,0 %)	47 (74,6 %)	39 (81,2 %)	237 (79,0 %)
2R	2 (3,2 %)	1 (1,6 %)	0	1 (1,6 %)	2 (4,2 %)	6 (2,0 %)
3R	0	1 (1,6 %)	0	0	0	1 (0,3 %)
Total	63 (100 %)	63 (100 %)	63 (100 %)	63 (100 %)	48 (100 %)	300 (100 %)

*Tempo de pós-transplante: T1 (30 dias); T2 (90 dias); T3 (180 dias); T4 (360 dias) e T5 (720 dias).

** (0) sem evidências de rejeição; (1R), rejeição leve; (2R) rejeição moderada e (3R) rejeição grave.

Na rejeição celular, devido ao número reduzido de indivíduos com rejeição moderada (2R) ou grave (3R), para efeitos de comparação, os dois grupos foram classificados como: sem rejeição, aqueles com grau 0 e o

grupo com rejeição celular, todos os indivíduos com algum sinal de rejeição (1R, 2R e 3R).

Os sete pacientes que tiveram o diagnóstico de rejeição moderada (2R) ou grave (3R), dois apresentaram fração de ejeção ventricular inferior a 50% no estudo hemodinâmico, três pacientes receberam o pulsoterapia com drogas imunossupressoras devido ao quadro clínico grave de rejeição. Outros dois pacientes não tiveram alterações hemodinâmicas e também não receberam pulsoterapia.

Na rejeição mediada por células, comparando os grupos de indivíduos com e sem rejeição, as diferenças estatísticas ($p < 0,001$) foram detectadas nos seguintes genes e respectivos tempos de transplante: *ADIPOR2* (T4), *AIF* (T4), *ICAM* (T3), *VCAM* (T2 e T3), *INF γ* (T3), *MCP1* (T4) e *VEGF* (T4). Os valores de expressão relativa representados em mediana, percentil 25 e 75 dos grupos com e sem rejeição celular, assim como os níveis críticos (valor de p) em cinco tempos de transplante estão descritos na tabela 6.

Observou-se uma diminuição significativa das expressões de mRNA dos genes *ADIPOR2*, *ICAM* e *VEGF* no grupo de indivíduos com rejeição celular. Por outro lado, nesse mesmo grupo de pacientes, observou-se um aumento significativo de expressão de mRNA dos genes *VCAM*, *MCP1* que estão associados com recrutamento e adesão celular e os genes *INF γ* e *AIF* que são associados aos processos inflamatórios (Figura 12).

Resultados

Tabela 6. Análise comparativa da expressão gênica na rejeição celular. A expressão dos genes *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1*, *HMOXO1*, *IL-6*, *NOS₂*, *VCAM*, *ICAM*, *TGF β* e *VEGF* entre os grupos de indivíduos com e sem rejeição celular classificação feita segundo os critérios da *SIHLT*. A comparação foi feita separando a população amostral por rejeição e período de transplante. O método estatístico utilizado foi teste de Mann-Whitney U ($\alpha = 0,05$).

ADIPOR1	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	0,50 (0,19; 1,00)	0,50 (0,15; 1,00)	P = 0,781
T2	0,42 (0,22; 1,00)	0,50 (0,20; 1,00)	P = 0,802
T3	0,42 (0,22; 1,00)	1,00 (0,25; 1,00)	p = 0,232
T4	0,31 (0,14; 1,00)	1,00 (0,34; 1,00)	p = 0,104
T5	1,00 (0,11; 1,00)	0,50 (0,16; 1,00)	p = 0,300

AIF-1	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	0,74 (0,42; 1,94)	1,27 (0,77; 3,20)	P = 0,080
T2	1,16 (0,46; 1,73)	1,16 (0,53; 2,07)	P = 0,563
T3	0,69 (0,29; 1,56)	0,93 (0,32; 1,92)	p = 0,618
T4	0,50 (0,30; 0,65)	0,92 (0,39; 2,10)	p = 0,014
T5	0,51 (0,12; 1,34)	0,54 (0,26; 1,35)	p = 0,689

HMOXO1	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	1,46 (0,67; 4,94)	1,65 (0,77; 3,40)	P = 0,967
T2	1,20 (0,62; 27,3)	0,85 (0,62; 1,47)	P = 0,283
T3	0,95 (0,40; 7,20)	0,74 (0,46; 1,40)	p = 0,700
T4	0,51 (0,30; 1,22)	0,83 (0,48; 1,39)	p = 0,149
T5	0,67 (0,36; 1,09)	0,62 (0,39; 1,06)	p = 0,775

NOS ₂	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	3,26 (0,07; 11,79)	0,83 (0,20; 1,53)	P = 0,165
T2	1,47 (0,25; 5,64)	1,59 (0,56; 3,51)	P = 0,918
T3	7,52 (0,11; 11,38)	1,55 (0,56; 5,43)	p = 0,175
T4	1,05 (0,12; 2,53)	1,57 (0,30; 2,64)	p = 0,341
T5	1,42 (0,12; 3,41)	1,16 (0,41; 3,56)	p = 0,977

VCAM	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	2,89 (1,90; 4,05)	2,33 (1,80; 3,52)	P = 0,427
T2	1,44 (1,36; 2,72)	2,46 (1,85; 3,14)	p = 0,014
T3	1,99 (0,92; 2,78)	2,60 (1,95; 3,12)	p = 0,043
T4	2,01 (1,23; 2,40)	2,24 (1,64; 3,05)	p = 0,245
T5	2,48 (2,04; 2,68)	2,00 (1,54; 2,80)	p = 0,456

ADIPOR2	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	0,36 (0,19; 0,55)	0,33 (0,22; 0,47)	P = 0,974
T2	0,45 (0,36; 0,53)	0,35 (0,23; 0,57)	P = 0,193
T3	0,46 (0,27; 0,64)	0,43 (0,28; 0,65)	p = 0,687
T4	0,50 (0,39; 0,88)	0,38 (0,26; 0,57)	p = 0,024
T5	0,39 (0,23; 1,04)	0,38 (0,24; 0,52)	p = 0,456

BCL2L1	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	0,40 (0,26; 0,69)	0,39 (0,24; 0,60)	P = 0,967
T2	0,67 (0,46; 0,78)	0,41 (0,24; 0,78)	P = 0,227
T3	0,57 (0,38; 0,71)	0,48 (0,28; 0,72)	p = 0,733
T4	0,51 (0,38; 0,86)	0,38 (0,27; 0,75)	p = 0,083
T5	0,70 (0,36; 0,99)	0,36 (0,28; 0,59)	p = 0,080

IL-6	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	0,52 (0,11; 1,97)	0,27 (0,13; 0,86)	P = 0,482
T2	0,26 (0,12; 0,75)	0,26 (0,10; 0,84)	P = 0,869
T3	0,24 (0,07; 2,71)	0,29 (0,06; 1,61)	p = 0,972
T4	0,32 (0,05; 2,41)	0,26 (0,09; 0,98)	p = 0,828
T5	1,16 (0,12; 2,62)	0,17 (0,07; 1,22)	p = 0,174

ICAM	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	1,33 (0,80; 2,58)	1,17 (0,79; 1,83)	P = 0,519
T2	1,41 (1,20; 1,77)	1,09 (0,79; 1,45)	P = 0,071
T3	1,53 (1,12; 2,43)	1,08 (0,68; 1,54)	p = 0,011
T4	1,16 (0,74; 1,77)	1,08 (0,77; 1,59)	p = 0,878
T5	0,54 (0,42; 1,50)	1,00 (0,70; 1,40)	p = 0,131

INF γ	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	0,29 (0,17; 2,06)	0,43 (0,20; 2,23)	P = 0,408
T2	0,14 (0,08; 0,68)	0,54 (0,22; 1,78)	P = 0,099
T3	0,18 (0,08; 0,37)	0,57 (0,22; 2,87)	p = 0,011
T4	0,24 (0,10; 5,50)	0,48 (0,26; 2,52)	p = 0,280
T5	0,87 (0,13; 72,0)	0,59 (0,29; 1,83)	p = 0,405

A continuação da tabela 6 segue na página seguinte.

Continuação da tabela 6.

MCP1	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	0,19 (0,12; 0,31)	0,31 (0,13; 0,42)	P= 0,181
T2	0,34 (0,32; 0,41)	0,24 (0,17; 0,33)	P= 0,110
T3	0,23 (0,13; 0,29)	0,21 (0,13; 0,33)	p=0,916
T4	0,12 (0,06; 0,23)	0,22 (0,14; 0,30)	p= 0,010
T5	0,12 (0,04; 0,17)	0,15 (0,10; 0,24)	p= 0,203

TNF α	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	0,48 (0,004; 3,30)	0,34 (0,03; 0,67)	P= 0,685
T2	0,42 (0,12; 0,71)	0,51 (0,05; 1,59)	P= 0,421
T3	0,02 (0,002; 0,83)	0,42 (0,02; 1,19)	p= 0,074
T4	0,25 (0,005; 0,78)	0,43 (0,08; 0,83)	p= 0,513
T5	0,44 (0,01; 26,2)	0,31 (0,008; 0,88)	p= 0,422

TGF β	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	0,67 (0,56; 0,95)	0,66 (0,55; 0,92)	P= 0,591
T2	0,74 (0,67; 0,82)	0,64 (0,54; 0,74)	P= 0,068
T3	0,59 (0,50; 0,83)	0,64 (0,52; 0,79)	p=0,813
T4	0,66 (0,55; 0,85)	0,61 (0,53; 0,68)	p= 0,229
T5	0,55 (0,35; 0,88)	0,52 (0,42; 0,71)	p= 0,932

VEGF	Rejeição Celular mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$
	Sem rejeição (Grau 0)	Rejeição (Grau 1R, 2R e 3R)	
T1	0,37 (0,24; 0,57)	0,34 (0,21; 0,46)	P= 0,487
T2	0,33 (0,30; 0,49)	0,36 (0,23; 0,51)	P= 0,984
T3	0,52 (0,32; 0,57)	0,42 (0,29; 0,62)	p= 0,512
T4	0,49 (0,39; 0,59)	0,36 (0,25; 0,49)	p= 0,007
T5	0,52 (0,28; 0,67)	0,32 (0,20; 0,46)	p= 0,139

Resultados

Figura 12: Análise comparativa da expressão gênica na rejeição celular. As expressões de mRNA dos genes *ADIPOR2* (a), *AIF* (b), *ICAM* (c), *VCAM* (d), *INFg* (e), *MCP1* (f) e *VEGF* (g) foram normalizadas com o gene de referência (*B₂M*) e utilizou o tecido do doador saudável como calibrador para cálculo de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Os grupos de indivíduos transplantados sem rejeição celular (grau 0) e com rejeição celular (graus 1R, 2R e 3R) foram comparados em cinco períodos de pós-transplante. O método estatístico utilizado para a análise foi Mann-Whitney para medidas não paramétricas ($\alpha = 0,05$).

4.8. Frequência de vasculite na população de estudo

A presença de vasculite nas biópsias endomiocárdicas foi avaliada pela coloração da hematoxina e eosina (H&E) na microscopia ótica.

Do total de 300 amostras de biópsias endomiocárdicas, 142 amostras tinham sinais de vasculite. Considerando cada paciente, observou-se que a maioria dos indivíduos (57/63 ou 90,5%) tiveram pelo menos uma amostra com algum grau de vasculite, e somente 6 indivíduos foram totalmente negativos para vasculite.

Um número maior de indivíduos com vasculite foi observado nos dois primeiros períodos de transplante (T1 e T2), assim como a intensidade e a frequência de vasos acometidos também foram observados em um número maior de indivíduos da fase precoce do transplante (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição das frequências de biópsias endomiocárdicas de 63 indivíduos transplantados segundo o tempo de transplante e graus de intensidade da vasculite e quantidade de vasos acometidos (n = 300 amostras).

	Tempo transplante					Total de amostras
	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	
Vasculite						
não	23 (36,5 %)	30 (47,6 %)	41 (65,1 %)	36 (57,1 %)	28 (44,4 %)	158 (52,7 %)
sim	40 (63,5 %)	33 (52,4 %)	22 (34,9 %)	27 (42,9 %)	20 (31,3 %)	142 (47,3 %)
Intensidade						
ausente	23 (36,5 %)	31 (49,2 %)	41 (65,1 %)	36 (57,1 %)	27 (56,3 %)	158 (52,7 %)
leve	11 (17,5 %)	9 (14,3 %)	9 (14,3 %)	13 (20,6 %)	9 (18,8 %)	51 (17,0 %)
moderada	12 (19,0 %)	10 (15,9 %)	9 (14,3 %)	6 (9,5 %)	7 (14,6 %)	44 (14,7 %)
intensa	7 (11,1 %)	3 (4,8 %)	0	2 (3,2 %)	4 (8,3 %)	16 (5,3 %)
não determinada	10 (15,9 %)	10 (15,9 %)	4 (6,3 %)	6 (9,5 %)	1 (2,1 %)	31 (10,3 %)
Vasos acometidos						
ausentes	23 (36,5 %)	31 (49,2 %)	41 (65,1 %)	36 (57,1 %)	27 (58,3 %)	158 (52,7 %)
raros	12 (19,0 %)	13 (20,6 %)	12 (19,0 %)	14 (22,2 %)	16 (33,3 %)	67 (22,3 %)
moderados	2 (3,2 %)	1 (1,6 %)	1 (1,6 %)	0	0	4 (1,3 %)
frequentes	17 (27,0 %)	8 (12,7 %)	6 (9,5 %)	7 (11,1 %)	3 (6,3 %)	41 (13,7 %)
não determinado	9 (14,3 %)	10 (15,9 %)	3 (4,8 %)	6 (9,5 %)	2 (2,1 %)	30 (10,0 %)

Resultados

4.9. Correlação entre presença de C4d e grau de vasculite

Analizou-se a relação entre a presença de C4d e a vasculite segundo a intensidade e grau de vasos acometidos.

A análise estatística por meio do método de correlação de Spearman detectou uma correlação fraca, porém significativa entre a presença de C4d e a intensidade de vasculite ($r= 0,1385$, $p=0,0234$), bem como número de vasos acometidos ($r= 0,1365$, $p=0,0252$).

4.10. Análise comparativa da expressão gênica na vasculite

Na comparação dos resultados da expressão gênica entre o grupo de indivíduos sem vasculite e o grupo de indivíduos que apresentaram algum grau de vasculite. Dos 14 genes avaliados no presente estudo, sete genes tiveram diferenças significantes em algum período do transplante, destes, dois genes tiveram expressão de mRNA aumentada, outros cinco tiveram diminuição da expressão gênica.

Os valores de expressão relativa representados em mediana, percentil 25 e 75 dos grupos com e sem vasculite, assim como os níveis críticos (valor de p) em cinco tempos de transplante estão na tabela 8.

As expressões de mRNA dos genes *BCL2L1* e *NOS2* estavam significativamente diminuídas no grupos de indivíduos com vasculite no primeiro período do transplante (Figura 13-b e c), ao passo que o gene *TNF*, a significância estatística da diminuição foi detectada somente no último tempo analisado (Figura 13-f). Observou-se também a diminuição da expressão do gene *ADIPOR2* nos indivíduos com vasculite nos períodos T2

e T4 (Figura 13-a). Interessante salientar que a expressão de mRNA do gene *VEGF* no grupo de indivíduo com vasculite foi significativamente diminuída em quatro dos cinco períodos analisados (Figura 13-g).

Os genes com as expressões de mRNA aumentadas no grupo de indivíduos com vasculite foram *VCAM* (Figura 13-d), nos períodos T3 e T4 do pós-transplante, e o gene *INF γ* nos períodos T2 e T3 (Figura 13-e).

Tabela 8. Análise comparativa da expressão gênica na vasculite ao longo do tempo. A classificação da vasculite seguiu-se os critérios definidos pelo Cipullo e colaboradores em 2011. A comparação entre a ausência e a presença de vasculite foi feita por teste estatístico de Mann-Whitney U ($\alpha = 0,05$).

ADIPOR1	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	1,00 (0,16; 1,00)	0,50 (0,17; 1,00)	0,316
T2	0,50 (0,20; 1,00)	0,50 (0,21; 1,00)	0,739
T3	0,50 (0,23; 1,00)	0,75 (0,30; 1,00)	0,667
T4	1,00 (0,33; 1,00)	0,50 (0,25; 1,00)	0,162
T5	0,50 (0,11; 1,00)	0,28 (0,16; 1,00)	0,64

ADIPOR2	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	0,33 (0,29; 0,56)	0,31 (0,20; 3,19)	0,16
T2	0,45 (0,32; 0,61)	0,32 (0,20; 0,42)	0,006
T3	0,47 (0,26; 0,65)	0,38 (0,30; 0,61)	0,801
T4	0,50 (0,38; 0,76)	0,30 (0,23; 0,42)	0,001
T5	0,29 (0,20; 0,53)	0,39 (0,31; 0,58)	0,229

AIF	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	1,16 (0,83; 2,89)	1,23 (0,51; 3,19)	0,502
T2	1,10 (0,47; 1,88)	1,29 (0,61; 2,11)	0,39
T3	0,97 (0,33; 1,89)	0,88 (0,23; 1,65)	0,320
T4	0,62 (0,31; 1,19)	0,86 (0,39; 2,11)	0,130
T5	0,57 (0,35; 1,35)	0,43 (0,18; 1,30)	0,385

BCL2L1	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	0,55 (0,29; 0,71)	0,35 (0,24; 0,53)	0,041
T2	0,46 (0,26; 0,85)	0,46 (0,23; 0,72)	0,413
T3	0,51 (0,35; 0,79)	0,37 (0,26; 0,68)	0,108
T4	0,50 (0,31; 0,77)	0,38 (0,26; 0,77)	0,206
T5	0,36 (0,27; 0,67)	0,40 (0,32; 0,76)	0,497

HMOX1	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	2,01 (1,23; 4,14)	1,33 (0,71; 3,24)	0,245
T2	0,77 (0,58; 1,75)	0,93 (0,62; 1,55)	0,611
T3	0,74 (0,44; 1,40)	0,81 (0,55; 1,47)	0,665
T4	0,66 (0,38; 1,20)	0,92 (0,45; 1,39)	0,359
T5	0,62 (0,42; 0,90)	0,62 (0,33; 1,27)	0,707

IL-6	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	0,26 (0,14; 1,89)	0,34 (0,13; 0,88)	0,748
T2	0,20 (0,11; 0,41)	0,47 (0,11; 1,23)	0,114
T3	0,27 (0,07; 1,20)	0,32 (0,05; 1,85)	0,954
T4	0,41 (0,09; 2,06)	0,20; (0,06; 1,46)	0,301
T5	0,50 (0,07; 1,24)	0,13 (0,08; 1,32)	0,699

A continuação da tabela 8 segue na página seguinte.

Resultados

Continuação da tabela 8.

NOS2	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	1,50 (0,41; 6,15)	0,76 (0,12; 1,48)	0,012
T2	1,71 (0,93; 2,89)	1,31 (0,42; 3,77)	0,568
T3	2,17 (0,38; 8,00)	1,75 (0,27; 5,02)	0,564
T4	1,30 (0,24; 2,57)	0,96 (0,15; 2,34)	0,564
T5	1,35 (0,39; 3,41)	1,02 (0,41; 3,64)	0,786

ICAM	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	1,06 (0,71; 1,83)	1,22 (0,84; 2,01)	0,236
T2	1,13 (0,78; 1,50)	1,17 (0,89; 1,53)	0,820
T3	1,13 (0,77; 1,70)	1,11 (0,69; 1,68)	0,762
T4	1,12 (0,91; 1,64)	1,05 (0,64; 1,42)	0,321
T5	0,83 (0,56; 1,32)	1,33 (0,74; 1,75)	0,075

VCAM	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	2,08 (1,55; 3,58)	2,82 (1,91; 3,52)	0,128
T2	2,27 (1,55; 2,97)	2,44 (1,83; 3,23)	0,177
T3	2,43 (1,77; 2,77)	2,85 (1,90; 3,25)	0,074
T4	2,00 (1,40; 2,39)	2,66 (1,79; 3,29)	0,010
T5	2,02 (1,62; 2,67)	2,13 (1,43; 3,04)	0,81

INFg	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	0,72 (0,15; 3,86)	0,38 (0,22; 1,13)	0,96
T2	0,24 (0,11; 1,06)	0,61 (0,29; 3,41)	0,010
T3	0,28 (0,13; 2,40)	0,87 (0,30; 2,23)	0,031
T4	0,40 (0,17; 2,59)	0,58 (0,29; 2,41)	0,541
T5	0,71 (0,41; 5,29)	2,13 (1,43; 3,03)	0,117

MCP1	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	0,25 (0,11; 0,38)	0,28 (0,14; 0,39)	0,480
T2	0,24 (0,19; 0,33)	0,27 (0,17; 0,41)	0,335
T3	0,21 (0,11; 0,31)	0,27 (0,16; 0,35)	0,204
T4	0,21 (0,12; 0,34)	0,18 (0,08; 0,26)	0,642
T5	0,15 (0,11; 0,23)	0,11 (0,08; 0,23)	0,281

TGFB	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	0,69 (0,53; 1,06)	0,65 (0,56; 0,82)	0,342
T2	0,69 (0,56; 0,87)	0,64 (0,55; 0,73)	0,231
T3	0,64 (0,54; 0,82)	0,60 (0,49; 0,75)	0,36
T4	0,61 (0,55; 0,74)	0,62 (0,52; 0,69)	0,462
T5	0,51 (0,42; 0,64)	0,57 (0,42; 0,78)	0,341

TNF	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	0,35 (0,03; 4,11)	0,32 (0,005; 0,70)	0,220
T2	0,62 (0,04; 1,05)	0,46 (0,21; 1,92)	0,650
T3	0,25 (0,005; 1,24)	0,54 (0,18; 0,88)	0,231
T4	0,50 (0,04; 1,52)	0,39 (0,04; 0,81)	0,527
T5	0,55 (0,03; 2,21)	0,04 (0,007; 0,58)	0,040

VEGF	Vasculite mediana (per 25; per 75)		$\alpha = 0,05$ valor de p
	Ausente	Presente	
T1	0,42 (0,28; 0,55)	0,30 (0,17; 0,41)	0,007
T2	0,45 (0,31; 0,54)	0,28 (0,20; 0,46)	0,005
T3	0,46 (0,34; 0,63)	0,29 (0,24; 0,52)	0,024
T4	0,44 (0,35; 0,59)	0,33 (0,21; 0,47)	0,009
T5	0,33 (0,23; 0,44)	0,40 (0,19; 0,52)	0,73

Figura 13: Análise comparativa da expressão gênica na vasculite. As expressões de mRNA dos genes *ADIPOR2* (a), *BCL2L1* (b), *NOS₂* (c), *VCAM* (d), *INFg* (e), *TNF* (f) e *VEGF* (g) foram normalizadas com o gene de referência (*B₂M*) e o tecido do doador saudável foi utilizado como calibrador para cálculo de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Os grupos de indivíduos transplantados com e sem vasculite foram comparados em cinco períodos de pós-transplante. O método estatístico utilizado para a análise foi Mann-Whitney para medidas não paramétricas ($\alpha = 0,05$).

Resultados

4.11. Comportamento da expressão gênica na vasculopatia do aloenxerto cardíaco

Do total de 63 pacientes, a doença vascular do enxerto (VAC) foi detectada em 6 pacientes (9,5%) ao final de 2 anos de acompanhamento. O diagnóstico foi realizado por meio de tomografia computadorizada cardiovascular (TCC).

Avaliou-se o comportamento da expressão gênica do grupo de indivíduos, com e sem VAC ao longo do tempo.

Dos 14 genes analisados neste trabalho, constatou-se que na metade dos genes, o grupo com VAC apresentou o comportamento da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ao longo do tempo significativamente diferente ($P < 0,05$) do grupo sem VAC (Apêndice 2). Por isso, realizou-se também a análise de contraste para identificar os períodos onde ocorreram as diferenças entre os dois grupos.

Observou-se que a expressão do gene *ADIPOR2* no grupo com VAC foi menor desde o início do transplante, mantendo o mesmo comportamento no intervalo de T2-T3 ($p = 0,0401$) e T3-T4 ($p = 0,0214$), no T4 observou-se uma interação entre os dois grupos, e no período T4-T5 a expressão do gene *ADIPOR2* no grupo com VAC passou a ser significativamente maior ($p = 0,0229$) do que o grupo sem VAC (Figura 14-b).

A expressão do gene *AIF* nos dois grupos foi semelhante até o T3, no entanto, no período T3-T4 a expressão desse gene no grupo com VAC foi significativamente maior do que o grupo sem VAC ($p = 0,0037$), mantendo o padrão elevado até o último tempo de observação (Figura 14-c).

A expressão do gene *NOS₂* foi maior no grupo de indivíduos com VAC no T1, em seguida, detectou-se interação entre os dois grupos no T2-T3 ($p = 0,0581$) e T3-T4 ($0,0126$) e após o T4 manteve o comportamento elevado até o T5 (Figura 14-f).

Em relação à expressão do gene *INF γ* , o comportamento dos dois grupos foram diferentes somente no T1 ($p = 0,0128$), e depois permanecem iguais até o final do acompanhamento (Figura 14-h).

O comportamento da expressão do gene *TNF α* no grupo sem VAC foi constante em todo o período de acompanhamento. Por outro lado, o grupo com VAC apresentou a diminuição gradativa da expressão desse gene ao longo do tempo, chegando a níveis quase significantes ($p = 0,0514$) entre os dois grupos no T5 (Figura 14-i).

A expressão de mRNA do gene *ICAM* no início do transplante foi significativamente maior ($p < 0,0001$) no grupo com VAC. Houve uma diminuição até o T2, seguida de aumento da expressão desse gene, chegando a nível significante entre os dois grupos ($p = 0,0402$) no período T3-T4, permanecendo até o T5 (Figura 14-l).

O comportamento da expressão do gene *VCAM* foi semelhante nos dois grupos analisados até o T4, e no período T4-T5 a expressão desse gene foi significativamente menor ($p = 0,0045$) no grupo com VAC quando comparado ao grupo sem VAC (Figura 14-m).

As medidas de expressão relativa dos genes *ADIPOR1*, *BCL2L1*, *HMOXO1*, *IL-6*, *TGF β* , *MCP1* e *VEGF* não sofreram alterações significantes

Resultados

com o tempo, como também não foram diferentes entre os grupos de pacientes com diagnóstico de VAC e indivíduos sem VAC (Figura 14).

Continuação da figura 14 segue na página seguinte.

Continuação da figura 14.

Figura 14: Comparação do comportamento da expressão gênica de indivíduos com e sem doença vascular do enxerto ao longo do tempo. Os genes cujas expressões de mRNA avaliadas foram: a) *ADIPOR1*; b) *ADIPOR2*; c) *AIF*; d) *BCL2L1*; e) *HMOXO1*; f) *NOS2*; g) *IL6*; h) *INF γ* ; i) *TNF*; j) *TGF β* ; l) *ICAM*; m) *VCAM*; n) *MCP1* e o) *VEGF*. A análise estatística foi realizada pelo método de variância não paramétrica de dados ordinais com medidas repetidas ($\alpha = 0,05$).

4.12. Comportamento da expressão gênica: pulsoterapia

Do total de 63 indivíduos, 15 (23,8%) receberam pulsoterapia com imunossuppressores em algum período durante os dois anos de acompanhamento devido às evidências clínicas e ecocardiográficas de rejeição aguda.

Avaliou-se o comportamento da expressão gênica do grupo de indivíduos, com e sem tratamento com pulsoterapia ao longo do tempo.

Na análise preliminar, identificou-se no grupo de indivíduos que receberam pulsoterapia ao longo do tempo, o comportamento da expressão dos genes *ADIPOR1*, *BCL2L1* e *VEGF* diferente do grupo sem pulsoterapia de imunossupressão (Apêndice 3). No entanto, na análise de contraste, o

Resultados

gene *BCL2L1* não foi identificada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos nos cinco períodos de observação (Figura 15-d).

A expressão do gene *ADIPOR1* no início do transplante (período T1-T2) foi significativamente menor ($p=0,0003$) no grupo que recebeu pulsoterapia, e após o tempo T2, o comportamento da expressão gênica foi semelhante entre os dois grupos analisados (Figura 15-a).

O comportamento da expressão do gene *VEFG* foi diferente nos grupos com e sem pulsoterapia desde o início do transplante. A diferença acentuou no período T2-T3 ($p=0,0613$) atingido níveis significantes no período T3-T4 ($p=0,0177$), e no último período, o comportamento dos grupos tornam-se semelhantes (Figura 15-o).

Na maioria dos genes, as medidas de expressão relativa não sofreram alteração com o tempo, assim como também não foram diferentes entre os grupos (Figura 15).

Continuação da figura 15 segue na página seguinte.

Figura 15: Comparação do comportamento da expressão gênica de indivíduos com e sem o tratamento com pulsoterapia imunossupressora ao longo do tempo. Os genes cujas expressões de mRNA avaliadas foram: a) *ADIPOR1*; b) *ADIPOR2*; c) *AIF*; d) *BCL2L1*; e) *HMOX01*; f) *NOS2*; g) *IL6*; h) *INF γ* ; i) *TNF α* ; j) *TGF β* ; l) *ICAM*; m) *VCAM*; n) *MCP1* e o) *VEGF*. A análise estatística foi realizada pelo método de variância não paramétrica de dados ordinais com medidas repetidas ($\alpha = 0,05$).

Resultados

4.13. Análise de correlação entre as expressões dos genes

Avaliou-se a correlação entre as expressões de mRNA dos genes propostos para o presente estudo. A tabela completa, contendo coeficiente de correlação de Spearman e valor de p para $\alpha = 0,05$ de todos os genes analisados estão apresentados no Apêndice 6.

A correlação estatisticamente significativa com coeficiente de correlação superior a 0,5 foram observadas entre os genes: *ADIPOR1*, *ADIPOR2* e *VEGF* (Figura 16).

Figura 16: Análise de correlação utilizando o método de Spearman ($\alpha = 0,05$). Correlação entre a expressão relativa dos genes, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* (a), *ADIPOR1* e *VEGF* (b) e *ADIPOR2* e *VEGF* (c).

4.14. Relação entre expressão de *ADIPOR1*, *ADIPOR2* e dados clínicos

Nos cinco períodos de transplante, todos os indivíduos tiveram a menor expressão do gene *ADIPOR1* em relação ao tecido cardíaco antes do transplante. Quanto ao gene *ADIPOR2*, aproximadamente 50% dos indivíduos transplantados tiveram expressão menor, e no resto do grupo, a expressão foi semelhante a antes do transplante (Figura 9).

Em relação à expressão dos genes *ADIPOR1* e *ADIPOR2* nas rejeições. Observou-se uma baixa expressão desses dois genes no grupo com rejeição humoral (C4d positivo) em vários períodos de transplante (Figura 11-a,b). Interessante salientar que esse padrão de baixa expressão não foi observado entre os grupos com e sem rejeição celular (Figura 12-a).

Os indivíduos com vasculite apresentaram uma diminuição significativa de expressão do gene *ADIPOR2* no período T2 e T4 de observação. Porém, não houve diferença significativa na expressão do gene *ADIPOR1* entre os grupos com e sem vasculite nos cinco períodos de observação (Figura 13-a).

Quando comparamos os grupos de indivíduos com e sem VAC, o mesmo comportamento de baixa expressão dos genes *ADIPOR1* e *ADIPOR2* foram observados em quase todos os períodos de observação, exceto no período T4-T5, onde se detectou um aumento significativo da expressão do *ADIPOR2* no grupo com VAC (Figura 14-b).

4.15. Perfil de expressão gênica nas rejeições

Analisou-se o perfil de expressão gênica dos indivíduos com rejeição humoral grave ou grau 3 (Figura 17 B) e rejeição celular grau 2 ou 3 segundo *SIHTL* (Figura 17 C) escolhidos aleatoriamente para comparar com o grupo de indivíduos com VAC (Figura 17 A).

A figura 17 mostra o perfil de expressão dos genes protetores (em verde). Onde, *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1* e *VEGF* são predominantemente de baixa expressão nos três tipos de rejeição, exceto no

Resultados

gene HMOXO1, onde alguns indivíduos apresentaram a alta expressão desse gene.

Mas, os genes inflamatórios (em vermelho) estão mais expressos nos três tipos de rejeição, com exceção do TGF β , o qual predomina a equivalência com o controle (tecido do doador antes do transplante). É interessante observar que o gene AIF-1 é mais expresso na rejeição humoral, ao passo que o gene IL-6 é menos expresso nesse mesmo tipo de rejeição.

Em relação aos genes que codificam as moléculas de adesão, sem dúvida, o VCAM é mais expresso nos 3 tipos de rejeição e MCP1 foi menos expresso em quase todos os indivíduos analisados (Figura 17).

Figura 17: Análise do perfil de expressão dos genes protetivos (verde), genes inflamatórios (vermelho) e genes que codificam moléculas de adesão e quimiocinas (amarelo) nos grupos de indivíduos transplantados com vasculopatia do aloenxerto cardíaco, VAC (A), rejeição humoral, grau 3 (B) e rejeição celular, grau 2 e 3 (C). Cada linha contém: número do indivíduo no projeto, iniciais do nome e cinco tempos de cada indivíduo em 14 genes. Cada quadrado corresponde a expressão do gene em um determinado período do tempo, azul (gene de baixa expressão), branco (gene que expressa igual ao calibrador) e vermelho (gene de alta expressão).

5 – DISCUSSÃO

Discussão

Atualmente, o principal obstáculo que limita uma boa evolução de um transplante cardíaco é a vasculopatia do aloenxerto cardíaco (34). Os dados da literatura indicam que a rejeição mediada por células ou anticorpos, assim como disfunção endotelial ou vasculite, ocorridos no início do transplante podem contribuir para a patogênese da VAC (46;47;49;50). O intuito de utilizar as amostras de FFPE nesta pesquisa foi para conhecer as condições fisiopatológicas do órgão transplantado em nível molecular, e tentar identificar os marcadores de rejeição ou possíveis alvos terapêuticos para auxiliar no acompanhamento clínico de pacientes que receberam o transplante do coração.

As amostras de tecidos em FFPE são encontradas comumente nos arquivos históricos do serviço de anatomia patológica, que guardam ricas informações morfológicas e moleculares do órgão de onde foi retirado o tecido. No passado, a principal dificuldade no uso de FFPE como fonte de amostra para estudo molecular era a obtenção de ácidos nucleicos de boa qualidade. Atualmente, existem reagentes comerciais desenvolvidos especificamente para FFPE, cujo potencial diagnóstico chamou atenção de vários grupos de pesquisadores (128;129), inclusive a nossa.

A utilização das amostras de tecidos em FFPE permite realizar estudos retrospectivos com o tempo menor de execução do projeto. No entanto, na fase tardia do transplante, as biópsias endomiocárdicas não são realizadas rotineiramente, tornando a utilização da amostra de FFPE inacessível. Assim sendo, vários grupos de pesquisadores têm buscado biomarcadores no sangue periférico para monitoramento do enxerto cardíaco (130-132). Vale

ressaltar que todos esses trabalhos citados associaram a expressão gênica das células imunes do sangue periférico à rejeição celular. Sabe-se que esse tipo de rejeição, os leucócitos estão diretamente envolvidos. Pham e colaboradores (133) identificaram uma associação positiva entre o perfil de expressão gênica de células leucocitárias do sangue periférico e a função ventricular cardíaca medida pelo ecocardiograma, e, com isso, os pacientes foram dispensados de biópsias desnecessárias.

Em relação aos reagentes e equipamentos utilizados para qPCR, optamos pela tecnologia TaqMan (134) pois a reação é específica e mais eficiente. O equipamento RotorGene® (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) tem como característica a realização de ensaio em micro tubos, diminuindo assim a chance de contaminar amostras adjacentes, como nas placas. Além disso, o sistema de rotor desse equipamento distribui o ar de modo homogêneo, mantendo a temperatura constante em todo o espaço interno, evitando assim, a variação devido à posição da amostra dentro da placa. Esse equipamento também permite utilizar o sistema multiplex, porque detecta diferentes comprimentos de onda de luz simultaneamente, possibilitando a análise do gene alvo e referência no mesmo tubo, eliminando as variações inter-ensaios inerentes ao procedimento técnico.

Outro fator importante que determina a excelência dos resultados é a qualidade das amostras. As amostras de RNA utilizadas no nosso estudo foram obtidas a partir do tecido em FFPE, e observamos que eram compostas principalmente pelos fragmentos de RNA de tamanhos entre 100 a 200 nucleotídeos (Figura 3). Esse nosso dado está em concordância com

Discussão

da literatura, apesar das diferenças de reagentes e protocolos de extração utilizados por cada grupo (135;136). Para melhor resultado da amplificação, selecionamos cuidadosamente os iniciadores (*primers*) que produzem amplicons com tamanhos em torno de 100 pares de base (Tabela 1).

Também é muito importante a escolha do gene de referência para normalização da reação de qPCR. O gene de referência *B₂M* utilizado no presente estudo foi selecionado a partir de 32 genes endógenos mais usados para este tipo de experimento; desses, 6 genes foram novamente testados e os resultados foram analisados no programa GeNorm para eleger o gene de referência. Segundo Vandesompele e colaboradores (137), essa estratégia de normalização é pré-requisito para obter um resultado acurado gerado pela qPCR, possibilitando, assim, a detecção de pequenas variações de expressão gênica que podem ser relevantes ao estudo.

Quanto à análise de resultados de qPCR, existem dois métodos de análise: quantificação absoluta e relativa (126). O primeiro quantifica o número de cópias de um transcrito de interesse utilizando uma curva padrão. O segundo, que foi utilizado por nós neste estudo, descreve quantas vezes um gene expressa mais ou expressa menos em relação ao calibrador, cuja fórmula utilizada para o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi descrita previamente no capítulo Métodos. No presente trabalho, optou-se pela quantificação relativa, pois é um tipo de análise que não requer construção de uma curva padrão; além disso, conseguimos sete amostras de biópsias do coração do doador obtidas alguns minutos antes do transplante, que foram usadas como calibrador na análise dos resultados. Vale ressaltar que a quantificação

relativa é um método de análise largamente utilizada pela comunidade científica para a análise de expressão gênica (138;139).

Neste estudo, analisamos as amostras sequenciais de 63 indivíduos transplantados ou 300 amostras de biópsias endomiocárdicas, além de 7 amostras do grupo controle (calibrador), totalizando 307 amostras. Infelizmente, para algumas questões, esse tamanho amostral não foi suficiente para comprovar nossa hipótese. Devido à limitação do tempo e de recurso, achamos mais conveniente fazer esta primeira etapa do trabalho, deixando as questões abertas para o futuro.

Na análise da distribuição das amostras de biópsias endomiocárdicas segundo o tempo de transplante (Figura 7), observou-se que o tempo de transplante entre os indivíduos do mesmo período é bastante próximo, exceto no período T5 cuja dispersão foi maior, provavelmente devido a maior flexibilidade no tempo da realização do exame depois de quase dois anos de transplante. A homogeneidade amostral da nossa população de estudo permitiu uma análise estatística mais adequada, e, conseqüentemente, detectar as diferenças entre os grupos comparados.

A incidência de rejeição humoral diverge entre centros transplantadores devido aos diferentes critérios de diagnóstico adotados por cada instituição. De acordo com a segunda diretriz brasileira de transplante cardíaco, a incidência de rejeição humoral é em torno de 15 a 20% no primeiro ano de transplante (15). A incidência observada neste estudo, baseada somente na detecção de C4d, foi de 26,8% até dois anos de transplante. Provavelmente, essa incidência discretamente maior foi devido ao maior tempo de

Discussão

observação e, talvez, por não considerar a função hemodinâmica e os dados clínicos para a classificação de indivíduos acometidos pela rejeição humoral.

Considerando que uma das causas de positividade do C4d nas biópsias endomiocárdicas é devido à ativação do sistema complemento pelos anticorpos pré-formados do receptor. Do total de 63 indivíduos incluídos neste estudo, três indivíduos tiveram leve reatividade contra HLA classe I do doador, e somente uma mulher teve 17% de reatividade contra HLA classe II, totalizando 6,3%. Visto que a grande maioria da população neste estudo não teve sensibilizações prévias contra as moléculas HLA do doador. Nossos resultados sugerem que depois do transplante, o sistema imunológico do paciente passou a reconhecer os antígenos HLA do doador ou alguma molécula constitutiva do endotélio vascular, ativando assim os mecanismos que resulta em lesão vascular.

O conceito de que a presença de C4d no endotélio vascular é indicação da presença de rejeição humoral é largamente aceito pela comunidade médica. Entretanto, Hirohashi e colaboradores mostraram em modelo de transplante cardíaco ectópico em camundongos, os anticorpos específicos aos antígenos da molécula MHC classe I do doador desses animais transplantados causaram lesão vascular crônica sem a participação do sistema complemento. Assim, os autores chamam a atenção para os possíveis casos clínicos de rejeição humoral que são C4d negativos (140). Em nossa população de estudo, observamos indivíduos com vasculite, porém negativos para C3d ou C4d, sugerindo que os mecanismos independentes de complemento podem estar atuando na lesão do endotélio.

Observamos uma fraca correlação entre a presença de C4d e a intensidade da vasculite. No entanto, não encontramos associação entre C4d ou vasculite com a DVE. Provavelmente, devido ao número pequeno de indivíduos com DVE (6/63 ou 9,5%) diagnosticados em dois anos de observação. A vasculite associada ou não à rejeição celular tem sido apontada como uma das causas da DVE (141-144). Além disso, a vasculite com presença de macrófagos do fenótipo M2 (145) ou eosinófilo (146) na biópsia endomiocárdica foi associada à piora da evolução do coração transplantado.

Ao analisar a variabilidade longitudinal da expressão gênica, observamos que a maioria dos genes apresentou diminuição de expressão ao longo do tempo. Nos genes *AIF*, *HMOXO1*, *MCP1* e *TGFβ*, as expressões foram significativamente menores no período de T5 (Figura 8). Sabe-se que alguns fatores inerentes ao procedimento cirúrgico do transplante, como a circulação extracorpórea e tempo de isquemia são indutores do processo inflamatório. Provavelmente, no início do transplante há uma intensa atividade inflamatória local; com o passar do tempo e com o uso das drogas imunossupressoras, a inflamação é controlada e os genes são regulados negativamente.

Os medicamentos que fazem a parte da terapia imunossupressora podem alterar a resposta imunológica do receptor, entre eles, a ciclosporina que é a mais usada pelos pacientes transplantados, inclusive pelos pacientes que participaram deste estudo. Sabe-se que a ciclosporina tem ação sobre o fator de transcrição nuclear, inibindo a proliferação de

Discussão

linfócitos, além de alterar o metabolismo lipídico e glicosídico (147;148). Pereira e colaboradores (147) observaram que o uso dos fármacos, como a rapamicina, ciclosporina e tacrolimus, aumentaram a expressão do gene IL-6 em tecido adiposo de indivíduos transplantados, porém nenhum efeito sobre a expressão do TNF α e a adiponectina. Porém outro grupo de pesquisadores observou que os pacientes com psoríase depois do tratamento com ciclosporina tiveram aumento significativo de adiponectina circulante (149)

A adiponectina é secretada principalmente pelo tecido adiposo, capaz de aumentar a captação e metabolismo da glicose e ácidos graxos pelo músculo esquelético (150). No coração, a adiponectina age controlando a hipertrofia patológica do ventrículo e lesão isquêmica, principalmente pela ativação da via AMPK. Além disso, também inibe o fator de transcrição nuclear NFkB, diminuindo a proliferação exagerada da célula muscular lisa (151). Assim, a adiponectina pode atuar nos micro vasos e capilares, aumentando a angiogênese e melhorar a função endotelial por meio da ativação das vias de produção do NOS3 e fatores de crescimento vascular (66). Em tecidos de biópsias endomiocárdicas de pacientes com miocardiopatia dilatada grave, o mRNA e a proteína da adiponectina estavam menos expressos quando comparados aos tecidos cardíacos de indivíduos sem doença cardíaca. Porém, não foram observadas diferenças significantes no nível de expressão dos receptores da adiponectina (152).

Os nossos resultados indicaram uma baixa expressão dos genes *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em indivíduos transplantados. O comportamento da

expressão desses dois receptores não foi diferente ao longo do tempo entre o grupo que recebeu ou não a pulsoterapia imunossupressora (Figura 15-a,b). Provavelmente, a dose de imunossupressão preconizada no início do transplante foi suficiente para inibir a transcrição desses genes, e a carga adicional do medicamento usada na pulsoterapia não teve influência significativa. Infelizmente, devido ao estudo ser retrospectivo, não tivemos soro ou plasma de indivíduos transplantados para determinar níveis plasmáticos da adiponectina.

Os receptores de adiponectina *ADIPOR1* e *ADIPOR2* foram identificados em vários tipos celulares humanos (63), entre eles, células mononucleares do sangue periférico (153;154) e cardiomiócitos em meio de cultura (151). Acredita-se que há no coração um mecanismo específico de ativação dependente dos receptores da adiponectina, e regulado pela via PPAR γ que tem um papel importante na homeostase energético do miocárdio (150). Wang e colegas (155) mostraram que a adiponectina inibe a resposta inflamatória, preferencialmente, por meio do receptor *ADIPOR1*, recrutando a ceramidase e caveolina-1 no processo da sinalização.

Nesse trabalho, observamos uma menor expressão de *ADIPOR1* em todos os indivíduos transplantados nos cinco períodos de observação, em comparação aos tecidos cardíacos antes do transplante (Figura 8-b). Além disso, a expressão de *ADIPOR1* foi significativamente menor nos indivíduos positivos para C4d (Figura 11-a) e houve também uma correlação positiva entre a expressão de *ADIPOR1* e *ADIPOR2* e a expressão do gene *VEGF* (Figura 16). Esses dados sugerem que o padrão de baixa expressão desses

Discussão

três genes é provavelmente influenciado pelos medicamentos imunossupressores e anti-inflamatórios usados por esses pacientes depois do transplante. Visto que a adiponectina e VEGF em sinergismo favorecem a angiogênese e função endotelial (66), é possível que os níveis baixos de receptores da adiponectina e VEGF no órgão transplantado contribuam para a piora da evolução do enxerto. Vale ressaltar que até o momento, há poucos trabalhos sobre adiponectina e seus receptores no contexto do transplante cardíaco humano; certamente, estudos mais aprofundados no futuro poderiam contribuir para melhor entendimento sobre a tolerância do enxerto pelo sistema imune do receptor.

É de consenso da comunidade científica que a maior sobrevida do órgão transplantado depende do controle eficiente da resposta imune do receptor contra o tecido do doador. Mas a resposta protetora do enxerto mediada pela expressão de uma série de genes também tem sido atribuída como responsável pela maior sobrevida do enxerto. Assim, escolhemos um grupo de genes protetores para que seja avaliado neste estudo, entre eles o gene *HMOX-1* que codifica a enzima heme oxygenase-1 (HO-1).

Em um estudo realizado com biópsias endomiocárdicas de 18 pacientes transplantados cardíacos, observou-se uma correlação inversa entre a expressão da proteína HO-1 e o grau de apoptose do cardiomiócito, sugerindo o papel citoprotetor do HO-1(156). Outro trabalho realizado em modelo murinho de transplante cardíaco, os pesquisadores observaram que a expressão aumentada de HO-1 no enxerto cardíaco estava associada à maior sobrevida do animal (157).

No nosso trabalho, detectamos uma diminuição significativa da expressão de *HMOX-1* ao longo dos períodos pós-transplante (Figura 8-e). Igualmente, Souza e colaboradores (158) mostraram que a expressão do gene *HMOX-1* em biópsias endomiocárdicas estava aumentada nos primeiros meses de transplante e depois decresce com o tempo. Além disso, a proteína HO-1 foi detectada nas células infiltradas, e não nas células parenquimais, mostrando a função reguladora das células imunes.

Observamos também que o gene *HMOX-1* foi menos expresso no grupo de indivíduos C4d positivos do que sua contraparte em quase todos os períodos de observação, principalmente no período T2, onde a diferença foi estatisticamente significativa (Figura 11-d). No entanto, não observamos diferenças significantes em outros parâmetros como: rejeição celular, vasculite, VAC. Em síntese, no início do transplante, os genes protetores como *HMOX-1* são mais expressos para tentar limitar a lesão do enxerto, e assim, controlar a inflamação local e manter a viabilidade celular do enxerto.

O gene *BCL2L1* é considerado um gene protetor devido à ação anti-apoptótica do seu transcrito. No contexto do transplante cardíaco, vários grupos de pesquisadores mostraram a forte associação entre a expressão aumentada do fator anti-apoptótico Bcl-xL (proteína codificada pelo gene *BCL2L1*) em linfócitos T e rejeição celular do enxerto cardíaco (159-161). Por outro lado, Huang e colaboradores (162) realizaram transfecção do gene Bcl-xL por adenovírus em ratos, a fim de verificar o efeito protetor da Bcl-xL durante o tempo de isquemia fria antes do transplante cardíaco heterotópico. Os dados indicaram que a maior expressão da Bcl-xL estava associada à

Discussão

redução significativa da área do infarto. O efeito dessa proteção foi devido ao aumento da expressão da Bcl-xL que atuou na inibição da translocação da Bax do citosol mitocondrial, desse modo, diminuindo a liberação de citocromo C pela mitocôndria, resultando em redução do efeito apoptótico nos cardiomiócitos, e por consequência, maior sobrevida do órgão transplantado.

Tung e colaboradores (86) avaliaram a expressão das proteínas Bcl-2, Bcl-xL e Bax no miocárdio e artérias coronárias de aloenxertos cardíacos com rejeição crônica, em comparação com tecidos provenientes de miocardiopatia isquêmica e do coração normal do doador. Observaram diferenças no perfil de expressão dessas proteínas entre os três grupos analisados, provavelmente devido à patogenia peculiar de cada grupo. Os autores concluíram que o equilíbrio entre a disponibilidade biológica das proteínas Bcl-2 e Bax contribui para maior sobrevida do enxerto cardíaco.

Nos cinco períodos de transplante analisados neste trabalho, mais de 50% dos indivíduos tiveram níveis de expressão do gene *BCL2L1* menores do que os controles antes do transplante (Figura 9). O padrão de baixa expressão também foi observado em indivíduos com rejeição humoral (Figura 11-c) e em indivíduos com vasculite (Figura 13-b). Quando comparou os indivíduos com e sem rejeição celular, não foi detectada diferença entre os dois grupos, porém ambos os grupos apresentaram baixa expressão do gene *BCL2L1* em relação ao tecido antes do transplante.

Sabe-se que o aumento da expressão do *BCL2L1* nos linfócitos T está associado à maior incidência de rejeição celular (159;160). Por outro

lado, a expressão desse gene aumentada em cardiomiócito ou células endoteliais está associada à proteção ao tecido contra apoptose. Nós não avaliamos separadamente as populações de células do enxerto cardíaco, mas o padrão de baixa expressão desse gene foi observado em tipos de rejeições que envolvem lesão do endotélio vascular, como na rejeição humoral e vasculite. No contexto do transplante, a baixa expressão de *BCL2L1* é interessante para controlar a rejeição celular, mas esse padrão de expressão pode contribuir para lesão do endotélio nos casos de rejeição humoral e vasculite.

Em relação à função do VEGF, há uma dicotomia na literatura. Alguns trabalhos relatam a importante função do VEGF na angiogênese, tanto fisiológica quanto patológica, como no câncer (97;163) e no transplante renal (92;93;95), foi atribuída a capacidade de estimular a proliferação e migração das células endoteliais, protegendo essas células contra apoptose e senescência (97;98). Por outro lado, alguns trabalhos mostram a função pró-inflamatória do VEGF, que age na permeabilidade do endotélio vascular, aumentando a expressão da molécula de adesão, citocinas e quimiocinas, e por consequência, maior recrutamento dos leucócitos e maior frequência de rejeição celular e doença vascular do enxerto (164-166).

Uma grande maioria da nossa população de estudo apresentou expressão de *VEGF* menor do que as amostras de biópsias antes do transplante. É interessante observar que os indivíduos livres de vasculite apresentaram níveis de expressão de *VEGF* semelhantes aos dos doadores antes do transplante, ao passo que os indivíduos com vasculite tiveram

Discussão

níveis de expressão significativamente mais baixos (Figura 13-g). Provavelmente, a baixa expressão de *VEGF* contribuiu para a lesão vascular, resultando na vasculite observada no exame microscópico.

Observamos também que os indivíduos que receberam pulsoterapia para controlar a rejeição celular tiveram o comportamento de expressão de *VEGF* significativamente maior nos quatro primeiros períodos de transplante (Figura 15-o). Considerando a função pró-inflamatória do VEGF, o grupo que recebeu pulsoterapia provavelmente recrutou mais linfócitos e monócitos para o sítio alvo, assim, desencadeando o processo de inflamação que resultou em rejeição celular.

A literatura tem mostrado que o nível elevado de VEGF favorece o desenvolvimento da VAC. Segundo a pesquisa de Lemstrom e colaboradores (167), o nível elevado de VEGF produzido pelos cardiomiócitos e células infiltrantes do enxerto correlacionou-se à maior lesão arteriosclerótica da coronária do coração transplantado, mas quando foi administrado bloqueador de receptor do VEGF, notaram uma redução significativa de lesão arteriosclerótica. Em outro trabalho em modelo murinho de transplante cardíaco com total incompatibilidade MHC, os animais que foram tratados com captopril (inibidor de ECA) apresentaram diminuição de VEGF e PDGF plasmático, consequentemente, diminuição significativa da proliferação da neoíntima vascular (168).

No nosso trabalho, nenhum dos 6 indivíduos com desfecho clínico de VAC apresentou aumento da expressão do *VEGF*. Provavelmente, os fármacos utilizados influenciaram na baixa expressão desse gene. No

entanto, ressaltamos novamente que o número pequeno de indivíduos nesse grupo não permitiu chegar a conclusões contundentes.

Outro gene avaliado foi o *NOS2*. Os experimentos realizados em tecidos cardíacos de indivíduos falecidos por morte súbita sem sintomas de doenças cardíacas, não detectaram expressão de *NOS2* no tecido cardíaco desses indivíduos (169;170). Porém, outros trabalhos mostraram que a expressão de *NOS2* foi detectada em 50% dos corações doados para o transplante. E nos corações doentes retirados dos receptores, a expressão de *NOS2* foi maior nos casos de miocardiopatia dilatada do que em miocardiopatia isquêmica (170;171). Nas sete amostras de biópsias obtidas do coração doado, minutos antes do transplante, que fizeram parte do grupo controle desta pesquisa, a expressão do gene *NOS2* foi detectada em todas as amostras. Esses dados em conjunto mostram que a expressão do *NOS2* é induzida em situações fisiológicas desfavoráveis e varia de acordo com o estado fisiopatológico da doença.

Observamos que os grupos que tiveram a rejeição humoral e vasculite apresentaram uma baixa expressão de *NOS2* quando comparados aos seus respectivos contrapartes. Porém, a diferença não foi observada na rejeição celular. Sugerindo a baixa expressão desse gene pode estar associada à lesão do endotélio vascular.

Há uma via de apoptose mediada pela *NOS2* descrita na literatura. Segundo os autores, a forma induzida de NOS age regulando positivamente a síntese da proteína Bax (pró-apoptótica) e reprime as proteínas Bcl-2 e Bcl-xL (anti-apoptóticas) (172). Nós observamos uma fraca

Discussão

correlação ($r=0,2551$) entre a expressão de *NOS2* e *BCL2L1* (o gene que codifica as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL). Além disso, os grupos com rejeição humoral e vasculite apresentaram a menor expressão de *NOS2* e *BCL2L1* em comparação às suas contrapartes. Os nossos resultados não são conclusivos, será necessário aprofundar a investigação sobre a função do *NOS2* no contexto do transplante cardíaco.

Avaliamos também os genes cujos transcritos tem o efeito inflamatório, são eles, os genes que codificam as citocinas AIF-1, IL-6, TNF α , INF γ , as moléculas de adesão ICAM, VCAM e quimiocina MCP1.

Além dos medicamentos imunossupressores que podem suprimir os genes inflamatórios, vale lembrar que a maioria dos pacientes transplantados utiliza medicamentos derivados de estatina como parte da terapia. A estatina é um fármaco usado primariamente para o tratamento de hipercolesterolemia na prevenção de doenças ateroscleróticas, sua ação sobre a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzima A redutase (HMG-CoA) tem efeito anti-inflamatório e imunomodulador (173), favorecendo a proliferação celular, angiogênes, e melhorando a função endotelial (174;175). No transplante cardíaco, observou-se que a estatina reduz a incidência de VAC e rejeição, e, com isso, prolonga a sobrevida do enxerto (176-178). Assim sendo, o uso de estatina em pacientes transplantados deve interferir na expressão dos genes inflamatórios avaliados neste trabalho.

Do mesmo modo observado por Nagakawa e colaboradores (119), nossos resultados também indicaram uma maior expressão do gene *AIF-1* na fase inicial do transplante, quando o processo inflamatório é mais intenso,

decrecendo significativamente com passar do tempo, quando a inflamação diminui naturalmente ou devido aos medicamentos que fazem parte da terapia imunossupressora (Figura 8-a). A expressão de *AIF-1* também foi maior no grupo com rejeição celular (Figura 12-b), e no período tardio da VAC (Figura 14-c), porém não houve diferença quanto à rejeição humoral e vasculite. Esses resultados sugerem que as células imunes infiltradas no enxerto, como linfócitos e macrófagos são provavelmente responsáveis pela expressão aumentada de *AIF-1* em tecido cardíaco após o transplante.

Observamos grande dispersão nos resultados da expressão dos genes *IL-6*, *TNF α* e *INF γ* (Figura 8), sugerindo que houve comportamento bastante heterogêneo entre indivíduos. Sabe-se que esses genes transcrevem as citocinas que têm ação pleiotrópica e pró-inflamatória. Elas são produzidas principalmente pelos linfócitos e macrófagos infiltrados que atuam no processo de rejeição do órgão transplantado (179-181).

Entre os genes inflamatórios avaliados neste estudo, o gene *INF γ* foi o único significativamente mais expresso na rejeição celular e na vasculite. Esse resultado está em concordância com os dados obtidos pelo Reinders e colaboradores (164) em modelo de transplante em camundongos, o qual mostrou que as citocinas *INF γ* e VEGF em sinergismo foram capazes de ativar as células endoteliais a produzir potentes quimiocinas, resultando em maior recrutamento de linfócitos T e macrófagos envolvidos na rejeição celular.

Diferentemente dos dados da literatura, que apontam o aumento da expressão dos genes *IL-6*, *TNF α* e *TGF β* na rejeição celular (181) e na

Discussão

doença arterial coronariana do transplante (182), nós não observamos diferenças significantes na expressão desses genes nos grupos com e sem rejeição celular e VAC.

Em relação às moléculas de adesão ICAM e VCAM, elas têm a função de mediar a interação entre o endotélio vascular e os leucócitos circulantes, facilitando a migração das células imunes para os tecidos adjacentes ao endotélio. Nossos resultados mostraram que na maioria dos indivíduos transplantados, a expressão do gene *ICAM* foi semelhante aos tecidos cardíaco do doador antes do transplante, enquanto o *VCAM* foi mais expresso em torno de 40% dos indivíduos transplantados (Figura 9). Nossos resultados indicam que houve maior ativação do endotélio vascular com maior transcrição do gene *VCAM* após o transplante. Além disso, observamos a expressão aumentada desse gene na rejeição humoral (Figura 11-g), na rejeição celular (Figura 12-d) e nos indivíduos com vasculite (Figura 13-d). Nossos resultados corroboram com os dados da literatura, cuja expressão aumentada do *VCAM* tem sido associada à rejeição celular e VAC (87;183)

Observamos também no grupo com rejeição celular, a expressão do gene *MCP-1* significativamente aumentada, sugerindo o maior recrutamento de macrófagos para o enxerto. No entanto, não observamos diferenças significantes na expressão desse mesmo gene na rejeição humoral, vasculite ou VAC. Alguns trabalhos da literatura mostram que a *MCP-1* está diretamente associada às doenças cardiovasculares e na rejeição aguda do transplante cardíaco (106;184;185), porém outros pesquisadores não

observaram associação entre o aumento de MCP-1 e a rejeição celular no transplante cardíaco (186). Além disso, a expressão dos genes inflamatórios em geral diminui após três meses de transplante, inclusive MCP-1 (187).

Apesar do número pequeno de indivíduos com VAC na nossa população de estudo, os nossos resultados indicam que o perfil de expressão gênica nesse grupo se assemelha ao grupo com rejeição celular (Figura 17). É possível que a patogenia da VAC seja decorrente da rejeição celular ocorrida na fase precoce do transplante. O trabalho que poderia reforçar essa hipótese foi realizado pelo Dong e colaboradores (188), no qual, mostraram por tomografia coronariana que os indivíduos com história de rejeição celular grave (grau 3R da ISHLT), também tiveram maior espessamento da camada íntima da artéria coronariana.

Em fim, conhecendo melhor o comportamento desses genes no contexto do transplante permitiu identificar alguns possíveis alvos terapêuticos, principalmente relacionados aos genes protetores que foram discutidos anteriormente nos momentos oportunos. Acreditamos que as tecnologias avançadas, como proteínas recombinantes, terapia gênica ou nanotecnologia, possibilitariam o desenvolvimento de estratégias terapêuticas com foco na modulação da expressão gênica visando a tolerância do enxerto pelo sistema imune do receptor e maior sobrevida do paciente transplantado.

6 - CONCLUSÕES

Conclusões

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

- 1- A maior frequência de positividade para C4d e vasculite em relação ao teste de PRA (painel de reatividade de anticorpos) realizado antes do transplante, indica que após o transplante, o sistema imune do receptor passou a reconhecer os antígenos leucocitários humanos (HLA) ou outras proteínas constitutivas do órgão transplantado.
- 2- Houve uma mudança no perfil de expressão gênica no tecido cardíaco, após o transplante, com o aumento da expressão dos genes inflamatórios (*AIF-1*, *TNF α* , *IL-6*, *NOS2* e *VCAM*) e diminuição da expressão dos genes protetores (*ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1* e *VEGF*).
- 3- A expressão aumentada do gene *VCAM* associada à baixa expressão dos genes protetores (*ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *BCL2L1* e *VEGF*) é indicativo de maior recrutamento das células inflamatórias e supressão dos efeitos anti-inflamatórios, anti-apoptóticos e anti-proliferativos desses genes no órgão transplantado, o que contribui para a maior gravidade da rejeição.

7 – APÊNDICE

Apêndice

Apêndice 1: Distribuição da frequência de indivíduos transplantados segundo o tempo de transplante e nível de expressão relativa em cada gene analisado.

		Genes						
		ADIPOR1	ADIPOR2	AIF-1	BCL2L1	HMOXO1	IL-6	NOS2
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
T1	aumento	0	0	18 (28,6)	0	25 (39,7)	8 (12,7)	17 (27,0)
n = 63	equivalente	0	15 (23,8)	35 (55,5)	28 (44,4)	31 (49,2)	19 (30,2)	24 (38,1)
	diminuição	63 (100)	48 (76,2)	10 (15,9)	35 (55,6)	7 (11,1)	36 (57,1)	22 (34,9)
T2	aumento	0	0	16 (25,4)	2 (3,2)	12 (19,0)	7 (11,1)	25 (39,7)
n = 63	equivalente	0	19 (30,2)	33 (52,4)	25 (39,7)	44 (69,9)	16 (25,4)	24 (38,1)
	diminuição	63 (100)	44 (69,8)	14 (22,2)	36 (57,1)	7 (11,1)	40 (63,5)	14 (22,2)
T3	aumento	0	0	11 (17,5)	0	11 (17,5)	12 (19,0)	31 (49,2)
n = 63	equivalente	0	26 (41,3)	27 (42,8)	29 (46,0)	34 (54,0)	13 (20,6)	16 (25,4)
	diminuição	63 (100)	37 (58,7)	25 (39,7)	34 (54,0)	18 (28,5)	38 (60,4)	16 (25,4)
T4	aumento	0	0	14 (22,2)	0	9 (14,3)	12 (19,0)	24 (38,1)
n = 63	equivalente	1 (1,6)	24 (38,1)	27 (42,9)	27 (42,9)	32 (50,8)	17 (27,0)	20 (31,7)
	diminuição	62 (98,4)	39 (61,9)	22 (34,9)	36 (57,1)	22 (34,9)	34 (54,0)	19 (30,2)
T5	aumento	0	0	4 (8,3)	0	6 (12,5)	8 (16,7)	19 (39,6)
n = 48	equivalente	0	14 (29,2)	21 (43,8)	18 (37,5)	26 (54,2)	12 (25,0)	16 (33,3)
	diminuição	48 (100)	34 (70,8)	23 (47,9)	30 (62,5)	16 (33,3)	28 (58,3)	13 (27,1)
		Genes						
		ICAM	VCAM	INF γ	MCP1	TGF β	TNF	VEGF
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
T1	aumento	13 (20,6)	41 (65,1)	16 (25,4)	0	2 (3,2)	10 (15,9)	0
n = 63	equivalente	46 (73,0)	20 (31,7)	12 (19,0)	10 (15,9)	51 (80,9)	11 (17,5)	13 (20,6)
	diminuição	4 (6,4)	2 (3,2)	35 (55,6)	53 (84,1)	10 (15,9)	42 (66,6)	50 (79,4)
T2	aumento	4 (6,3)	42 (66,7)	14 (22,2)	0	0	12 (19,0)	0
n = 63	equivalente	55 (87,4)	21 (33,3)	18 (28,6)	3 (4,8)	55 (87,3)	20 (31,8)	17 (27,0)
	diminuição	4 (6,3)	0	31 (49,2)	60 (95,2)	8 (12,7)	31 (49,2)	46 (73,0)
T3	aumento	11 (17,5)	44 (69,8)	16 (25,4)	0	1 (1,6)	12 (19,0)	0
n = 63	equivalente	47 (74,6)	18 (28,6)	12 (19,0)	3 (4,8)	50 (79,4)	17 (27,0)	24 (38,1)
	diminuição	5 (7,9)	1 (1,6)	35 (55,6)	60 (95,2)	12 (19,0)	34 (54,0)	39 (61,9)
T4	aumento	10 (15,9)	37 (58,7)	18 (28,5)	0	0	10 (15,9)	0
n = 63	equivalente	49 (77,8)	24 (38,1)	11 (17,5)	0	53 (84,1)	19 (30,1)	18 (28,6)
	diminuição	4 (6,3)	2 (3,2)	34 (54,0)	63 (100)	10 (15,9)	34 (54,0)	45 (69,2)
T5	aumento	6 (12,5)	26 (54,2)	13 (27,1)	0	0	8 (16,7)	0
n = 48	equivalente	35 (72,9)	21 (43,7)	15 (31,2)	1 (2,1)	28 (58,3)	14 (29,2)	10 (20,8)
	diminuição	7 (14,6)	1 (2,1)	20 (41,7)	47 (97,9)	20 (41,7)	26 (54,1)	38 (79,2)

Tempos de transplante: T1 (30 dias); T2 (90 dias); T3 (180 dias); T4 (360 dias) e T5 (720 dias). Os valores destacados em azul, amarelo ou rosa correspondem à proporção de indivíduos maior do que 50% com expressão relativa diminuída, equivalente ou aumentada, respectivamente.

Apêndice 2: Resultados da ANOVA não paramétrica para as medidas de expressão gênica em relação à vasculopatia do aloenxerto cardíaco (VAC).

Genes	Efeito	Estatística ANOVA	g.l.	p-valor
ADIPOR1	Grupo	0,4	1	0,510
	Tempo	0,3	2	0,611
	Interação (Grupo * Tempo)	0,1	2	0,799
ADIPOR2	Grupo	1,4	1	0,2424
	Tempo	28,0	4	0,0001
	Interação (Grupo * Tempo)	35,4	4	0,0001
AIF	Grupo	0,2	1	0,6606
	Tempo	7,3	4	0,1195
	Interação (Grupo * Tempo)	8,7	4	0,0690
BCL2L1	Grupo	0,5	1	0,4759
	Tempo	1,0	2	0,3648
	Interação (Grupo * Tempo)	2,1	2	0,1221
HMOXO1	Grupo	0,0	1	0,9754
	Tempo	17,7	4	0,0014
	Interação (Grupo * Tempo)	4,1	4	0,3907
ICAM	Grupo	0,9	1	0,3440
	Tempo	2,1	1	0,1471
	Interação (Grupo * Tempo)	3,4	1	0,0650
IL-6	Grupo	0,1	1	0,7577
	Tempo	795,0	4	0,0001
	Interação (Grupo * Tempo)	226,6	4	0,0001
INFg	Grupo	0,0	1	0,9163
	Tempo	24,7	4	0,0001
	Interação (Grupo * Tempo)	34,0	4	0,0001
MCP1	Grupo	0,1	1	0,8136
	Tempo	34,6	4	0,0001
	Interação (Grupo * Tempo)	6,0	4	0,1999
NOS2	Grupo	1,2	1	0,2760
	Tempo	2,0	4	0,7431
	Interação (Grupo * Tempo)	11,9	4	0,0180
TGFb	Grupo	0,019	1	0,8905
	Tempo	12,524	4	0,0139
	Interação (Grupo * Tempo)	5,085	4	0,2787
TNF	Grupo	0,982	1	0,3218
	Tempo	18,009	4	0,0012
	Interação (Grupo * Tempo)	11,229	4	0,0241
VCAM	Grupo	0,4	1	0,5389
	Tempo	74,2	4	0,0001
	Interação (Grupo * Tempo)	19,2	4	0,0007
VEGF	Grupo	0,0	1	0,8631
	Tempo	8,1	4	0,0879
	Interação (Grupo * Tempo)	12,8	4	0,0125

Apêndice

Apêndice 3: Resultados da ANOVA não paramétrica para as medidas de expressão gênica em relação à pulsoterapia.

Genes	Efeito	Estatística ANOVA	g.l.	p-valor
ADIPOR1	Grupo	1,4	1	0,245
	Tempo	4,8	4	0,309
	Interação (Grupo * Tempo)	18,1	4	0,001
ADIPOR2	Grupo	3,1	1	0,0759
	Tempo	5,9	4	0,2035
	Interação (Grupo * Tempo)	5,3	4	0,2548
AIF	Grupo	0,1	1	0,7434
	Tempo	26,6	4	0,0001
	Interação (Grupo * Tempo)	1,6	4	0,8019
BCL2L1	Grupo	0,1	1	0,8019
	Tempo	1,5	4	0,8212
	Interação (Grupo * Tempo)	9,5	4	0,0491
HMOXO1	Grupo	1,4	1	0,2421
	Tempo	48,4	4	0,0001
	Interação (Grupo * Tempo)	3,7	4	0,4522
ICAM	Grupo	0,8	1	0,3858
	Tempo	1,4	4	0,8516
	Interação (Grupo * Tempo)	3,5	4	0,4809
IL-6	Grupo	0,4	1	0,5091
	Tempo	2,5	4	0,6525
	Interação (Grupo * Tempo)	0,8	4	0,9380
INFg	Grupo	3,6	1	0,0587
	Tempo	0,6	4	0,9658
	Interação (Grupo * Tempo)	4,5	4	0,3478
MCP1	Grupo	0,1	1	0,7230
	Tempo	10,6	4	0,0315
	Interação (Grupo * Tempo)	7,5	4	0,1112
NOS2	Grupo	0,3	1	0,5876
	Tempo	3,2	4	0,5199
	Interação (Grupo * Tempo)	3,0	4	0,5503
TGFb	Grupo	4,8	1	0,0293
	Tempo	12,7	4	0,0127
	Interação (Grupo * Tempo)	4,9	4	0,2964
TNF	Grupo	2,0	1	0,1522
	Tempo	6,5	4	0,1630
	Interação (Grupo * Tempo)	3,4	4	0,4867
VCAM	Grupo	0,2	1	0,6412
	Tempo	15,7	4	0,0035
	Interação (Grupo * Tempo)	6,7	4	0,1544
VEGF	Grupo	5,593	1	0,0180
	Tempo	9,269	4	0,0547
	Interação (Grupo * Tempo)	18,638	4	0,0009

Apêndice 4: Resultados da ANOVA não paramétrica para as medidas de expressão gênica em relação à alteração na fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Genes	Efeito	Estatística ANOVA	g.l.	p-valor
ADIPOR1	Grupo	0,6	1	0,453
	Tempo	7,2	4	0,127
	Interação (Grupo * Tempo)	5,5	4	0,243
ADIPOR2	Grupo	0,3	1	0,5768
	Tempo	4,2	4	0,3748
	Interação (Grupo * Tempo)	1,5	4	0,8256
AIF	Grupo	4,2	1	0,0410
	Tempo	31,2	4	0,0001
	Interação (Grupo * Tempo)	5,2	4	0,2673
BCL2L1	Grupo	0,6	1	0,4248
	Tempo	2,6	4	0,6221
	Interação (Grupo * Tempo)	8,7	4	0,0699
HMOXO1	Grupo	0,4	1	0,5275
	Tempo	21,6	4	0,0002
	Interação (Grupo * Tempo)	0,9	4	0,9247
ICAM	Grupo	3,0	1	0,0829
	Tempo	2,5	4	0,6396
	Interação (Grupo * Tempo)	2,8	4	0,5922
IL-6	Grupo	1,1	1	0,2910
	Tempo	2,9	4	0,5784
	Interação (Grupo * Tempo)	0,2	4	0,9933
INFg	Grupo	2,4	1	0,1176
	Tempo	1,7	4	0,7958
	Interação (Grupo * Tempo)	2,4	4	0,6641
MCP1	Grupo	0,8	1	0,3863
	Tempo	20,2	4	0,0005
	Interação (Grupo * Tempo)	0,4	4	0,9857
NOS2	Grupo	2,2	1	0,1340
	Tempo	5,7	4	0,2220
	Interação (Grupo * Tempo)	11,5	4	0,0216
TGFb	Grupo	0,3	1	0,6061
	Tempo	9,0	4	0,0616
	Interação (Grupo * Tempo)	9,4	4	0,0511
TNF	Grupo	0,4	1	0,5264
	Tempo	5,8	4	0,2109
	Interação (Grupo * Tempo)	5,8	4	0,2134
VCAM	Grupo	1,2	1	0,2654
	Tempo	14,5	4	0,0058
	Interação (Grupo * Tempo)	2,5	4	0,6364
VEGF	Grupo	0,1	1	0,7207
	Tempo	7,3	4	0,1225
	Interação (Grupo * Tempo)	6,0	4	0,1974

Obs. Os pacientes classificados no grupo com fração de ejeção alterada se no período de observação apresentou pelo menos um resultado de fração de ejeção inferior a 50%.

Apêndice

Apêndice 5: Resultados da ANOVA não paramétrica para as medidas de expressão gênica em relação a óbito.

Genes	Efeito	Estatística ANOVA	g.l.	p-valor
ADIPOR1	Grupo	4,2	1	0,041
	Tempo	5,9	4	0,208
	Interação (Grupo * Tempo)	1,7	4	0,785
ADIPOR2	Grupo	0,2	1	0,6973
	Tempo	7,1	4	0,1314
	Interação (Grupo * Tempo)	3,1	4	0,5423
AIF	Grupo	1,1	1	0,3011
	Tempo	21,0	4	0,0003
	Interação (Grupo * Tempo)	3,3	4	0,5073
BCL2L1	Grupo	1,8	1	0,1779
	Tempo	5,3	4	0,2541
	Interação (Grupo * Tempo)	2,1	4	0,7119
HMOXO1	Grupo	0,6	1	0,4405
	Tempo	24,5	4	0,0001
	Interação (Grupo * Tempo)	2,8	4	0,5943
ICAM	Grupo	2,0	1	0,1556
	Tempo	1,0	4	0,9134
	Interação (Grupo * Tempo)	11,8	4	0,0190
IL-6	Grupo	2,4	1	0,1183
	Tempo	3,2	4	0,5210
	Interação (Grupo * Tempo)	4,3	4	0,3690
INFg	Grupo	3,8	1	0,0514
	Tempo	0,4	4	0,9842
	Interação (Grupo * Tempo)	4,8	4	0,3139
MCP1	Grupo	0,7	1	0,3963
	Tempo	20,0	4	0,0005
	Interação (Grupo * Tempo)	8,2	4	0,0832
NOS2	Grupo	2,9	1	0,0894
	Tempo	15,1	4	0,0045
	Interação (Grupo * Tempo)	1,1	4	0,8957
TGFb	Grupo	2,6	1	0,1067
	Tempo	9,9	4	0,0424
	Interação (Grupo * Tempo)	1,4	4	0,8473
TNF	Grupo	1,2	1	0,2703
	Tempo	8,1	4	0,0881
	Interação (Grupo * Tempo)	4,4	4	0,3603
VCAM	Grupo	0,8	1	0,3807
	Tempo	11,8	4	0,0189
	Interação (Grupo * Tempo)	9,2	4	0,0567
VEGF	Grupo	0,1	1	0,7063
	Tempo	12,9	4	0,0117
	Interação (Grupo * Tempo)	12,0	4	0,0171

Apêndice 6: Resultados da análise de correlação de Spearman entre as expressões de mRNA dos genes

<i>ADIPOR1</i>	<i>NOS2</i>	<i>TNF</i>	<i>ICAM</i>	<i>VCAM</i>	<i>INFg</i>	<i>MCP1</i>	<i>TGFB</i>	<i>VEGF</i>	<i>ADIPOR2</i>	<i>AIF-1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>IL-6</i>
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,1723	0,03951	-0,07688	-0,1374	-0,1779	0,1358	0,2591	0,5688	0,6020	0,05775	0,2741	0,08699	-0,1931
Intervalo de confiança de 95%	0.05684 to 0.2832	-0.07743 to 0.1554	-0.1917 to 0.04007	-0.2500 to -0.02120	-0.2885 to -0.06263	0.01949 to 0.2484	0.1469 to 0.3647	0.4843 to 0.6428	0.5220 to 0.6714	-0.05923 to 0.1732	0.1627 to 0.3786	-0.02990 to 0.2015	-0.3029 to -0.07828
Valor de P (two-tailed)	0,0028	0,4954	0,1842	0,0172	0,0020	0,0186	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0,3188	P<0.0001	0,1328	0,0008
Resumo do Valor de P	**	ns	ns	*	**	*	***	***	***	ns	***	ns	***
Correlação é significativa? (alpha=0.05)	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes
<i>ADIPOR2</i>	<i>NOS2</i>	<i>TNF</i>	<i>ICAM</i>	<i>VCAM</i>	<i>INFg</i>	<i>MCP1</i>	<i>TGFB</i>	<i>VEGF</i>	<i>ADIPOR1</i>	<i>AIF-1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>IL-6</i>
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,1890	0,06889	0,005310	-0,1090	-0,1208	0,07686	0,1885	0,5191	0,6020	0,1759	0,4703	0,09555	0,08854
Intervalo de confiança de 95%	0.07407 to 0.2990	-0.04809 to 0.1840	-0.1113 to 0.1218	-0.2227 to 0.007713	-0.2340 to -0.004223	-0.04009 to 0.1917	0.07357 to 0.2986	0.4284 to 0.5994	0.5220 to 0.6714	0.06054 to 0.2866	0.3742 to 0.5564	-0.02128 to 0.2098	-0.02834 to 0.2030
Valor de P (two-tailed)	0,0010	0,2342	0,9270	0,0594	0,0366	0,1843	0,0010	P<0.0001	P<0.0001	0,0022	P<0.0001	0,0986	0,1260
Resumo do Valor de P	**	ns	ns	ns	*	ns	**	***	***	**	***	ns	ns
Correlação é significativa? (alpha=0.05)	Yes	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
<i>BCL2L1</i>	<i>NOS2</i>	<i>TNF</i>	<i>ICAM</i>	<i>VCAM</i>	<i>INFg</i>	<i>MCP1</i>	<i>TGFB</i>	<i>VEGF</i>	<i>ADIPOR1</i>	<i>ADIPOR2</i>	<i>AIF-1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>IL-6</i>
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,2551	0,1763	-0,01084	-0,2176	0,06443	0,04827	0,1852	0,4096	0,2741	0,4703	0,2762	0,3345	0,4672
Intervalo de confiança de 95%	0.1428 to 0.3610	0.06096 to 0.2870	-0.1273 to 0.1059	-0.3260 to -0.1037	-0.05255 to 0.1797	-0.06870 to 0.1639	0.07017 to 0.2954	0.3077 to 0.5022	0.1627 to 0.3786	0.3742 to 0.5564	0.1649 to 0.3805	0.2267 to 0.4341	0.3708 to 0.5536
Valor de P (two-tailed)	P<0.0001	0,0022	0,8517	0,0001	0,2659	0,4048	0,0013	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
Resumo do Valor de P	***	**	ns	***	ns	ns	**	***	***	***	***	***	***
Correlação é significativa? (alpha=0.05)	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>HMOX1</i>	<i>NOS2</i>	<i>TNF</i>	<i>ICAM</i>	<i>VCAM</i>	<i>INFg</i>	<i>MCP1</i>	<i>TGFB</i>	<i>VEGF</i>	<i>ADIPOR1</i>	<i>ADIPOR2</i>	<i>AIF-1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>IL-6</i>
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,1176	0,1376	0,002874	0,05086	0,04082	0,2803	0,1578	-0,1369	0,08699	0,09555	0,3937	0,3345	0,07465
Intervalo de confiança de 95%	0.001073 to 0.2311	0.02137 to 0.2502	-0.1138 to 0.1194	-0.06612 to 0.1665	-0.07613 to 0.1567	0.1692 to 0.3843	0.04203 to 0.2695	-0.2495 to -0.02068	-0.02990 to 0.2015	-0.02128 to 0.2098	0.2905 to 0.4879	0.2267 to 0.4341	-0.04230 to 0.1896
Valor de P (two-tailed)	0,0417	0,0171	0,9605	0,3800	0,4812	P<0.0001	0,0062	0,0176	0,1328	0,0986	P<0.0001	P<0.0001	0,1973
Resumo do Valor de P	*	*	ns	ns	ns	***	**	*	ns	ns	***	***	ns
Correlação é significativa? (alpha=0.05)	Yes	Yes	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	No

Os números em vermelho indicam uma boa correlação ($r > 0,500$) e os números em azul indicam correlação fraca ($r > 0,02$ e $< 0,05$).

VEGF	NOS2	TNF	ICAM	VCAM	INFg	MCP1	TGFb	ADIPOR1	ADIPOR2	AIF-1	BCL2L1	HMOXO1	IL-6
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,1793	0,06061	0,05097	-0,1029	-0,1945	-0,05614	0,4256	0,5688	0,5191	-0,06617	0,4096	-0,1369	0,07869
Intervalo de confiança de 95%	0.06407 to 0.2898	-0.05637 to 0.1761	-0.06601 to 0.1666	-0.2169 to 0.01388	-0.3042 to -0.07976	-0.1716 to 0.06085	0.3251 to 0.5165	0.4843 to 0.6428	0.4284 to 0.5994	-0.1814 to 0.05081	0.3077 to 0.5022	-0.2495 to -0.02068	-0.03825 to 0.1935
Valor de P (two-tailed)	0,0018	0,2954	0,3791	0,0752	0,0007	0,3325	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0,2532	P<0.0001	0,0176	0,1740
Resumo do Valor de P	**	ns	ns	ns	***	ns	***	***	***	ns	***	*	ns
Correlação é significante? (alpha=0.05)	Yes	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No
TGFb	NOS2	TNF	ICAM	VCAM	INFg	MCP1	VEGF	ADIPOR1	ADIPOR2	AIF-1	BCL2L1	HMOXO1	IL-6
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	-0,004820	0,04201	0,1394	0,03686	0,08403	-0,1643	0,4256	0,2591	0,1885	-0,05870	0,1852	0,1578	0,05792
Intervalo de confiança de 95%	-0.1213 to 0.1118	-0.07495 to 0.1576	0.02319 to 0.2519	-0.08007 to 0.1528	-0.03288 to 0.1987	0.2756 to -0.04868	0.3251 to 0.5165	0.1469 to 0.3647	0.07357 to 0.2986	-0.1741 to 0.05828	0.07017 to 0.2954	0.04203 to 0.2695	-0.05907 to 0.1733
Valor de P (two-tailed)	0,9337	0,4685	0,0157	0,5248	0,1465	0,0043	P<0.0001	P<0.0001	0,0010	0,3109	0,0013	0,0062	0,3174
Resumo do Valor de P	ns	ns	*	ns	ns	**	***	***	**	ns	**	**	ns
Correlação é significante? (alpha=0.05)	No	No	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No
NOS2	TNF	ICAM	VCAM	INFg	MCP1	TGFb	VEGF	ADIPOR1	ADIPOR2	AIF-1	BCL2L1	HMOXO1	IL-6
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,0985	0,2205	-0,04931	-0,04696	0,1493	-0,00482	0,1793	0,1723	0,189	0,05354	0,2551	0,1176	0,06585
Intervalo de confiança de 95%	-0.01830 to 0.2126	0.1067 to 0.3287	-0.1650 to 0.06766	-0.1627 to 0.07001	0.03330 to 0.2613	-0.1213 to 0.1118	0.06407 to 0.2898	0.05684 to 0.2832	0.07407 to 0.2990	-0.06344 to 0.1691	0.1428 to 0.3610	0.001073 to 0.2311	-0.05113 to 0.1810
Valor de P (two-tailed)	0,0886	0,0001	0,3947	0,4177	0,0096	0,9337	0,0018	0,0028	0,001	0,3554	P<0.0001	0,0417	0,2555
Resumo do Valor de P	ns	***	ns	ns	**	ns	**	**	**	ns	***	*	ns
Correlação é significante? (alpha=0.05)	No	Yes	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No
INFg	NOS2	TNF	ICAM	VCAM	MCP1	TGFb	VEGF	ADIPOR1	ADIPOR2	AIF-1	BCL2L1	HMOXO1	IL-6
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	-0,04696	0,4202	-0,06526	0,04495	-0,1114	0,08403	-0,1945	-0,1779	-0,1208	0,07679	0,06443	0,04082	0,3483
Intervalo de confiança de 95%	-0.1627 to 0.07001	0.3193 to 0.5117	-0.1805 to 0.05173	-0.07202 to 0.1607	0.2251 to 0.005215	-0.03288 to 0.1987	-0.3042 to -0.07976	-0.2885 to -0.06263	0.2340 to -0.00422	-0.04016 to 0.1917	0.05255 to 0.1791	-0.07613 to 0.1567	0.2415 to 0.4468
Valor de P (two-tailed)	0,4177	P<0.0001	0,2599	0,4380	0,0538	0,1465	0,0007	0,0020	0,0366	0,1847	0,2659	0,4812	P<0.0001
Resumo do Valor de P	ns	***	ns	ns	ns	ns	***	**	*	ns	ns	ns	***
Correlação é significante? (alpha=0.05)	No	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	No	Yes
AIF	ADIPOR1	NOS2	TNF	ICAM	VCAM	INFg	MCP1	TGFb	VEGF	ADIPOR2	BCL2L1	HMOXO1	IL-6
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,05775	0,05354	0,2798	-0,09306	0,1943	0,07679	0,2778	-0,0587	-0,06617	0,1759	0,2762	0,3937	0,07007
Intervalo de confiança de 95%	-0.05923 to 0.1732	-0.06344 to 0.1691	0.1687 to 0.3839	-0.2074 to 0.02379	0.07949 to 0.3040	-0.04016 to 0.1917	0.1666 to 0.3820	-0.1741 to 0.05828	-0.1814 to 0.05081	0.06054 to 0.2866	0.1649 to 0.3805	0.2905 to 0.4879	-0.04690 to 0.1851
Valor de P (two-tailed)	0,3188	0,3554	P<0.0001	0,1077	0,0007	0,1847	P<0.0001	0,3109	0,2532	0,0022	P<0.0001	P<0.0001	0,2263
Resumo do Valor de P	ns	ns	***	ns	***	ns	***	ns	ns	***	***	***	ns
Correlação é significante? (alpha=0.05)	No	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	No

Os números em vermelho indicam uma boa correlação ($r > 0,500$) e os números em azul indicam correlação fraca ($r > 0,02$ e $< 0,05$).

<i>TNFα</i>	<i>NOS2</i>	<i>ICAM</i>	<i>VCAM</i>	<i>INFg</i>	<i>MCP1</i>	<i>TGFb</i>	<i>VEGF</i>	<i>ADIPOR1</i>	<i>ADIPOR2</i>	<i>AIF-1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>HMOXO1</i>	<i>IL-6</i>
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,09850	-0,2124	0,1132	0,4202	0,04358	0,04201	0,06061	0,03951	0,06889	0,2798	0,1763	0,1376	0,1266
Intervalo de confiança de 95%	-0.01830 to 0.2126	0.3210 to -0.0982	-0.003440 to 0.2268	0.3193 to 0.5117	-0.07338 to 0.1594	-0.07495 to 0.1578	-0.05637 to 0.1760	-0.07743 to 0.1554	-0.04809 to 0.1840	0.1687 to 0.3839	0.06096 to 0.2870	0.02137 to 0.2502	0.01014 to 0.2396
Valor de P (two-tailed)	0,0886	0,0002	0,0502	P<0.0001	0,4520	0,4685	0,2954	0,4954	0,2342	P<0.0001	0,0022	0,0171	0,0284
Resumo do Valor de P	ns	***	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	***	**	*	*
Correlação é significante? (alpha=0.05)	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>IL6</i>	<i>NOS2</i>	<i>TNF</i>	<i>ICAM</i>	<i>VCAM</i>	<i>INFg</i>	<i>MCP1</i>	<i>TGFb</i>	<i>VEGF</i>	<i>ADIPOR1</i>	<i>ADIPOR2</i>	<i>AIF-1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>HMOXO1</i>
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,06585	0,1266	0,2151	-0,09718	0,3483	0,01205	0,05792	0,07869	-0,1931	0,08854	0,07007	0,4672	0,07465
Intervalo de confiança de 95%	-0.05113 to 0.1810	0.01014 to 0.2396	0.1010 to 0.3235	-0.2114 to 0.01963	0.2415 to 0.4468	-0.1047 to 0.1285	-0.05907 to 0.1733	-0.03825 to 0.1935	-0.3029 to -0.07828	-0.02834 to 0.2030	0.04690 to 0.185	0.3708 to 0.5536	-0.04230 to 0.1896
Valor de P (two-tailed)	0,2555	0,0284	0,0002	0,0929	P<0.0001	0,8354	0,3174	0,1740	0,0008	0,1260	0,2263	P<0.0001	0,1973
Resumo do Valor de P	ns	*	***	ns	***	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	ns
Correlação é significante? (alpha=0.05)	No	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No	Yes	No
<i>ICAM</i>	<i>NOS2</i>	<i>TNF</i>	<i>VCAM</i>	<i>INFg</i>	<i>MCP1</i>	<i>TGFb</i>	<i>VEGF</i>	<i>ADIPOR1</i>	<i>ADIPOR2</i>	<i>AIF-1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>HMOXO1</i>	<i>IL-6</i>
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,2205	-0,2124	-0,003769	-0,06526	0,2814	0,1394	0,05097	-0,07688	0,005310	-0,09306	-0,01084	0,002874	0,2151
Intervalo de confiança de 95%	0.1067 to 0.3287	0.3210 to -0.0982	-0.1203 to 0.1129	-0.1805 to 0.05173	0.1704 to 0.3853	0.02319 to 0.2519	-0.06601 to 0.1666	-0.1917 to 0.04007	-0.1113 to 0.1218	-0.2074 to 0.02379	-0.1273 to 0.1059	-0.1138 to 0.1194	0.1010 to 0.3235
Valor de P (two-tailed)	0,0001	0,0002	0,9482	0,2599	P<0.0001	0,0157	0,3791	0,1842	0,9270	0,1077	0,8517	0,9605	0,0002
Resumo do Valor de P	***	***	ns	ns	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***
Correlação é significante? (alpha=0.05)	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes
<i>VCAM</i>	<i>ADIPOR1</i>	<i>NOS2</i>	<i>TNF</i>	<i>ICAM</i>	<i>INFg</i>	<i>MCP1</i>	<i>TGFb</i>	<i>VEGF</i>	<i>ADIPOR2</i>	<i>AIF-1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>HMOXO1</i>	<i>IL-6</i>
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	-0,1374	-0,04931	0,1132	-0,003769	0,04495	0,2446	0,03686	-0,1029	-0,1090	0,1943	-0,2176	0,05086	-0,09718
Intervalo de confiança de 95%	-0.2500 to -0.02120	0.1650 to 0.06766	-0.003440 to 0.2268	-0.1203 to 0.1129	-0.07202 to 0.1607	0.1317 to 0.3511	-0.08007 to 0.1528	-0.2169 to 0.01388	-0.2227 to 0.007713	0.07949 to 0.3040	-0.3260 to -0.1037	-0.06612 to 0.1665	-0.2114 to 0.01963
Valor de P (two-tailed)	0,0172	0,3947	0,0502	0,9482	0,4380	P<0.0001	0,5248	0,0752	0,0594	0,0007	0,0001	0,3800	0,0929
Resumo do Valor de P	*	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	***	***	ns	ns
Correlação é significante? (alpha=0.05)	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	No
<i>MCP1</i>	<i>NOS2</i>	<i>TNF</i>	<i>ICAM</i>	<i>VCAM</i>	<i>INFg</i>	<i>TGFb</i>	<i>VEGF</i>	<i>ADIPOR1</i>	<i>ADIPOR2</i>	<i>AIF-1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>HMOXO1</i>	<i>IL-6</i>
Número de pares X e Y	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
r Spearman	0,1493	0,04358	0,2814	0,2446	-0,1114	-0,1643	-0,05614	0,1358	0,07686	0,2778	0,04827	0,2803	0,01205
Intervalo de confiança de 95%	0.03330 to 0.2613	-0.07338 to 0.1594	0.1704 to 0.3853	0.1317 to 0.3511	-0.2251 to 0.005215	0.2756 to -0.04866	-0.1716 to 0.06085	0.01949 to 0.2484	-0.04009 to 0.1917	0.1666 to 0.3820	-0.06870 to 0.1636	0.1692 to 0.3843	-0.1047 to 0.1285
Valor de P (two-tailed)	0,0096	0,4520	P<0.0001	P<0.0001	0,0538	0,0043	0,3325	0,0186	0,1843	P<0.0001	0,4048	P<0.0001	0,8354
Resumo do Valor de P	**	ns	***	***	ns	**	ns	*	ns	***	ns	***	ns
Correlação é significante? (alpha=0.05)	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No

Os números em vermelho indicam uma boa correlação ($r > 0,500$) e os números em azul indicam correlação fraca ($r > 0,02$ e $< 0,05$).

Anexos

Anexo 1: Parecer do comitê de ética em pesquisa dispensando a aplicação do TCLE em sujeitos de pesquisa.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

À
Hui-Tzu Lin Wang
Investigadora Principal
Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 4013
(este nº. deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)

Projeto de Pesquisa Clínica/ Tese Doutorado: "Avaliação da Expressão Gênica e Molecular na Rejeição Humoral e Vasculopatia do Enxerto no Transplante Cardíaco".

Referente: Emenda

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia diante de suas atribuições analisou e aprovou em reunião ordinária a Emenda ao Protocolo de Pesquisa supracitado, onde:

Título Anterior: "Avaliação da Expressão Gênica e Molecular na Rejeição Humoral e Vasculopatia do Enxerto no Transplante Cardíaco".

Título Atual: "Estudo sequencial do perfil de expressão gênica em biópsias endomiocárdicas parafinadas: associação com rejeição humoral e vasculopatia do aloenxerto cardíaco".

Motivo da alteração: Mudança do material biológico a ser analisado; de sangue periférico para os tecidos de biópsias endomiocárdicas parafinados do arquivo de patologia. O material que será utilizado na pesquisa foi coletado durante o acompanhamento clínico e faz parte do protocolo de rotina de monitoramento de rejeição.

O CEP autoriza a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.,

São Paulo, 03 de abril de 2012.

Pedro Silvio Farsky
Coordenador CEP
CRM 55073

Hui-Tzu Lin Wang
Investigadora Principal

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 • Fone: (11) 5085 6040 • E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

9- REFERÊNCIAS

Referências

- (1) Gaudiani VA, Stinson EB, Alderman E, Hunt SA, Schroeder JS, Perlroth MG, et al. Long-term survival and function after cardiac transplantation. *Ann Surg* 1981 Oct;194(4):381-5.
- (2) Hunt SA, Stinson EB. Cardiac transplantation. *Annu Rev Med* 1981;32:213-20.
- (3) Aguiar MF, Farias DR, Pinheiro ML, Chave ES, Rolim ILT, Almeida PC. Qualidade de vida de pacientes submetidos ao transplante cardíaco: aplicação da escala Whoqol-Bref. *Arq Bras Cardiol* 2011;96(1):60-8.
- (4) Drodriques da Silva P. Transplante cardíaco e cardiopulmonar: 100 anos de história e 40 de existência. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2008;23(1):145-52.
- (5) Costa IA. História da cirurgia cardíaca brasileira. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 1998;13(1):1-7.
- (6) Meine TJ, Russell SD. A history of orthotopic heart transplantation. *Cardiol Rev* 2005 Jul;13(4):190-6.
- (7) DiBardino DJ. The history and development of cardiac transplantation. *Tex Heart Inst J* 1999;26(3):198-205.
- (8) Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Dipchand AI, Benden C, Christie JD, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirtieth official adult heart transplant report--2013; focus theme: age. *J Heart Lung Transplant* 2013 Oct;32(10):951-64.
- (9) Hertz MI, Aurora P, Benden C, Christie JD, Dobbels F, Edwards LB, et al. Scientific Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: introduction to the 2011 annual reports. *J Heart Lung Transplant* 2011 Oct;30(10):1071-7.
- (10) Assef MAS, Valbuena PFMF, Neves MT, Correia EB, Vasconcelos M, Manrique M, et al. Transplante cardíaco no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia: análise da sobrevida. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 16, 289-304. 2001.
- (11) Branco JNR, Teles CA, Aguiar LF, Vargas GF, Hossne Jr MA, Andrade JCS, et al. Transplante cardíaco ortotópico: experiência na Universidade Federal de São Paulo. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 13, 285-294. 1998.

- (12) Taylor DO, Edwards LB, Aurora P, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult heart transplant report--2008. *J Heart Lung Transplant* 2008 Sep;27(9):943-56.
- (13) Lopez MM, Valenzuela JE, Alvarez FC, Lopez-Alvarez MR, Cecilia GS, Paricio PP. Long-term problems related to immunosuppression. *Transpl Immunol* 2006 Dec;17(1):31-5.
- (14) Tanabe T, Morita K, Fujita H, Hatanaka K, Ogawa Y, Hirose T, et al. Long-term clinicopathological impact of calcineurin inhibitor cessation without specific cytoinductive induction in kidney transplantation. *Clin Transplant* 2013 Nov;27 Suppl 26:9-13.
- (15) Bacal F, Souza Neto JD, Fiorelli AI, Mejia J, Marcondes-Braga FG, Mangini S, et al. II Diretriz brasileira de transplante cardíaco. *Arq Bras Cardiol* 2010;94(1):16-73.
- (16) Unlap T, Jope RS. Inhibition of NFkB DNA binding activity by glucocorticoids in rat brain. *Neurosci Lett* 1995 Sep 22;198(1):41-4.
- (17) Williams CR, Gooch JL. Calcineurin inhibitors and immunosuppression - a tale of two isoforms. *Expert Rev Mol Med* 2012;14:e14.
- (18) Wiederrecht GJ, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ, Abraham RT. Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res* 1995;1:53-71.
- (19) Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000 May;47(2-3):85-118.
- (20) Kushwaha SS, Khalpey Z, Frantz RP, Rodeheffer RJ, Clavell AL, Daly RC, et al. Sirolimus in cardiac transplantation: use as a primary immunosuppressant in calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity. *J Heart Lung Transplant* 2005 Dec;24(12):2129-36.
- (21) Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005 Nov;24(11):1710-20.
- (22) Kfoury AG, Hammond ME, Snow GL, Drakos SG, Stehlik J, Fisher PW, et al. Cardiovascular mortality among heart transplant recipients with asymptomatic antibody-mediated or stable mixed cellular and antibody-mediated rejection. *J Heart Lung Transplant* 2009 Aug;28(8):781-4.

Referências

- (23) Kfoury AG, Renlund DG, Snow GL, Stehlik J, Folsom JW, Fisher PW, et al. A clinical correlation study of severity of antibody-mediated rejection and cardiovascular mortality in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2009 Jan;28(1):51-7.
- (24) Cai J, Terasaki PI. Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunol* 2005 Apr;66(4):334-42.
- (25) Lones MA, Czer LS, Trento A, Harasty D, Miller JM, Fishbein MC. Clinical-pathologic features of humoral rejection in cardiac allografts: a study in 81 consecutive patients. *J Heart Lung Transplant* 1995 Jan;14(1 Pt 1):151-62.
- (26) Berry GJ, Angelini A, Burke MM, Bruneval P, Fishbein MC, Hammond E, et al. The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: evolution and current status (2005-2011). *J Heart Lung Transplant* 2011 Jun;30(6):601-11.
- (27) Berry GJ, Burke MM, Andersen C, Bruneval P, Fedrigo M, Fishbein MC, et al. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013 Dec;32(12):1147-62.
- (28) Tavora F, Munivenkatappa R, Papadimitriou J, Drachenberg C, Sailey C, Mehra M, et al. Endothelitis in cardiac allograft biopsy specimens: possible relationship to antibody-mediated rejection. *J Heart Lung Transplant* 2011 Apr;30(4):435-44.
- (29) Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2010 Feb;15(1):42-8.
- (30) Haas M. C4d-negative antibody-mediated rejection in renal allografts: evidence for its existence and effect on graft survival. *Clin Nephrol* 2011 Apr;75(4):271-8.
- (31) Keslar K, Rodriguez ER, Tan CD, Starling RC, Heeger PS. Complement gene expression in human cardiac allograft biopsies as a correlate of histologic grade of injury. *Transplantation* 2008 Nov 15;86(9):1319-21.
- (32) Farrar CA, Zhou W, Lin T, Sacks SH. Local extravascular pool of C3 is a determinant of postischemic acute renal failure. *FASEB J* 2006 Feb;20(2):217-26.

-
-
- (33) Zhou W, Medof ME, Heeger PS, Sacks S. Graft-derived complement as a mediator of transplant injury. *Curr Opin Immunol* 2007 Oct;19(5):569-76.
 - (34) Costello JP, Mohanakumar T, Nath DS. Mechanisms of chronic cardiac allograft rejection. *Tex Heart Inst J* 2013;40(4):395-9.
 - (35) Bacal F, Veiga VC, Fiorelli AI, Bellotti G, Bocchi EA, Stolf NA, et al. Analysis of the risk factors for allograft vasculopathy in asymptomatic patients after cardiac transplantation. *Arq Bras Cardiol* 2000 Nov;75(5):421-8.
 - (36) Greenberg ML, Uretsky BF, Reddy PS, Bernstein RL, Griffith BP, Hardesty RL, et al. Long-term hemodynamic follow-up of cardiac transplant patients treated with cyclosporine and prednisone. *Circulation* 1985 Mar;71(3):487-94.
 - (37) Gao SZ, Schroeder JS, Alderman EL, Hunt SA, Silverman JF, Wiederhold V, et al. Clinical and laboratory correlates of accelerated coronary artery disease in the cardiac transplant patient. *Circulation* 1987 Nov;76(5 Pt 2):V56-V61.
 - (38) Bocchi E, Vilas-Boas F, Pedrosa AA, Bacal F, Stolf N, Jatene A, et al. [Coronary disease after orthotopic heart transplantation]. *Arq Bras Cardiol* 1994 Mar;62(3):195-200.
 - (39) Pethig K, Besser K, Heublein B, Wahlers T, Harringer W, Haverich A. [Coronary vasculopathy after heart transplantation--effect of temporal onset, severity and progression on long-term prognosis]. *Z Kardiol* 1999 Jul;88(7):498-506.
 - (40) Lindelow B, Bergh C, Lamm C, Andersson B, Waagstein F. Graft coronary artery disease is strongly related to the aetiology of heart failure and cellular rejections. *Eur Heart J* 1999 Sep;20(18):1326-34.
 - (41) Young JB, Smart FM, Lowry RL, Kleiman NS. Coronary angiography after heart transplantation: should perioperative study be the "gold standard"? *J Heart Lung Transplant* 1992 May;11(3 Pt 2):S65-S68.
 - (42) Davies H, al-Tikriti S. Coronary arterial pathology in the transplanted human heart. *Int J Cardiol* 1989 Oct;25(1):99-117.
 - (43) Halle AA, III, DiSciascio G, Massin EK, Wilson RF, Johnson MR, Sullivan HJ, et al. Coronary angioplasty, atherectomy and bypass surgery in cardiac transplant recipients. *J Am Coll Cardiol* 1995 Jul;26(1):120-8.

Referências

- (44) Davis SF, Yeung AC, Meredith IT, Charbonneau F, Ganz P, Selwyn AP, et al. Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year posttransplant. *Circulation* 1996 Feb 1;93(3):457-62.
- (45) Schmauss D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy: recent developments. *Circulation* 2008 Apr 22;117(16):2131-41.
- (46) Weis M, Cooke JP. Cardiac allograft vasculopathy and dysregulation of the NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 Apr 1;23(4):567-75.
- (47) Weis M, von SW. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation* 1997 Sep 16;96(6):2069-77.
- (48) Tambur AR, Pamboukian S, Costanzo MR, Heroux A. Genetic polymorphism in platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor are significantly associated with cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2006 Jun;25(6):690-8.
- (49) Vassalli G, Gallino A, Weis M, von SW, Kappenberger L, von Segesser LK, et al. Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *Eur Heart J* 2003 Jul;24(13):1180-8.
- (50) Crespo-Leiro MG, Veiga-Barreiro A, Domenech N, Paniagua MJ, Pinon P, Gonzalez-Cuesta M, et al. Humoral heart rejection (severe allograft dysfunction with no signs of cellular rejection or ischemia): incidence, management, and the value of C4d for diagnosis. *Am J Transplant* 2005 Oct;5(10):2560-4.
- (51) Mehra MR, Crespo-Leiro MG, Dipchand A, Ensminger SM, Hiemann NE, Kobashigawa JA, et al. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010. *J Heart Lung Transplant* 2010 Jul;29(7):717-27.
- (52) Mehra MR, Parameshwar J. Gene expression profiling and cardiac allograft rejection monitoring: is IMAGE just a mirage? *J Heart Lung Transplant* 2010 Jun;29(6):599-602.
- (53) Mehra MR. The emergence of genomic and proteomic biomarkers in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005 Jul;24(7 Suppl):S213-S218.
- (54) Ventura HO, Mehra MR. C-Reactive protein and cardiac allograft vasculopathy. is inflammation the critical link? *J Am Coll Cardiol* 2003 Aug 6;42(3):483-5.

- (55) Mehra MR, Uber PA, Potluri S, Ventura HO, Scott RL, Park MH. Usefulness of an elevated B-type natriuretic peptide to predict allograft failure, cardiac allograft vasculopathy, and survival after heart transplantation. *Am J Cardiol* 2004 Aug 15;94(4):454-8.
- (56) Mehra MR, Uber PA, Walther D, Vesely M, Wohlgemuth JG, Prentice J, et al. Gene expression profiles and B-type natriuretic peptide elevation in heart transplantation: more than a hemodynamic marker. *Circulation* 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I21-I26.
- (57) Mehra MR, Uber PA, Park MH, Scott RL, Ventura HO, Harris BC, et al. Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004 May 5;43(9):1590-5.
- (58) Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998 May 15;91(10):3527-61.
- (59) Bach FH, Hancock WW, Ferran C. Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol Today* 1997 Oct;18(10):483-6.
- (60) Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995 Nov 10;270(45):26746-9.
- (61) Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996 May 3;271(18):10697-703.
- (62) Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 1996 Oct;120(4):803-12.
- (63) Shen YY, Peake PW, Charlesworth JA. Review article: Adiponectin: its role in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2008 Dec;13(6):528-34.
- (64) Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, et al. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2003 Dec 12;278(50):50810-7.
- (65) Shen YY, Charlesworth JA, Kelly JJ, Loi KW, Peake PW. Up-regulation of adiponectin, its isoforms and receptors in end-stage kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2007 Jan;22(1):171-8.
- (66) Hopkins TA, Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007 Apr 1;74(1):11-8.

Referências

- (67) Shen YY, Hughes JT, Charlesworth JA, Kelly JJ, Peake PW. Adiponectin is present in the urine in its native conformation, and specifically reduces the secretion of MCP-1 by proximal tubular cells. *Nephrology (Carlton)* 2008 Oct;13(5):405-10.
- (68) Ishihara T, Haraguchi G, Konishi M, Ohigashi H, Saito K, Nakano Y, et al. Effect of adiponectin on cardiac allograft vasculopathy. *Circ J* 2011;75(8):2005-12.
- (69) Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006 Apr;86(2):583-650.
- (70) Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao LH, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000 Apr;6(4):422-8.
- (71) Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000 Oct 2;192(7):1015-26.
- (72) Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54.
- (73) Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1999 Dec;104(11):1631-9.
- (74) Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney Int* 2003 Apr;63(4):1564-73.
- (75) Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, Peeters AM, van den Engel S, Mol WM, et al. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2003 Dec;14(12):3278-87.
- (76) Wu ML, Ho YC, Lin CY, Yet SF. Heme oxygenase-1 in inflammation and cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis* 2011;1(2):150-8.
- (77) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug;26(4):239-57.

- (78) Nagy B, Lundan T, Larramendy ML, Aalto Y, Zhu Y, Niini T, et al. Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003 Feb;120(3):434-41.
- (79) Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
- (80) Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004 Mar 1;1644(2-3):83-94.
- (81) Miura K, Fujibuchi W, Unno M. Splice variants in apoptotic pathway. *Exp Oncol* 2012 Oct;34(3):212-7.
- (82) Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1999 Dec;1(8):E209-E216.
- (83) Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998 Dec 24;17(25):3225-36.
- (84) Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000 Nov;157(5):1415-30.
- (85) Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008 Oct 27;27(50):6398-406.
- (86) Tung TC, Cui G, Oshima K, Laks H, Sen L. Balanced expression of mitochondrial apoptosis regulatory proteins correlates with long-term survival of cardiac allografts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 Dec;285(6):H2832-H2841.
- (87) Denton MD, Davis SF, Baum MA, Melter M, Reinders ME, Exeni A, et al. The role of the graft endothelium in transplant rejection: evidence that endothelial activation may serve as a clinical marker for the development of chronic rejection. *Pediatr Transplant* 2000 Nov;4(4):252-60.
- (88) Melter M, Reinders ME, Sho M, Pal S, Geehan C, Denton MD, et al. Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood* 2000 Dec 1;96(12):3801-8.
- (89) Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 1995 Sep 15;55(18):4140-5.

Referências

- (90) Lemstrom KB, Nykanen AI, Tikkanen JM, Krebs R, Sihvola RK, Kallio EA, et al. Role of angiogenic growth factors in transplant coronary artery disease. *Ann Med* 2004;36(3):184-93.
- (91) Krebs R, Tikkanen JM, Nykanen AI, Wood J, Jeltsch M, Yla-Herttuala S, et al. Dual role of vascular endothelial growth factor in experimental obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 Jun 15;171(12):1421-9.
- (92) Berse B, Brown LF, van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992 Feb;3(2):211-20.
- (93) Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata T, Kitamura H, Ohashi R, et al. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2001 Aug;159(2):599-608.
- (94) Kang DH, Anderson S, Kim YG, Mazzalli M, Suga S, Jefferson JA, et al. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001 Mar;37(3):601-11.
- (95) Kang DH, Joly AH, Oh SW, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J Am Soc Nephrol* 2001 Jul;12(7):1434-47.
- (96) Lemos FB, Mol WM, Roodnat JI, Uitterlinden A, Ijzermans JN, Weimar W, et al. The beneficial effects of recipient-derived vascular endothelial growth factor on graft survival after kidney transplantation. *Transplantation* 2005 May 15;79(9):1221-5.
- (97) Ferrara N, Keyt B. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS* 1997;79:209-32.
- (98) Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998 May 22;273(21):13313-6.
- (99) Nykanen AI, Krebs R, Tikkanen JM, Raisky O, Sihvola R, Wood J, et al. Combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor inhibition in rat cardiac allografts: beneficial effects on inflammation and smooth muscle cell proliferation. *Transplantation* 2005 Jan 27;79(2):182-9.

- (100) Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991 Nov;88(5):1663-71.
- (101) Wang BY, Candipan RC, Arjomandi M, Hsiun PT, Tsao PS, Cooke JP. Arginine restores nitric oxide activity and inhibits monocyte accumulation after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits. *J Am Coll Cardiol* 1996 Nov 15;28(6):1573-9.
- (102) Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol* 2008 Oct;49(4-6):134-40.
- (103) Xu J, Xie Z, Reece R, Pimental D, Zou MH. Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Dec;26(12):2688-95.
- (104) Pieper GM, Ionova IA, Cooley BC, Migrino RQ, Khanna AK, Whitsett J, et al. Sepiapterin decreases acute rejection and apoptosis in cardiac transplants independently of changes in nitric oxide and inducible nitric-oxide synthase dimerization. *J Pharmacol Exp Ther* 2009 Jun;329(3):890-9.
- (105) Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jun 1;88(11):4651-5.
- (106) Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995 Jun;76(6):980-6.
- (107) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 Jun;43(2):109-42.
- (108) Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992 Jul 17;257(5068):387-9.
- (109) Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991 Dec 21;338(8782-8783):1557-8.
- (110) Nava E, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide in endotoxic shock: effects of NG-monomethyl-L-arginine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20 Suppl 12:S132-S134.

Referências

- (111) Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, et al. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest* 1993 May;91(5):2314-9.
- (112) Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA, Williams TJ, Harding SE. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* 1993 Jul;265(1 Pt 2):H176-H182.
- (113) Brady AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol* 1992 Dec;263(6 Pt 2):H1963-H1966.
- (114) McDaniel DO, Zhou X, Moore CK, Aru G. Cardiac allograft rejection correlates with increased expressions of Toll-like receptors 2 and 4 and allograft inflammatory factor 1. *Transplant Proc* 2010 Dec;42(10):4235-7.
- (115) Zhou X, He Z, Henegar J, Allen B, Bigler S. Expression of allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) in acute cellular rejection of cardiac allografts. *Cardiovasc Pathol* 2011 Sep;20(5):e177-e184.
- (116) Autieri MV, Kelemen S, Thomas BA, Feller ED, Goldman BI, Eisen HJ. Allograft inflammatory factor-1 expression correlates with cardiac rejection and development of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 2002 Oct 22;106(17):2218-23.
- (117) Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest* 1995 Jun;95(6):2954-62.
- (118) Tsubata Y, Sakatsume M, Ogawa A, Alchi B, Kaneko Y, Kuroda T, et al. Expression of allograft inflammatory factor-1 in kidneys: A novel molecular component of podocyte. *Kidney Int* 2006 Dec;70(11):1948-54.
- (119) Nagakawa Y, Nomoto S, Kato Y, Montgomery RA, Williams GM, Klein AS, et al. Over-expression of AIF-1 in liver allografts and peripheral blood correlates with acute rejection after transplantation in rats. *Am J Transplant* 2004 Dec;4(12):1949-57.
- (120) Del GF, Jimenez SA. T cells expressing allograft inflammatory factor 1 display increased chemotaxis and induce a profibrotic phenotype in normal fibroblasts in vitro. *Arthritis Rheum* 2007 Oct;56(10):3478-88.

- (121) Autieri MV. Allograft-induced proliferation of vascular smooth muscle cells: potential targets for treating transplant vasculopathy. *Curr Vasc Pharmacol* 2003 Mar;1(1):1-9.
- (122) O'boyle G, Ali S, Kirby JA. Chemokines in transplantation: what can atypical receptors teach us about anti-inflammatory therapy? *Transplant Rev (Orlando)* 2011 Oct;25(4):136-44.
- (123) Zuo XJ, Matsumura Y, Prehn J, Saito R, Marchevesky A, Matloff J, et al. Cytokine gene expression in rejecting and tolerant rat lung allograft models: analysis by RT-PCR. *Transpl Immunol* 1995 Jun;3(2):151-61.
- (124) Hartman J, Frishman WH. Inflammation and Atherosclerosis: A Review of the Role of Interleukin-6 in the Development of Atherosclerosis and the Potential for Targeted Drug Therapy. *Cardiol Rev* 2014 Mar 10.
- (125) Cipullo R. Vasculites e lesões isquêmicas imunomediadas como fatores preditores de mau prognóstico no transplante cardíaco Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010.
- (126) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.
- (127) Brunner E, Langer F. Nonparametric analysis of ordered categorical data in designs with longitudinal observations and small sample sizes. *Biometrical Journal* 2000;42:663-75.
- (128) Fairley JA, Gilmour K, Walsh K. Making the most of pathological specimens: molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue. *Curr Drug Targets* 2012 Sep 7.
- (129) Jiang YH, Davidson LA, Lupton JR, Chapkin RS. A rapid RT-PCR method for detection of intact RNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Nucleic Acids Res* 1995 Aug 11;23(15):3071-2.
- (130) Schoels M, Dengler TJ, Richter R, Meuer SC, Giese T. Detection of cardiac allograft rejection by real-time PCR analysis of circulating mononuclear cells. *Clin Transplant* 2004 Oct;18(5):513-7.
- (131) Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, et al. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant* 2006 Jan;6(1):150-60.

Referências

- (132) Barker AK, McDaniel DO, Zhou X, He Z, Aru G, Thomas T, et al. Combined analysis of allograft inflammatory factor-1, interleukin-18, and Toll-like receptor expression and association with allograft rejection and coronary vasculopathy. *Am Surg* 2010 Aug;76(8):872-8.
- (133) Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, Starling RC, Deng MC, Cappola TP, et al. Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 2010 May 20;362(20):1890-900.
- (134) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Aug 15;88(16):7276-80.
- (135) Chung JY, Hewitt SM. An optimized RNA extraction method from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Methods Mol Biol* 2010;611:19-27.
- (136) April C, Klotzle B, Royce T, Wickham-Garcia E, Boyaniwsky T, Izzo J, et al. Whole-genome gene expression profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. *PLoS One* 2009;4(12):e8162.
- (137) Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van RN, De PA, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
- (138) Wagner EM. Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. *Methods Mol Biol* 2013;1027:19-45.
- (139) Li QQ, Skinner J, Bennett JE. Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in *Candida glabrata* following azole treatment. *BMC Mol Biol* 2012;13:22.
- (140) Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, DellaPelle P, Madsen JC, Russell PS, et al. Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am J Transplant* 2010 Mar;10(3):510-7.
- (141) Gravanis MB. Allograft heart accelerated atherosclerosis: evidence for cell-mediated immunity in pathogenesis. *Mod Pathol* 1989 Sep;2(5):495-505.
- (142) Nakagawa T, Sukhova GK, Rabkin E, Winters GL, Schoen FJ, Libby P. Acute rejection accelerates graft coronary disease in transplanted rabbit hearts. *Circulation* 1995 Aug 15;92(4):987-93.

- (143) Higuchi ML, Benvenuti LA, Demarchi LM, Libby P. Histological evidence of concomitant intramyocardial and epicardial vasculitis in necropsied heart allografts: a possible relationship with graft coronary arteriosclerosis. *Transplantation* 1999 Jun 27;67(12):1569-76.
- (144) Lu WH, Palatnik K, Fishbein GA, Lai C, Levi DS, Perens G, et al. Diverse morphologic manifestations of cardiac allograft vasculopathy: a pathologic study of 64 allograft hearts. *J Heart Lung Transplant* 2011 Sep;30(9):1044-50.
- (145) Cuda JD, Baldwin WM, III, Steenbergen C, Judge DP, Dropulic LK, Halushka MK. Extensive cardiac allograft vasculitis and concurrent fat necrosis 6 years after orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2007 Nov;26(11):1212-6.
- (146) Cipullo R, Finger MA, Rossi Neto JM, Contreras CM, Poltronieri NV, Zamorano MM, et al. Vasculitides and eosinophils in endomyocardial biopsies as rejection predictors in heart transplantation. *Arq Bras Cardiol* 2011 Aug;97(2):163-70.
- (147) Pereira MJ, Palming J, Rizell M, Aureliano M, Carvalho E, Svensson MK, et al. The immunosuppressive agents rapamycin, cyclosporin A and tacrolimus increase lipolysis, inhibit lipid storage and alter expression of genes involved in lipid metabolism in human adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2013 Jan 30;365(2):260-9.
- (148) Ozbay LA, Moller N, Juhl C, Bjerre M, Carstens J, Rungby J, et al. Calcineurin inhibitors acutely improve insulin sensitivity without affecting insulin secretion in healthy human volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2012 Apr;73(4):536-45.
- (149) Ozdemir M, Yuksel M, Gokbel H, Okudan N, Mevlitoglu I. Serum leptin, adiponectin, resistin and ghrelin levels in psoriatic patients treated with cyclosporin. *J Dermatol* 2012 May;39(5):443-8.
- (150) Ding G, Qin Q, He N, Francis-David SC, Hou J, Liu J, et al. Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Cell Cardiol* 2007 Jul;43(1):73-84.
- (151) Fujioka D, Kawabata K, Saito Y, Kobayashi T, Nakamura T, Kodama Y, et al. Role of adiponectin receptors in endothelin-induced cellular hypertrophy in cultured cardiomyocytes and their expression in infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 Jun;290(6):H2409-H2416.

Referências

- (152) Skurk C, Wittchen F, Suckau L, Witt H, Noutsias M, Fechner H, et al. Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2008 May;29(9):1168-80.
- (153) Chinetti G, Zawadski C, Fruchart JC, Staels B. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Jan 30;314(1):151-8.
- (154) Halvatsiotis I, Tsiotra PC, Ikonomidis I, Kollias A, Mitrou P, Maratou E, et al. Genetic variation in the adiponectin receptor 2 (ADIPOR2) gene is associated with coronary artery disease and increased ADIPOR2 expression in peripheral monocytes. *Cardiovasc Diabetol* 2010;9:10.
- (155) Wang Y, Wang X, Lau WB, Yuan Y, Booth DM, Li J, et al. Adiponectin Inhibits TNF-alpha-Induced Vascular Inflammatory Response via Caveolin-Mediated Ceramidase Recruitment and Activation. *Circ Res* 2014 Jan 7.
- (156) Chok R, Senechal M, Dorent R, Mallat Z, Leprince P, Pavie A, et al. Apoptosis and expression of heme oxygenase-1 in heart transplant recipients during acute rejection episode. *Transplant Proc* 2002 Nov;34(7):2815-8.
- (157) Yamashita K, Ollinger R, McDaid J, Sakahama H, Wang H, Tyagi S, et al. Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *FASEB J* 2006 Apr;20(6):776-8.
- (158) Souza AI, Felkin LE, McCormack AM, Holder A, Barton PJ, Banner NR, et al. Sequential expression of three known protective genes in cardiac biopsies after transplantation. *Transplantation* 2005 Mar 15;79(5):584-90.
- (159) Manicassamy S, Yin D, Zhang Z, Molinero LL, Alegre ML, Sun Z. A critical role for protein kinase C-theta-mediated T cell survival in cardiac allograft rejection. *J Immunol* 2008 Jul 1;181(1):513-20.
- (160) Molinero LL, Wang Y, Zhou P, Yagita H, Alegre ML. Fas mediates cardiac allograft acceptance in mice with impaired T-cell-intrinsic NF-kappaB signaling. *Transpl Int* 2009 Aug;22(8):845-52.
- (161) Zeglen S, Nozynski J, Wozniak-Grygiel E, Zakliczynski M, Kucewicz-Czech E, Laszewska A, et al. What else distinguishes cellular rejection grade 1A from 0? Annexin V and BCL in elective biopsies received from heart transplant recipients. *Transplant Proc* 2009 Oct;41(8):3198-201.

- (162) Huang J, Nakamura K, Ito Y, Uzuka T, Morikawa M, Hirai S, et al. Bcl-xL gene transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats. *Circulation* 2005 Jul 5;112(1):76-83.
- (163) Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995 Jan;1(1):27-31.
- (164) Reinders ME, Sho M, Izawa A, Wang P, Mukhopadhyay D, Koss KE, et al. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *J Clin Invest* 2003 Dec;112(11):1655-65.
- (165) Reinders ME, Fang JC, Wong W, Ganz P, Briscoe DM. Expression patterns of vascular endothelial growth factor in human cardiac allografts: association with rejection. *Transplantation* 2003 Jul 15;76(1):224-30.
- (166) Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res* 2001 Sep 14;89(6):477-9.
- (167) Lemstrom KB, Krebs R, Nykanen AI, Tikkanen JM, Sihvola RK, Aaltola EM, et al. Vascular endothelial growth factor enhances cardiac allograft arteriosclerosis. *Circulation* 2002 May 28;105(21):2524-30.
- (168) Crawford SE, Mavroudis C, Backer CL, Huang X, Mu Y, Volpert OV, et al. Captopril suppresses post-transplantation angiogenic activity in rat allograft coronary vessels. *J Heart Lung Transplant* 2004 Jun;23(6):666-73.
- (169) Stein B, Eschenhagen T, Rudiger J, Scholz H, Forstermann U, Gath I. Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998 Nov;32(5):1179-86.
- (170) Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, Mann MJ, Keeling PJ, Trindade PT, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996 Mar 15;93(6):1087-94.
- (171) Orus J, Heras M, Morales-Ruiz M, Leivas A, Roig E, Rigol M, et al. Nitric oxide synthase II mRNA expression in cardiac tissue of patients with heart failure undergoing cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000 Feb;19(2):139-44.
- (172) Koglin J, Granville DJ, Glysing-Jensen T, Mudgett JS, Carthy CM, McManus BM, et al. Attenuated acute cardiac rejection in NOS2 -/- recipients correlates with reduced apoptosis. *Circulation* 1999 Feb 16;99(6):836-42.

- (173) Ferri N, Corsini A. Clinical evidence of statin therapy in non-dyslipidemic disorders. *Pharmacol Res* 2014 Feb 15.
- (174) Hindler K, Shaw AD, Samuels J, Fulton S, Collard CD, Riedel B. Improved postoperative outcomes associated with preoperative statin therapy. *Anesthesiology* 2006 Dec;105(6):1260-72.
- (175) Park JH, McMillan DC, Horgan PG, Roxburgh CS. The impact of anti-inflammatory agents on the outcome of patients with colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2014 Feb;40(1):68-77.
- (176) Gazi IF, Liberopoulos EN, Athyros VG, Elisaf M, Mikhailidis DP. Statins and solid organ transplantation. *Curr Pharm Des* 2006;12(36):4771-83.
- (177) Paraskevas KI. Applications of statins in cardiothoracic surgery: more than just lipid-lowering. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008 Mar;33(3):377-90.
- (178) Yin R, Zhu J, Shao H, Cheng X, Feng X, Li Z, et al. Inhibition of chemokine receptor CCR2 and CCR5 expression contributes to simvastatin-induced attenuation of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2007 May;26(5):485-93.
- (179) Pizarro TT, Malinowska K, Kovacs EJ, Clancy J, Jr., Robinson JA, Piccinini LA. Induction of TNF alpha and TNF beta gene expression in rat cardiac transplants during allograft rejection. *Transplantation* 1993 Aug;56(2):399-404.
- (180) Azzawi M, Hasleton PS, Hutchinson IV. TNF-alpha in acute cardiac transplant rejection. *Cytokines Cell Mol Ther* 1999 Mar;5(1):41-9.
- (181) Ramsperger-Gleixner M, Spriewald BM, Tandler R, Kondruweit M, Amann K, Weyand M, et al. Increased transcript levels of TNF-alpha, TGF-beta, and granzyme B in endomyocardial biopsies correlate with allograft rejection. *Exp Clin Transplant* 2011 Dec;9(6):387-92.
- (182) Ueland T, Sikkeland LI, Yndestad A, Eiken HG, Holm T, Guevara C, et al. Myocardial gene expression of inflammatory cytokines after heart transplantation in relation to the development of transplant coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2003 Sep 15;92(6):715-7.
- (183) Ardehali A, Laks H, Drinkwater DC, Ziv E, Drake TA. Vascular cell adhesion molecule-1 is induced on vascular endothelia and medial smooth muscle cells in experimental cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 1995 Aug 1;92(3):450-6.
- (184) Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond)* 2009 Aug;117(3):95-109.

- (185) Hognestad A, Holm T, Simonsen S, Kjekshus J, Andreassen AK. Serial measurements of peripheral vascular reactivity and exercise capacity in congestive heart failure and after heart transplantation. *J Card Fail* 2005 Aug;11(6):447-54.
- (186) Fahmy NM, Yamani MH, Starling RC, Ratliff NB, Young JB, McCarthy PM, et al. Chemokine and chemokine receptor gene expression indicates acute rejection of human cardiac transplants. *Transplantation* 2003 Jan 15;75(1):72-8.
- (187) de Groot-Kruseman HA, Baan CC, Hagman EM, Mol WM, Niesters HG, Maat AP, et al. Sequential monitoring of intragraft cytokine mRNA expression in relation to diastolic left ventricular wall thickness and function early after heart transplantation. *Clin Transplant* 2002 Dec;16(6):433-41.
- (188) Dong L, Maehara A, Nazif TM, Pollack AT, Saito S, Rabbani LE, et al. Optical Coherence Tomographic Evaluation of Transplant Coronary Artery Vasculopathy With Correlation to Cellular Rejection. *Circ Cardiovasc Interv* 2014 Apr 8.