

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS FACULDADE DE
MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA**

MARCUS VINÍCIUS DE PAULA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ARTÉRIAS
PULMONARES DE TRANSPLANTADOS CARDÍACOS CHAGÁSICOS E NÃO
CHAGÁSICOS**

BELO HORIZONTE

2024

MARCUS VINÍCIUS DE PAULA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ARTÉRIAS
PULMONARES DE TRANSPLANTADOS CARDÍACOS CHAGÁSICOS E NÃO
CHAGÁSICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia e Oftalmologia.

Orientador: Cláudio Léo Gelape

Coorientador: Fábio Morato de Castilho

BELO HORIZONTE

2024

SI586a Silva, Marcus Vinicius de Paula da.
Avaliação de biomarcadores inflamatórios em artérias pulmonares de transplantedos cardíacos chagásicos e não chagásicos [recurso eletrônico] / Marcus Vinicius de Paula da Silva. -- Belo Horizonte : 2024.
115f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador : Cláudio Léo Gelape
Coorientador: Fábio Morato Castilho
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Transplante de Coração. 2. Biomarcadores. 3. Hipertensão Arterial Pulmonar. 4. Doença de Chagas. 5. Interleucinas. 6. Dissertação Acadêmica. I. Gelape, Cláudio Léo. II. Castilho, Fábio Morato. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WG 169



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA - CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Às oito horas do dia dezois de setembro de dois mil e vinte e quatro, na Faculdade de Medicina, na sala 526, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **MARCUS VINÍCIUS DE PAULA DA SILVA**. A presidência da sessão coube ao Prof. Cláudio Léo Gelape (Orientador) – UFMG. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Prof. Cláudio Léo Gelape (Orientador) – UFMG, Prof. Fábio Morato de Castilho (Coorientador) – UFMG, Prof. Renato Tambellini Arnoni – Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari – UFMG, Prof. Luiz Felipe Pinho Moreira – INCOR e Prof. Marco Paulo Tomaz Barbosa – HC-UFMG. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ARTÉRIAS PULMONARES DE TRANSPLANTADOS CARDÍACOS CHAGÁSICOS E NÃO CHAGÁSICOS. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar aprovado a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 16 de setembro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Felipe Pinho Moreira, Usuário Externo**, em 16/09/2024, às 10:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Leo Gelape, Professor do Magistério Superior**, em 16/09/2024, às 11:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Morato de Castilho, Professor do Magistério Superior**, em 16/09/2024, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Teresa Cristina de Abreu Ferrari, Professora do Magistério Superior**, em 16/09/2024, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato Tambellini Arnoni, Usuário Externo**, em 16/09/2024, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marco Paulo Tomaz Barbosa, Médico**, em 17/09/2024, às 21:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3435052** e o código CRC **0851C7E8**.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

Reitora:

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor:

Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitora de Pós-Graduação:

Profa. Isabela Almeida Pordeus

Pró-Reitor de Pesquisa:

Prof. Fernando Marcos dos Reis

Diretora da Faculdade de Medicina:

Profa. Alamanda Kfoury Pereira

Coordenadora do Centro de Pós-Graduação:

Prof. Ana Cristina Simões e Silva

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia
e à Oftalmologia:**

Profa. Vivian Resende

**Membros do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à
Cirurgia e à Oftalmologia:**

Prof.^a Vivian Resende (Coordenadora)

Prof. Túlio Pinho Navarro (Vice-coordenador)

Prof. Alexandre Varella Giannetti

Prof. Cristiano Xavier Lima

Prof. Marco Antônio Percope de Andrade

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Cláudio Léo Gelape, pela orientação, confiança, paciência, ensinamentos e dedicação que contribuíram para meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Fabio Morato de Castilho pela paciência, disponibilidade sempre que precisei, incentivo e por acreditar em minha capacidade.

Agradeço a colaboração da Dra Virgínia Soares Lemos pela prestatividade em me ajudar e autorizar a realização dos experimentos no laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular da UFMG.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFMG pela cooperação e motivação; em especial aos meus amigos Ildernandes Vieira Alves e Antonielle Rodrigues Pereira Alves pela ajuda em todos os experimentos e pelas palavras de incentivo.

Ao Dr Marcelo Frederique de Castro por permitir a seleção de alguns pacientes na Unidade de Cirurgia Cardiovascular do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte sob sua supervisão.

Aos técnicos de enfermagem, enfermeiros e médicos do Hospital das Clínicas pelo carinho e ajuda com as amostras colhidas dos pacientes.

Aos professores Antônio Augusto da Silva Abreu, Caroline Maria de Oliveira Volpe e Márcio Heitor Stelmoda Silva pela ajuda na estatística da tese.

Aos meus pais, Maristela e Vinícius, obrigado por me mostrarem que somos capazes de viver nossos sonhos e vencer nossos medos.

Aos meus familiares pela força, palavras de carinho e por compreender minha luta.

A todos os amigos, pelo incentivo, pelos momentos de alegria e por compreenderem minha ausência.

Aos professores da Pós-Graduação, pelos ensinamentos e à secretária, Camila pela assistência com informações quando necessário.

Aos pacientes guerreiros que aceitaram participar da pesquisa e acreditaram no meu sonho e na minha capacidade.

Aos participantes da banca examinadora, por aceitarem o convite e pela dedicação.

Agradeço, sobretudo, a Deus por iluminar meus passos, abençoar e por ter me permitido contar com todos vocês suavizando minha caminhada.

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo da guarda.”

Joseph Addison

RESUMO

O transplante cardíaco (TxC) é opção terapêutica considerada em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) avançada e refratária ao tratamento otimizado. O paciente com IC avançada frequentemente desenvolve hipertensão arterial pulmonar (HAP). A HAP é definida como uma condição em que a pressão média da artéria pulmonar é superior a 20 mmHg. Em relação à HAP, reconhece-se que a inflamação é um aspecto importante no seu desenvolvimento. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a relação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar em pacientes submetidos ao TxC. Os níveis das interleucinas IL-6, IL-1 β e TNF- α foram obtidos por ELISA, associados das contagens de CD68 e de neutrófilos CD66b pela técnica de imunofluorescência, em fragmentos das artérias pulmonares de doadores e de pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica ou não submetidos ao TxC. Os resultados mostraram que existe correlação positiva, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), entre os níveis de pressão no átrio direito e a IL-6. Além disso, foram observadas correlações negativas, moderadas, estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as variáveis índice cardíaco e TNF- α , e entre os níveis de gradiente transpulmonar e TNF- α . O estudo revelou também a presença de diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os pacientes que foram a óbito em 30 dias e o maior número de células CD68 por micrômetro quadrado no vaso do paciente doador e receptor. Não existe diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre os pacientes receptores chagásicos e os receptores não-chagásicos no que diz respeito às variáveis clínicas, ecocardiográficas, manométricas e aos marcadores inflamatórios. Esses dados sugerem a presença de um perfil pró-inflamatório nos pacientes transplantados cardíaco independente dos níveis aferidos de pressão na artéria pulmonar.

Palavras-chave: transplante cardíaco; hipertensão arterial pulmonar; interleucina-6; interleucina -1 β ; fator de necrose tumoral- α ; CD68; CD66b.

SUMMARY

Heart transplantation (TxC) is a therapeutic option considered in patients with advanced heart failure (HF) refractory to optimized treatment. Patients with advanced HF often develop pulmonary arterial hypertension (PAH). PAH is defined as a condition in which the mean pulmonary artery pressure is greater than 20 mmHg. In relation to PAH, it is recognized that inflammation is an important aspect in its development. In this context, the objective of this work was to evaluate the relationship between the inflammatory process and the development of pulmonary arterial hypertension in patients undergoing TxC. The levels of interleukins IL-6, IL-1 β and TNF- α were obtained by ELISA, associated with CD68 and CD66b neutrophil counts using the immunofluorescence technique, in fragments of the pulmonary arteries of donors and patients with or without chagasic cardiomyopathy. subjected to TxC. The results showed that there is a positive, statistically significant correlation ($p < 0.05$) between right atrium pressure levels and IL-6. Furthermore, negative, moderate, statistically significant correlations ($p < 0.05$) were observed between the variables cardiac index and TNF- α , and between the levels of transpulmonary grandiente and TNF- α . The study also revealed the presence of a statistically significant difference ($p < 0.05$) between patients who died within 30 days and the highest number of CD68 cells per square micrometer in the vessel of the donor and recipient patient. There is no statistically significant difference ($p \geq 0.05$) between chagasic recipients and non-chagasic recipients with regard to clinical, echocardiographic, manometric variables and inflammatory markers. These data suggest the presence of a pro-inflammatory profile in heart transplant patients, independent of measured pulmonary artery pressure levels.

Keywords: heart transplant; pulmonary arterial hypertension; interleukin-6; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α ; CD68; CD66b.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem representativa da imunocoloração da molécula CD68 evidenciando a presença de macrófagos na artéria pulmonar, mostrando o CD68 em coloração vermelha, autofluorescência de elastina em verdes, núcleo celular em azul e mescladas no canto direito. As setas mostram a coloração do CD68 em vermelho.....40

Figura 2: Imagem representativa da imunocoloração da molécula CD66b evidenciando a presença de neutrófilos na artéria pulmonar, mostrando o CD66b em coloração vermelha, autofluorescência de elastina em verdes, núcleo celular em azul e mescladas no canto direito. As setas mostram a coloração do CD66b em vermelho.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD - Pressão no átrio direito

CAP - Cateter de Artéria Pulmonar

CD 66b - Cluster de diferenciação 66b

CD 68 - Cluster de diferenciação 68

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CP(AE) - Pressão no átrio esquerdo

DC - Débito cardíaco

DCH - Doença de Chagas

FE - Fração de ejeção

GTP - Gradiente Transpulmonar

HAP - Hipertensão arterial pulmonar

HC-UFMG - Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HP - Hipertensão pulmonar

IC - Insuficiência cardíaca

ICAR - Índice cardíaco

IL-1 - Interleucina-1

IL-1 β - Interleucina 1 Beta

IL-6 - Interleucina 6

IMC - Índice de massa corporal

IND RVP - Índice de resistência vascular pulmonar

IND RVS - Índice de resistência vascular sistêmica

INTERMACS - Classificação de Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support.

ISHLT - Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão

mL - Mililitro

pg- Picograma

PCP - Pressão Capilar Pulmonar

PMAP - Pressão média de artéria pulmonar

POAP - Pressão de oclusão da artéria pulmonar

PSAP- Pressão Sistólica da Artéria Pulmonar

PVC - Pressão Venosa Central

RVP - Resistência vascular pulmonar

RVP (NPS) - Resistência pulmonar após o nitroprussiato de sódio

RVS - Resistência vascular sistêmica

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β - Fator de transformação de crescimento beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TP diast - Pressão diastólica no tronco pulmonar (artéria pulmonar)

TP média - Pressão média no tronco pulmonar (artéria pulmonar)

TP sist - Pressão sistólica no tronco pulmonar (artéria pulmonar)

TxC - Transplante cardíaco

VO₂ - Consumo de oxigênio

W - Wood

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....16

2 INTRODUÇÃO.....18

3 RELEVÂNCIA.....27

4 OBJETIVOS.....28

5 MATERIAL E MÉTODOS.....29

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....33

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....96

8 CONCLUSÃO.....97

REFERÊNCIAS.....98

APÊNDICE

ANEXOS

1. APRESENTAÇÃO

Esta tese representa o trabalho apresentado como requisito para conclusão do curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, estando inserido na área de concentração de resposta inflamatória à agressão tecidual e na linha de pesquisa resposta sistêmica a transplante de órgãos e tecidos.

Os pacientes com insuficiência cardíaca podem desenvolver aumento da pressão pulmonar. A hipertensão da artéria pulmonar (HAP) ocorre em até um terço dos pacientes e envolve processo inflamatório local. A HAP é considerada fator de risco e mau prognóstico no transplante cardíaco. Por outro lado, pacientes cardiopatas chagásicos apresentam menores níveis de pressão pulmonar, quando comparados com pacientes cardiopatas de outras etiologias. O grupo responsável pelo trabalho publicou anteriormente resultados neste sentido. Os mesmos encontraram menores níveis de pressão sistólica na artéria pulmonar com o uso da ecocardiografia nos pacientes chagásicos, quando comparados com não chagásicos. Devido a essa diferença, os pesquisadores hipotetizaram que o processo inflamatório pulmonar pode ser diferente entre pacientes transplantados do coração com e sem doença de Chagas.

Neste contexto, avaliou-se a relação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar em pacientes submetidos ao TxC. Os níveis das interleucinas IL-6, IL-1 β e TNF- α foram obtidos por ELISA, associados das contagens de CD68⁺ e de neutrófilos CD66b pela técnica de imunofluorescência, em fragmentos das artérias pulmonares de doadores e de pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica ou não submetidos ao TxC.

O resultado desse trabalho foi a elaboração de três artigos, são eles: 1) "Crosstalk between cytokines, inflammation and pulmonary arterial hypertension in heart transplant patients", publicado no periódico Cytokine, 2) "Avaliação de biomarcadores inflamatórios em artérias pulmonares de transplantados cardíacos chagásicos e não chagásicos", publicado no periódico Brazilian Journal of Transplantation, 3) "Correlation of inflammatory markers with prognostic factors in heart transplante patients", submetido para publicação no periódico Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery.

Esta tese apresenta os seguintes elementos textuais:

- Introdução
- Relevância
- Objetivos

- Método
- Resultados e Discussão – Artigo 1
- Resultados e Discussão – Artigo 2
- Resultados e Discussão – Artigo 3
- Limitações do estudo
- Conclusão
- Referências
- Apêndices
- Anexos

2. INTRODUÇÃO

2.1 Transplante cardíaco e insuficiência cardíaca

O transplante cardíaco (TxC) é opção terapêutica considerada em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) avançada e refratária ao tratamento otimizado, de acordo com diretrizes nacionais e internacionais (1,2). A IC é uma doença progressiva que afeta milhões de pessoas. Aproximadamente, 10 % dos pacientes com IC têm a forma avançada da doença ou estágio D, a qual está associada com alta mortalidade e qualidade de vida muito ruim (2,3). Há consenso de que o TxC, com critérios apropriados de seleção, aumenta a sobrevida e a qualidade de vida, a capacidade ao exercício e proporciona retorno mais rápido ao trabalho, quando comparado ao tratamento convencional (2,3). Os pacientes candidatos a um TxC devem, obrigatoriamente, passar por uma extensa avaliação clínica, que inclui exames laboratoriais e de imagens, com a intenção de melhor averiguar a condição do paciente para a cirurgia, detecção de comorbidades que eventualmente possam contraindicar ou dificultar o transplante, além de preparar o candidato para deixá-lo na melhor condição possível para o procedimento (3).

As principais indicações clássicas para TxC são IC avançada na dependência de drogas inotrópicas e/ou suporte circulatório mecânico, IC avançada classe funcional III persistente e IV com tratamento otimizado na presença de outros fatores de mau prognóstico, IC avançada e consumo de oxigênio (VO_2) de pico $\leq 12 \text{ mL/kg/minuto}$ em pacientes em uso de betabloqueadores, IC avançada e VO_2 de pico $\leq 14 \text{ mL/kg/minuto}$ em pacientes intolerantes a betabloqueadores, arritmias ventriculares sintomáticas e refratárias ao manejo com fármacos, dispositivos elétricos e procedimentos de ablação (3).

As potenciais contraindicações para o TxC são idade > 70 anos, comorbidades com baixa expectativa de vida, infecção sistêmica ativa, índice de massa corporal (IMC) $> 35 \text{ kg/m}^2$, doença cerebrovascular grave sintomática, doença vascular periférica grave sem possibilidade de revascularização e/ou reabilitação, doença hepática ou pulmonar avançadas, doença psiquiátrica grave, dependência química e/ou baixo suporte social e/ou baixa adesão ao tratamento e recomendações vigentes, diabetes melito com lesões graves em órgão alvo e/ou controle glicêmico inadequado (Hemoglobina glicosilada $> 7,5\%$), incompatibilidade ABO, embolia pulmonar < 3 semanas, hipertensão pulmonar fixa, neoplasia com risco de recorrência elevado ou incerto, perda de função renal intrínseca e irreversível apesar de tratamento clínico otimizado (taxa de filtração glomerular estimada $< 30 \text{ mL/min/1,73m}^2$), síndromes demenciais ou retardo mental graves e tabagismo ativo (3).

O Brasil tem ocupado cada vez mais destaque no campo dos transplantes, principalmente na América Latina (4). Além de ser referência no transplante cardíaco na doença de Chagas, guiando condutas que são incorporadas no mundo todo (5).

No relatório de registro da Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão (ISHLT) de 2019 sobre dados de receptores de TxC os diagnósticos mais frequentes da causa da IC foram cardiomiopatia não isquêmica 50,8% dos casos, cardiomiopatia isquêmica 32,4%, cardiomiopatia restritiva 3,5%, cardiomiopatia hipertrófica 3,4%, doença cardíaca congênita 3,1%, retransplante 2,8%, cardiomiopatia valvular 2,5% e outros 1,5 % (6)

Atualmente, Minas Gerais é o segundo estado com maior número de transplantes por ano (7). No primeiro trimestre de 2022, as taxas de doação e transplante diminuíram (8). Comparadas com o ano de 2021, houve diminuição nas taxas de doadores (8,6%) e de TxC (12,5%) (7). De janeiro a setembro de 2022 ocorreram 269 TxC no país (7). O Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) foi credenciado em 2006 para este tipo de transplante e é o hospital referência em TxC deste estado. Minas Gerais apresenta dados distintos aos de outras regiões do Brasil e do mundo em relação a causa da IC dos pacientes TxC, sendo que no período de jun/2006-jul/2009, a miocardiopatia chagásica foi identificada em 50,0% dos pacientes, seguida pela miocardiopatia dilatada idiopática 20,5% e pela miocardiopatia isquêmica 15,9% (9).

2.2 Insuficiência cardíaca e hipertensão arterial pulmonar

O paciente com IC avançada frequentemente desenvolve aumento da pressão pulmonar por mecanismo retrógrado (10). A disfunção ventricular esquerda causa aumento da pressão diastólica final, que é transmitida ao leito vascular pulmonar, aumentando a pressão venosa (10). Ocorre com o passar do tempo, vasoconstrição vascular e, subsequentemente, a reestruturação patológica com aumento da proliferação celular e hipertrofia associada à fibrose intimal (11). Até um terço dos pacientes desenvolvem hipertensão arterial pulmonar (HAP) (11).

É descrito que até 60% dos pacientes com disfunção sistólica e 70% daqueles com disfunção diastólica esquerda desenvolvem HAP passiva (12). Na classificação de HAP proposta no 5o Simpósio Mundial sediado em Nice, França, em 2013, esse tipo de doença vascular pulmonar é categorizado no grupo 2, HAP associada a doenças do coração esquerdo, com disfunção sistólica, diastólica ou valvar (13).

A HAP é definida como uma condição em que a pressão média da artéria pulmonar (PMAP) é superior a 20 mmHg (14). Previamente, utilizou-se o nível de 25 mmHg para defini-la (15). Entretanto, estudos recentes sugerem que níveis menores já estão associados ao pior

prognóstico (16). Concomitantemente, se a pressão de oclusão da artéria pulmonar (POAP) for menor ou igual a 15 mmHg, temos a condição de HAP pré-capilar; nessa situação, o predomínio da doença vascular está no território arterial (17). Quando a POAP for superior a 15 mmHg, temos a condição de hipertensão pulmonar (HP) pós-capilar, o que sugere a presença de alterações nas câmaras cardíacas esquerdas (17). É importante ressaltar que, enquanto os atuais critérios de HAP incluem valores de resistência vascular pulmonar (RVP) superiores a 2 Wood (W) (18), dados recentes indicam que valores superiores a 2,2W apresentam impacto negativo na sobrevida desta população e podem apresentar resposta ao tratamento clínico (19).

2.3 Hipertensão arterial pulmonar e inflamação

Em relação à HAP, reconhece-se que a inflamação é um aspecto importante e que células T, B, mastócitos, macrófagos e células dendríticas participam do processo (20). Parece haver um insulto inicial do endotélio que leva à propagação de um processo inflamatório com a produção de citocinas, levando à produção de fatores de crescimento, culminando em remodelamento vascular (20). Estudo realizado com pacientes com HAP de diversas etiologias mostrou um aumento na circulação pulmonar de fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento derivado de plaquetas e interleucina 6 (IL-6), em comparação com controles, indicando que a liberação aumentada ou o clearance reduzido dos fatores de crescimento no leito vascular pulmonar deve contribuir para o remodelamento vascular na HAP (21). Além disso, não apenas nos pulmões, mas também no ventrículo direito, os mediadores inflamatórios como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 Beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) mostraram-se elevados nos pacientes com HAP e correlacionam-se com a gravidade (22).

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α são produzidas por monócitos/macrófagos, células endoteliais, e muitos outros tipos de células e tem ação pró-inflamatória (23,24). Essas citocinas podem ser particularmente relevantes para a patogênese da HAP (22). De fato, IL-1 β e TNF- α têm a capacidade de induzir fibroblastos e proliferação de células musculares lisas (25,26), além de promover trombose (27,28). Essas citocinas podem, portanto, desempenhar um papel na iniciação e/ou progressão do crescimento de células musculares lisas, fibroblastos e células endoteliais, e na ocorrência do quadro microtrombótico, lesões comumente associadas à HAP grave (22).

Pouca atenção tem sido dada aos neutrófilos na patogênese da HAP, mas é evidente tanto em estudos experimentais quanto clínicos que a elastase neutrofílica pode influenciar em tal patogênese (29). Foi evidenciado o aumento da elastase neutrofílica em células musculares lisas de pacientes com HAP (30). A elastase neutrofílica também se encontra presente nas

células musculares lisas de fragmentos da artéria pulmonar de camundongos expostos à hipóxia crônica (31). Neutrófilos isolados de pacientes com HAP têm maior capacidade de liberação de elastase neutrofílica (32).

Os processos inflamatórios regulam criticamente o desenvolvimento, a progressão e os desfechos das doenças cardiovasculares (33). Os neutrófilos são o tipo mais abundante de leucócitos na circulação humana (33). Ao contrário dos monócitos e macrófagos (34), os neutrófilos tradicionalmente têm sido considerados espectadores de doenças cardiovasculares, porém estudos nos últimos anos têm demonstrado importantes papéis funcionais dos neutrófilos da inflamação e reparo cardiovascular (35). A produção de neutrófilos ocorre predominantemente na medula óssea, onde citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão controlam a liberação de neutrófilos na corrente sanguínea (33). A meia-vida dos neutrófilos é estimada em cerca de 12 horas (36). No entanto, os neutrófilos podem residir nos tecidos por muito mais tempo, sendo que a inflamação e a hipóxia crônica chegam a prolongar a vida útil dos neutrófilos por até 7 dias (37). Em caso de inflamação, os neutrófilos são rapidamente recrutados da corrente sanguínea para o tecido, fato que contribui para o dano tecidual (38).

O grupamento de diferenciação 66b (CD66b) é uma molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário. Trata-se de uma proteína ancorada em glicosilfosfatidilinositol de cadeia única e membro da superfamília de imunoglobulinas, mais especificamente, da família de antígenos carcinoembrionários humanos (39). A CD66b é expressa exclusivamente em granulócitos humanos e é reconhecida como marcador de ativação de granulócitos (33,40). Assim, CD66b é marcador de ativação neutrofílica, com baixa expressão em neutrófilos de repouso, e excesso de expressão em estímulos pro-inflamatórios (33).

A patologia da HAP é caracterizada por alterações irreversíveis no tecido da artéria pulmonar denominadas “remodelamento vascular pulmonar” que envolvem células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos (41). Há evidências crescentes de que a inflamação perivascular desempenha um papel importante na remodelação vascular (42). Foi descoberto que um grande número de células imunes, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, linfócitos T e linfócitos B foram agrupados em torno dos vasos pulmonares em pacientes com HAP (43). Entre tais células, os macrófagos desempenham papéis importantes na progressão da HAP (42). Os macrófagos amplificam a inflamação ao secretar fatores pró-inflamatórios, promovem a inflamação tecidual e são importantes na remodelação vascular

pulmonar (44). Simultaneamente, os níveis de expressão de fatores pró-inflamatórios estão aumentados como IL-1 β , IL-6 e TNF- α em pacientes com HAP (45).

O grupamento de diferenciação 68 (CD68) é uma glicoproteína transmembrana que é expressa por monócitos e macrófagos teciduais (46). Pertence à família da glicoproteína da membrana lisossômica / endossômica (LAMP) e localiza-se principalmente em lisossomos e endossomos, com uma fração menor circulando na superfície celular (46). O CD68 também pode desempenhar um papel nas atividades fagocíticas dos macrófagos teciduais (46). Números aumentados de CD68 são relatados em pacientes portadores de HAP e estudos com animais sobre HAP (47,48). No entanto, o papel exato dos macrófagos e se a sua presença ou ausência é necessária para a remodelação vascular observada na HAP permanece incerta (49).

As citocinas são classificadas como um grupo de proteínas de baixo peso molecular, que atuam na intercomunicação celular (50). Essas moléculas são liberadas em decorrência de diferentes estímulos e interagem com receptores específicos regulando a função celular e estão intimamente relacionadas ao processo inflamatório (50).

A IL-6 foi descoberta pela primeira vez em 1980 por Weissenbach (51). Trata-se de uma pequena glicoproteína molecular codificada pelo cromossomo 7p15-21, que consiste em quatro estruturas e geralmente existe na forma de monômero (52).

A IL-6 é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa (53). Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1) e TNF- α (53). A IL-6 se constitui em importante marcador inflamatório e é amplamente expressa durante a reação inflamatória, produzindo efeitos indesejáveis em vários órgãos (54).

A relação entre IL-6 e HAP tem sido explorada há mais de 27 anos (55). Estudos sugerem que a IL-6 pode contribuir para o desenvolvimento e progressão da HAP (55). Níveis elevados de IL-6 têm sido observados em pacientes com HAP, e a presença dessa citocina está associada a um maior grau de inflamação e disfunção endotelial nas artérias pulmonares (55). Acredita-se que a IL-6 possa desempenhar um papel na remodelação vascular característica da HAP, promovendo a proliferação de células musculares lisas e o aumento da resposta inflamatória (55). Além disso, a IL-6 também pode influenciar a resposta imune e a ativação de células envolvidas na patogênese da HAP (55).

A IL-1 β pertence à família das interleucinas IL-1, um grupo de citocinas circulantes implicado na inflamação e em doenças (56,57). Existem 11 membros da família IL-1 expressos por múltiplas células imunes, como células dendríticas, monócitos, neutrófilos, células B e

células T (58). Essas citocinas imunomoduladoras infligem respostas inflamatórias em vários tipos de células e tecidos (59).

A IL-1 β é bem reconhecida como clinicamente relevante devido à sua alta abundância em pacientes com hipertensão (60). Devido ao seu papel essencial na inflamação, o exame de como a IL-1 β influencia as alterações relacionadas à patologia vascular na hipertensão ganhou muito interesse e está sendo explorado atualmente (58). Por exemplo, relatórios recentes sugerem que a IL-1 β não apenas participa da resposta pró-inflamatória nos vasos, mas também influencia o fenótipo e as funções das células musculares lisas vasculares e a remodelação vascular em vários tipos de hipertensão por meio de inflamação (61).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi descoberto em 1975 por Carswell e colaboradores, sendo considerada uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, atuando em diversas partes do corpo (62). É amplamente produzido por monócitos e macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios (63). Os receptores e ligantes da família TNF- α acoplam-se diretamente a vias de sinalização que envolvem processos fisiológicos da célula, como proliferação, sobrevivência e diferenciação (64). Ele desempenha um papel direto na adesão de células inflamatórias circulantes nos tecidos (65). Estudos mostraram que o TNF- α foi notavelmente maior na HAP (64).

Em relação aos aspectos morfológicos, a hipertensão pulmonar em suas diferentes formas clínicas é caracterizada por uma grande variedade de anormalidades na parede dos vasos pulmonares (66). Artérias de todos os calibres podem ser afetadas, desde o tronco da artéria pulmonar e seus ramos, nos quais placas ateromatosas podem ser visualizadas, nos casos mais graves, até as arteríolas (67). Todas as camadas que compõem a parede vascular podem ser afetadas: hiperplasia intimal, hipertrofia muscular da túnica média e espessamento da adventícia (66). Além disso, podem ser observados formação de trombos na luz vascular (trombose in situ), assim como vários graus de inflamação arterial (66). Nas formas mais avançadas e na forma idiopática particularmente, é possível ainda destacar a formação de lesões chamadas complexas ou dilatadas (plexiformes, angiomatoides, microangiopatias, venopatia oclusiva) (66).

A HAP é considerada fator de risco e mau prognóstico no TxC (68). A HAP é fator de alto risco de falência do enxerto no pós-operatório imediato pela dificuldade que o ventrículo direito do enxerto pode apresentar na adaptação frente ao novo território vascular (68).

A manometria com cateterização da artéria pulmonar ainda é essencial para a inclusão do paciente na fila de TxC, a fim de determinar a existência e o grau da hipertensão pulmonar, e sua reversibilidade a vasodilatadores (3). Além disso, a manometria cardiopulmonar pode ser

de grande auxílio no manejo desses pacientes, já que muitos estão em dependência de drogas vasoativas e/ou de assistência ventricular. Esta medida deve ser realizada antes da inclusão do paciente em fila de TxC, periodicamente, de acordo com o protocolo de cada serviço, ou quando há mudança do quadro clínico do paciente (3).

Especificamente quanto à avaliação pré-TxC, os principais dados fornecidos pelo Cateter de Artéria Pulmonar (CAP) a serem levados em consideração são a Pressão Sistólica da Artéria Pulmonar (PSAP), a Pressão Média na Artéria Pulmonar (PMAP), a Pressão de Oclusão na Artéria Pulmonar (POAP) ou Pressão Capilar Pulmonar (PCP), o Gradiente Transpulmonar (GTP) e a Resistência Vascular Pulmonar (RVP) – este último obtido da divisão do GTP pelo Débito Cardíaco (DC) (3). O GTP é definido como a diferença entre a PMAP e a POAP, e tem sido listado como indicador de remodelamento vascular pulmonar (3). A vasodilatação durante o exame, realizada com nitroprussiato de sódio, sildenafil ou óxido nítrico, visa à pronta redução da pressão na artéria pulmonar e da POAP (3). Como consequência, esperam-se uma redução do GTP e um aumento do DC (pela redução da pós-carga do ventrículo direito e da pré-carga do ventrículo esquerdo) e, por conseguinte, da RVP (3). O teste é considerado positivo para vasorreatividade quando a PSAP cai para menos de 50 mmHg, o GTP para menos de 15 e a RVP para 3 ou menos, sem que haja, porém, queda do DC e da pressão arterial sistólica ($< 85\text{mmHg}$) (3). Hipertensão pulmonar irreversível é considerada uma contra-indicação absoluta ao TxC (69). A hipervolemia, constatada pela Pressão Venosa Central (PVC) elevada, também deve ser tratada, visando à redução das pressões pulmonares (70).

2.4 Doença de Chagas e TxC

A doença de Chagas (DCH) é causada por infecção pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi* (71). A maioria dos pacientes infectados é assintomática; manifestações tardias incluem doenças cardíacas e doença gastrointestinal (71). A DCH é endêmica em 21 países do continente latino-americano, sendo presente do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina e do Chile (72). A principal via de transmissão da DCH é por vetores triatomíneos infectados (73). A forma infecciosa tripomastigota do parasita *Trypanosoma cruzi* está presente em grande número nas fezes de triatomíneos infectados (73). Durante ou imediatamente após uma refeição de sangue, o inseto triatomíneo defeca na pele do hospedeiro, permitindo que o organismo entre pela ferida da picada (73). O protozoário também pode entrar via conjuntiva intacta ou membranas mucosas (73). A transmissão também pode ocorrer verticalmente da mãe para o feto, através da transfusão de componentes sanguíneos infectados, via transplante de um órgão de um doador infectado, via ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas ou por

exposição em laboratório (73). Na ausência de sucesso do tratamento antitripanossômico, a infecção é vitalícia; cura espontânea é extremamente rara (73). A DCH é a causa de cerca de 18% dos casos de insuficiência cardíaca refratária em grandes centros do país (74). Além de ser a terceira principal indicação para o TxC no Brasil (74).

A DCH é responsável por um processo inflamatório crônico e persistente do miocárdio que leva à destruição de cardiomiócitos, associado a arritmias e eventos embólicos, que são as principais causas de morte (75). Como não há tratamento algum comprovadamente eficaz para a cura ou capaz de conter a evolução da doença, o quadro progressivo é inevitável (75). O TxC na DCH exige cuidados diferentes em relação às outras cardiomiopatias no que diz respeito aos imunossuppressores, tendo em vista a possibilidade de reativação da doença e desenvolvimento de neoplasias (76). Ainda assim, em um estudo de coorte, incluindo 117 pacientes com DCH submetidos a transplante cardíaco, a sobrevida após o transplante foi melhor do que a sobrevida de pacientes com cardiopatia isquêmica ou cardiomiopatia idiopática (74).

Acredita-se, baseado em observações práticas, que pacientes cardiopatas chagásicos apresentem menores níveis de pressão pulmonar em comparação com pacientes cardiopatas de outras etiologias (67). A função do ventrículo direito frequentemente comprometida nos pacientes em classe funcional IV é muito dependente da pós-carga e não apenas da sua própria contratilidade (77).

A insuficiência cardíaca direita no pós-transplante cardíaco imediato é uma complicação potencialmente grave que pode inclusive levar ao óbito (10). Trata-se de um processo complexo, que não está apenas relacionado à HAP, mas também à reserva do ventrículo direito do doador, aos danos de isquemia / reperfusão durante o procedimento cirúrgico e, provavelmente, ao tamanho do órgão do doador em relação ao destinatário (10). O trabalho de Gelape et al (11) avaliou a pressão sistólica na artéria pulmonar (PSAP) por parâmetros ecocardiográficos e encontrou menores níveis de PSAP na cardiomiopatia chagásica quando se comparado a outros diagnósticos. Em tal estudo também se encontrou menores níveis de resistência vascular por parâmetros hemodinâmicos nos pacientes com cardiomiopatia chagásica (11).

Historicamente, somente o cateterismo cardíaco possibilitava a aferição adequada das pressões no interior da artéria pulmonar, enquanto que os métodos não invasivos demonstravam pouca sensibilidade diagnóstica e limitações significativas (78). O advento da ecocardiografia modo M e bidimensional e, posteriormente sua associação com a modalidade doppler permitiu a resolução dessas limitações e a validação definitiva do método no diagnóstico da HAP (78). Entretanto, o estudo hemodinâmico ainda é necessário nos pacientes com HAP para confirmar

o diagnóstico em questão, avaliar o grau de comprometimento hemodinâmico da doença e testar a vasorreatividade do leito vascular pulmonar (79).

A sobrevida em adultos após TxC ortotópico melhorou nas últimas décadas, resultado de uma cuidadosa seleção de receptores, melhora no cuidado dos doadores, avanços na imunossupressão e prevenção e tratamento de infecções oportunistas (80).

Pode-se dizer que o papel da inflamação é cada vez mais reconhecido na patogênese de vários subtipos de HAP (81,82). A análise de tecido pulmonar doente em pacientes com HAP revela infiltrados de células inflamatórias perivasculares (incluindo linfócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos e células progenitoras derivadas da medula óssea) (83,84). Embora a relação entre a IL-6, IL-1 β , TNF- α e a HAP seja complexa e ainda não completamente compreendida, acredita-se que tais citocinas desempenhem um papel importante na inflamação e remodelação vasculares associadas à HAP. No entanto, é importante ressaltar que a pesquisa nessa área está em andamento, e novas descobertas podem surgir para melhorar a compreensão da relação entre elas e a HAP.

O estudo da expressão das citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α , associado das contagens de CD68 e de neutrófilos CD66b em fragmentos das artérias pulmonares de doadores e de pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica ou não submetidos ao TxC poderá trazer importantes contribuições na elucidação de mecanismos fisiopatológicos envolvidos na HAP e do ponto de vista terapêutico.

3. RELEVÂNCIA

No cenário brasileiro, a miocardiopatia chagásica constitui a terceira causa mais comum de indicação para TxC (85). Não podemos perder de vista que a etiologia chagásica, por si só, constitui pior prognóstico em pacientes com miocardiopatia, se comparada às demais etiologias e, em suas fases avançadas e refratárias ao tratamento clínico otimizado, constitui indicação muito bem estabelecida para TxC (85). A HAP é uma condição bem conhecida, mas em adultos com doença cardíaca chagásica ou não é uma complicação que representa um desafio adicional na avaliação dos candidatos ao TxC. Existem poucas pesquisas sobre o efeito do processo inflamatório e HAP no cenário do TxC em pacientes chagásicos ou não chagásicos. O conhecimento dos níveis das citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α , associado das contagens de CD68 e de neutrófilos CD66b, em fragmentos das artérias pulmonares e aspectos clínicos dos pacientes chagásicos ou não chagásicos submetidos ao TxC poderá trazer importantes contribuições na elucidação de mecanismos fisiopatológicos envolvidos na HAP e também na terapia clínica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e a contagem de macrófagos CD68 e de neutrófilos CD66b no tecido das artérias pulmonares de pacientes chagásicos e não chagásicos submetidos a TxC.

4.2 Objetivos Específicos

Correlacionar os níveis de pressão na artéria pulmonar obtida por meio de estudo hemodinâmico invasivo pré-operatório com a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e a contagem de macrófagos CD68 e de neutrófilos CD66b no tecido das artérias pulmonares de pacientes chagásicos e não chagásicos submetidos a TxC.

Correlacionar a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e a contagem de macrófagos CD68 e de neutrófilos CD66b no tecido das artérias pulmonares com a sobrevida no pós-operatório em pacientes chagásicos e não chagásicos submetidos a TxC.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Seleção de Paciente

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), CAAE: 39274420.0.0000.5149, da Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte/Minas Gerais/Brasil. Todos os procedimentos adotados neste estudo estão de acordo com as Diretrizes e Normas regulamentadoras das pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (Res.196/96). Os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Trata-se de um estudo transversal comparativo de grupos paralelos com algumas variáveis longitudinais.

Foram incluídos pacientes submetidos a TxC no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Hospital Santa Casa de Belo Horizonte no período de janeiro de 2021 a fevereiro de 2023. Os dados clínicos da amostra do estudo foram coletados, por meio de análise de prontuários, acessados pelo computador (banco de dados) dos hospitais participantes.

Não foi possível coletar fragmentos das artérias pulmonares de todos os pacientes submetidos ao TxC em tais centros de referência no período do estudo. Os principais fatores que interferiram na não realização dos experimentos foram a não coleta especificamente da artéria pulmonar, quantidade insuficiente de tecido de artéria pulmonar para os experimentos, ressecção apenas de tecido gorduroso desprovido do vaso em si.

Critérios de inclusão: foram incluídos os doadores e receptores que concordaram em assinar o Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram selecionados pacientes de ambos os sexos, com idade igual ou maior que 18 anos, portadores de cardiomiopatia chagásica ou não submetidos a transplante cardíaco.

Critérios de exclusão: baseado no exame clínico e história patológica pregressa foram excluídos do trabalho os pacientes com câncer, demência, processo inflamatório clinicamente diagnosticável, diabetes mellitus tipo I, história de cirurgia ou trauma nas últimas quatro semanas, gestantes, doença autoimune, sabidamente portadores do vírus da imunodeficiência humana, hepatite C, hepatite B e aqueles que não concordaram em assinar o TCLE.

5.2 Cateterismo cardíaco direito

O estudo hemodinâmico é feito no pré-transplante cardíaco de rotina nos hospitais de acordo como os Guidelines da American Heart Association (86). Definiu-se hipertensão na artéria pulmonar quando a pressão média de artéria pulmonar (PMAP) foi superior a 20 mmHg

(14). A reversibilidade da hipertensão pulmonar foi testada com uso de nitroprussiato de sódio, aplicada via venosa na dose de 0,25 µg/kg/minuto. A hipertensão pulmonar foi considerada fixa quando a RVP não caiu pelo menos 20% do nível basal após o teste com vasodilatador (87).

5.3 Ecocardiograma transtorácico

As imagens foram obtidas por intermédio de aparelhos de ecocardiografia, com transdutores de 2,5 a 3,5 MHz, presentes nos Hospitais das Clínicas da UFMG e na Santa Casa de Belo Horizonte. Os ecocardiogramas foram realizados, empregando-se as técnicas de ecocardiografia uni e bidimensional, doppler pulsado e contínuo guiados por mapeamento de fluxo em cores, conforme já estabelecido (11). Ao estudo bidimensional, os volumes sistólico e diastólico finais do ventrículo esquerdo e a fração de ejeção foram calculados no corte apical duas e quatro câmaras, usando-se o método de Simpson modificado, conforme recomendações da *American Society of Echocardiography* (11). Este método consiste em dividir o ventrículo esquerdo em vários cilindros com dimensões conhecidas. O volume total do ventrículo é obtido pela soma dos volumes dos segmentos, não sofrendo interferência com modificações do contorno ventricular, como nos aneurismas ou diante de alterações segmentares da contratilidade (88). O ventrículo direito foi avaliado essencialmente pelo ecocardiograma bidimensional e sua dimensão expressa em relação ao ventrículo esquerdo. A presença de dilatação e hipocontratilidade foram avaliadas por análise visual ao ecocardiograma bidimensional (89). A presença da regurgitação tricúspide foi determinada pelo Doppler com mapeamento de fluxo em cores. A medida da velocidade máxima da regurgitação tricúspide foi usada para obtenção do gradiente entre o átrio direito e o ventrículo direito através da equação de Bernoulli modificada: gradiente de pressão = $4 \times V^2$, onde V é a velocidade máxima da regurgitação tricúspide registrada. O gradiente assim obtido estimou a PSAP, por meio da fórmula: (PSAP = $4 \times V^2$ + Pressão no átrio direito). (90). Em geral, pelo ecocardiograma transtorácico, define-se pressão sistólica elevada na artéria pulmonar quando superior a 35 mmHg (91).

5.4 Coleta de fragmentos da artéria pulmonar

Foram coletados fragmentos da artéria pulmonar dos doadores e receptores submetidos a cirurgia de TxC em frascos com solução cristalóide do tipo ringer lactato. Os fragmentos foram coletados após a retirada do coração do doador e do receptor.

5.5 Ensaio de imunofluorescência e expressão de CD68 e CD66b:

A artéria pulmonar humana foi isolada e o tecido perivascular circundante foi cuidadosamente removido. Em seguida, segmentos da artéria pulmonar foram incluídos em

meio de congelamento Tissue-Tek® OCT™ (Sakura®, EUA) e cortes transversais (10 µm) das artérias foram obtidos usando um criostato (Leica 1850, Leica, EUA). As lâminas contendo segmentos pulmonares foram fixadas em solução de PFA a 4% por 15 min antes do protocolo de imunofluorescência ser realizado. Em seguida, os cortes transversais foram lavados com soroalbumina bovina (BSA) 1%. BSA 3% diluído em PBS 1×-0,3% Triton-X foi usado por 30 min como solução de bloqueio. As lâminas foram então lavadas novamente com BSA 1% e incubadas com os seguintes anticorpos primários, diluídos em BSA 3%: anti-CD68 (Camundongo 1:300, Invitrogen - Thermo fisher, MA5-13324) e anti-CD66b (Cabra, Abcan, ab197678) após incubação durante a noite em câmara úmida a 4 °C. Para os controles negativos dos anticorpos primários, as lâminas foram incubadas apenas com solução de bloqueio. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas novamente com BSA 1%, e o anticorpo secundário (cabra anti-coelho, 1:300 Alexa Fluor 555, Thermo-Fisher, ou cabra anti-camundongo, 1:300 Alexa Fluor 555, Abcam) foi adicionado por 1 h em temperatura ambiente. Após esse tempo, as lâminas foram incubadas com o corante fluorescente seletivo nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato) 1:500 por 5 min. Finalmente, as lâminas foram seladas e as imagens de dois cortes transversais de cada lâmina foram capturadas em um microscópio Zeiss-APOTOME sob uma objetiva de 20x. O software Fiji (versão 1.51j8) foi utilizado para quantificar a quantidade de células positivas para marcação de interesse e núcleo. O resultado foi expresso como número de células positivas por µm² de tecido.

5.6 Processamento da artéria pulmonar para dosagem de citocinas:

Para avaliação do perfil inflamatório, foi realizado a quantificação das citocinas inflamatórias IL-1 β, TNF-α, IL-6 em fragmentos de artéria pulmonar. A técnica de ensaio ImmunoSorbent (ELISA) foi utilizada para quantificação da concentração de TNF-α (cat. No. 555212, LOT. 2060428), IL-6 (cat. No. 555220; LOT. 1117481) e IL-1 β (cat. No. 557953; LOT. 1159510) conforme indicado nas instruções dos kits comerciais (R&D Systems). Os fragmentos da artéria pulmonar foram isolados e removidos de forma cuidadosa do tecido perivascular circundante. A artéria pulmonar foi homogeneizada em tampão de extração de citocinas, centrifugada e o sobrenadante foi coletado para dosagem. A concentração de citocinas foi determinada a partir de uma curva de concentrações conhecidas usando um leitor de microplacas equipado com uma luz de excitação de 492 nm (Epoch Biotech, Winooski, EUA). Os resultados foram apresentados como picograma (pg) de proteína por mililitro de tecido (pg/ml).

5.7 Análise Estatística

Neste estudo foram apresentadas as medidas descritivas mediana (Q_2), Quartis (Q_1 e Q_3), média e desvio-padrão (d.p.) para descrever, respectivamente, as variáveis do tipo quantitativa de distribuição não-normal e normal; e frequências absoluta (n) e relativa (%) como estatísticas para descrever os resultados das variáveis do tipo categórica. Foram feitas correlações entre as medidas dos biomarcadores inflamatórios e os parâmetros hemodinâmicos dos pacientes pelo método correlação de Spearman. Variáveis qualitativas foram avaliadas e sua associação testada por meio dos testes de Qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher. Comparação da distribuição entre as medidas (Mediana, Q_1 e Q_3) da variável foram efetuadas pelos testes Mann-Whitney e teste de Wilcoxon. O índice de concordância de Kappa (K) foi um teste não-paramétrico utilizado para avaliar o nível de concordância através do cruzamento dos resultados obtidos por duas variáveis categóricas de interesse avaliadas numa mesma unidade amostral. Todos os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5 ($p < 0,05$), tendo, portanto, pelo menos 95 de confiança nas conclusões apresentadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão apresentados por meio de três artigos. O primeiro, intitulado “Crosstalk between cytokines, inflammation and pulmonary arterial hypertension in heart transplant patients”, foi publicado no periódico *Cytokine*, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2024.156709>. O segundo artigo, intitulado “Avaliação de biomarcadores inflamatórios em artérias pulmonares de transplantados cardíacos chagásicos e não chagásicos”, foi publicado no periódico *Brazilian Journal of Transplantation*, https://doi.org/10.53855/bjt.v27i1.561_PORT. O terceiro artigo, intitulado “Correlation of inflammatory markers with prognostic factors in heart transplant patients”, foi submetido para publicação no periódico *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*.

6.1 Artigo 1

Situação: publicado no periódico *Cytokine*, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2024.156709>.

Crosstalk between cytokines, inflammation and pulmonary arterial hypertension in heart transplant patients

Marcus Vinícius de Paula da Silva, MD, MSc^a; Ildernandes Vieira-Alves PhD^b; Antonielle Rodrigues Pereira Alves, MSc^b; Virginia Soares Lemos, PhD^b; Gabriel Assis Lopes do Carmo, MD, PhD^a; Fábio Morato de Castilho, MD, PhD^a; Cláudio Léo Gelape, MD, PhD^a.

^aDepartment of Cardiovascular Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; From the ^bDepartment of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais.

Correspondence: Marcus Vinícius de Paula da Silva, MD, MSc, Department of Cardiovascular Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Av. Alfredo Balena, 110 - Cardiology and Cardiovascular Surgery Service, 30130100, Funcionários, Minas Gerais, Brazil. (marcus@cardiol.br).

ABBREVIATIONS PAGE

Body mass index (BMI)

Bovine serum albumin (BSA)

cardiac index (CI)

Chagas cardiomyopathy (CCM)

Cluster of differentiation 66b (CD66b)

Cluster of differentiation 68 (CD68)

Ejection fraction (FE)

Enzyme-linked ImmunoSorbent assay (ELISA)

Heart failure (HF)

Heart transplant (HT)

Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin – 6 (IL-6)

Mean pulmonary artery pressure (mPAP)

Milliliter (mL)

Picogram (pg)

Pulmonary arterial hypertension (PAH)

Pulmonary artery pressure, diastolic (dPAP)

Pulmonary artery pressure systolic (sPAP)

Pulmonary vascular resistance (PVR)

Pulmonary vascular resistance after sodium nitroprusside (PVRnps)

Pulmonary vascular resistance index (PVRI)

Right atrial pressure (RAP)

Transpulmonary pressure gradient (GTP)

Tumor necrosis factor – α (TNF- α)

ABSTRACT

BACKGROUND: Heart transplant (HT) is a therapeutic option for patients with advanced heart failure (HF) refractory to optimized treatment. Patients with advanced HF often develop pulmonary arterial hypertension (PAH). PAH is defined as a condition in which the mean pulmonary artery pressure is greater than 20 mmHg. Inflammation is an important aspect of PAH development. In this context, the objective of this work was to evaluate the relationship between the inflammatory process and the development of HAP in patients undergoing HT. **METHODS:** The levels of interleukins IL-6, IL-1 β and TNF- α were obtained by ELISA and

associated with CD68+ and CD66b neutrophil counts using the immunofluorescence technique in fragments of the pulmonary arteries of donors and patients with or without chagasic cardiomyopathy subjected to HT. RESULTS: The results showed a positive, statistically significant correlation ($p < 0.05$) between right atrium pressure levels and IL-6. Furthermore, negative, moderate, and statistically significant correlations ($p < 0.05$) were observed between the variables cardiac index and TNF- α , and between the levels of transpulmonary pressure gradient and TNF- α . The study also revealed the presence of a statistically significant difference ($p < 0.05$) between patients who died within 30 days and the highest number of CD68 cells per square micrometer in the vessel of the donor and recipient patient CONCLUSION: Suggesting the presence of a pro-inflammatory profile in HT patients, independent of measured pulmonary artery pressure levels.

HIGHLIGHTS

- Heart transplants have a pro-inflammatory profile
- Higher number of CD68 cells in the pulmonary artery is related to death within 30 days
- Inflammation is an important aspect of development pulmonary arterial hypertension

INTRODUCTION

In Brazil, Chagas cardiomyopathy (CCM) is the third most common indication for heart transplant (HT) ¹. We cannot lose sight of the fact that chagasic etiology, in itself, constitutes a worse prognosis in patients with cardiomyopathy compared to other etiologies in its advanced stages and refractory to optimized clinical treatment, it constitutes a very well-established indication for HT ¹. CCM causes chronic inflammation of the myocardium, leading to cardiomyocyte destruction, arrhythmias, and embolic events, which are the main causes of death. ²

Patients with advanced heart failure (HF) often develop pulmonary arterial hypertension (PAH) ³. PAH is defined as a condition in which the mean pulmonary artery pressure is greater than 20 mm Hg ⁴. Inflammation is an important aspect ⁵. There appears to be an initial insult to the endothelium that leads to the propagation of an inflammatory process with the production of cytokines, leading to the production of growth factors and culminating in vascular remodeling ⁵. Little research has been conducted on the effect of the inflammatory process and PAH in the setting of HT in chagasic or non-chagasic patients.

The cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α are proteins produced by monocytes/macrophages, endothelial cells, and many other types of cells and have pro-

inflammatory actions⁶. These cytokines may be particularly relevant to the pathogenesis of PAH by initiating and/or progressing the growth of smooth muscle cells, fibroblasts and endothelial cells, and in the occurrence of microthrombotic conditions, lesions commonly associated with severe PAH⁷.

Macrophages and neutrophils were found to cluster around the pulmonary vessels in patients with PAH⁸. Neutrophils have received little attention in the pathogenesis of PAH; however it is evident from both experimental and clinical studies that neutrophil elastase can influence such pathogenesis⁹. An increase in neutrophil elastase in smooth muscle cells of patients with PAH has been demonstrated¹⁰. Neutrophilic elastase is also present in smooth muscle cells of the pulmonary artery fragments of mice exposed to chronic hypoxia¹¹.

Cluster of differentiation 66b (CD66b) is a cell adhesion molecule that marks neutrophil activation in response to pro-inflammatory stimuli¹². Cluster of differentiation 68 (CD68) is a transmembrane glycoprotein expressed by monocytes and macrophages¹³. Increased numbers of CD68 have been reported in patients with PAH and in animal studies on PAH^{14,15}. However, the exact role of macrophages and whether their presence or absence is necessary for the vascular remodeling observed in PAH remains unclear¹⁶.

Understanding the etiology and mechanism of PAH in HT candidates, along with the contribution of local inflammation, can open a promising field of research to improve patient clinical status and increase HT eligibility.

The objective of this study was to evaluate the expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 and the count of CD68 macrophages and CD66b neutrophils in the pulmonary artery tissue of chagasic and non-chagasic patients undergoing HT, and to correlate the pressure levels in the pulmonary artery obtained through a preoperative invasive hemodynamic study and survival in the postoperative period of HT surgery with the expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 and the count of CD68 macrophages and CD66b neutrophils in the pulmonary artery tissue of chagasic and non-chagasic patients undergoing HT.

METHODS

Study population

The study protocol complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the UFMG Institutional Review Board. All patients provide written consent for this cross-sectional comparative study of parallel groups.

The trial was conducted at two centers in Minas Gerais, Brazil. 29 patients and 29 donors who underwent HT at the Hospital das Clínicas of the Universidade Federal of Minas Gerais and Santa Casa Hospital were included in the study. Patients were enrolled from January, 2021 with the last subject completing the study in February, 2023. The clinical data of the study sample were collected through the analysis of medical records, accessed by the computer (database) of the participating hospitals.

Participants suffering from autoimmune diseases, cancer, dementia, clinically diagnosable inflammatory process, pregnant women, previous diagnosis of thyroid disease, history of surgery or trauma in the last four weeks, were excluded. Baseline hemodynamic parameters obtained during right heart catheterization and echocardiography were included in the analysis as available. This is a comparative cross-sectional study of parallel groups with some longitudinal variables.

Pulmonary artery collection

Pulmonary artery fragments were collected from donors and recipients undergoing HT in vials containing the Ringer's lactate crystalloid solution. Fragments were collected after removing donor and recipient hearts.

It was not possible to collect fragments of the pulmonary arteries from all patients undergoing HT at these reference centers during the study period. The main factors that interfered with the non-performance of the experiments were not specifically collecting the pulmonary artery, insufficient quantity of pulmonary artery tissue for the experiments, and resection of fatty tissue devoid of the vessel itself.

Quantification of inflammatory biomarkers

To evaluate the inflammatory profile, the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 were quantified in the pulmonary artery fragments. The Enzyme-linked ImmunoSorbent assay (ELISA) technique was used to quantify the concentrations of TNF- α (Catalog number 555212, LOT. 2060428), IL-6 (Catalog number 555220; LOT. 1117481) and IL-1 β (Catalog number 557953; LOT. 1159510) as indicated by the manufacturers instructions of the commercial kits (R&D Systems). Fragments of the pulmonary artery were isolated and carefully removed from the surrounding perivascular tissue. For protein extraction, 100 mg of tissue was weighed, 10 times the tissue volume of cytokine extraction buffer was added and the mechanical homogenization process was performed. The material was then centrifuged and the supernatant was collected to measure the cytokines of interest. Cytokine concentration was determined from a curve of known concentrations using a microplate reader equipped with a 492 nm excitation

light (Epoch Biotech, Winooski, USA). Results are presented as picograms (pg) of protein per milliliter (mL) of tissue (pg/100 mg of tissue). The ELISA was performed in duplicate.

The human pulmonary artery was isolated and the surrounding perivascular tissue was carefully removed. Then, pulmonary artery segments were embedded in Tissue-Tek® OCT™ freezing medium (Sakura®, USA) and cross-sections (10 µm) of the arteries were obtained using a cryostat. Slides containing lung segments were fixed in a 4% PFA solution for 15 min before the immunofluorescence protocol was performed. The transverse sections were washed with 1% bovine serum albumin (BSA). BSA (3%) diluted in PBS 1×-0.3% Triton-X was used for 30 min as a blocking solution. The slides were then washed again with 1% BSA and incubated with the following primary antibodies, diluted in 3% BSA: anti-CD68 and anti-CD66b after incubation overnight in a humid chamber at 4 °C. For the primary antibody negative controls, the slides were incubated with blocking solution only. The next day, the slides were washed again with 1% BSA, and the secondary antibody was added for 1 h at room temperature. The slides were then incubated with the nuclear selective fluorescent dye DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride- DAPI) (1:500) for 5 min. Finally, the slides were sealed and images of two cross sections from each slide were captured on a Zeiss-APOTOME microscope under a 20x objective. Fiji software (version 1.51j8) was used to quantify the number of positive cells for the labeling of interest and nuclei. The results are expressed as the number of positive cells per µm² of tissue.

Statistical analysis

In this study, the descriptive measures median (Q2), quartiles (Q1 and Q3), mean and standard deviation were presented to describe, respectively, the quantitative variables with non-normal and normal distribution and absolute (n) and relative frequencies (%) as statistics to describe the results of categorical variables. Correlations were made between the measurements of inflammatory biomarkers and patients' hemodynamic parameters using the Spearman correlation method. Qualitative variables were evaluated, and their association was tested using Pearson's chi-square test and Fisher's exact test. Comparison of the distribution between the measurements (Median, Q1 and Q3) of the variables was carried out using the Mann-Whitney test and Wilcoxon test. The p-value 0.05 was considered significant.

RESULTS

Table 1 shows the detailed profiles of both the populations studied (heart transplant recipients and donors).

Table 1 – Clinical characteristics of recipient patients (HT) and donors

Parameters	Recipients	Donors	p
	n = 29	n = 29	
Age (years) ^a	54,9 ± 9,1	32,6 ± 11,3	0,001
Sex (Female/Male)	13/16	19/10	
BMI ^a	23,1 ± 4,7	26,3 ± 0,8	0,001

^a Data are expressed as mean ± standard deviation, Student's t test for dependent samples.

BMI = body mass index

We compared the expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 and the number of CD68 macrophages and CD66b neutrophils in the pulmonary artery tissue of recipients and donors. To investigate whether there was a difference between recipient and donor pairs regarding the measurements of variables related to inflammatory markers, the non-parametric Wilcoxon test was applied to the data as shown in Table 2.

Table 2 – Descriptive and comparative analyzes between recipients and donors regarding the number of CD66B and CD68 cells per square micrometer and cytokine concentration (pg/mL)

Variables*	Recipients	Donors	p	r
CD66b	0,000120(0,000061 – 0,000239) (n = 13)	0,000278(0,000183 – 0,000344) (n = 13)	0,075	0,49
CD68	0,00001462(0,00000772 – 0,00002159) (n = 16)	0,00004417(0,00003024 – 0,00007929) (n = 16)	0,001	0,87
IL-6	385,7 (339,0 – 598,2) (n = 14)	449,4 (356,2 – 620,2) (n = 14)	0,753	0,08
IL-1 β	147,3 (100,4 – 334,1) (n = 14)	130,4 (67,6 – 409,9) (n = 14)	0,826	0,22
TNF- α	900,0 (365,0 – 1.530,0) (n = 13)	1.290,0 (600,0 -3.045,0) (n = 13)	0,087	0,47

DATABASE: 29 patients overall

NOTE: p → Wilcoxon test significance probability (Z → Test statistic).

r → Effect size for non-parametric test.

*Median, first quartile (Q1), third quartile (Q3).

A statistically significant difference ($p = 0.001$; $r = 0.87$) was observed between the recipient and donor pairs only with regard to the variable CD68, and the distribution of the variable CD68 was significantly greater in the group of donors (median = 0.00004417; Q1 = 0.00003024 and Q3 = 0.00007929) than in the group of recipients (median = 0.00001462; Q1 = 0.00000772 and Q3 = 0.00002159).

Representative examples of immunofluorescence staining that allowed for the counting of CD68 macrophages and CD66b neutrophils in the pulmonary artery tissue of recipients and donors are shown in figures 1 and 2.

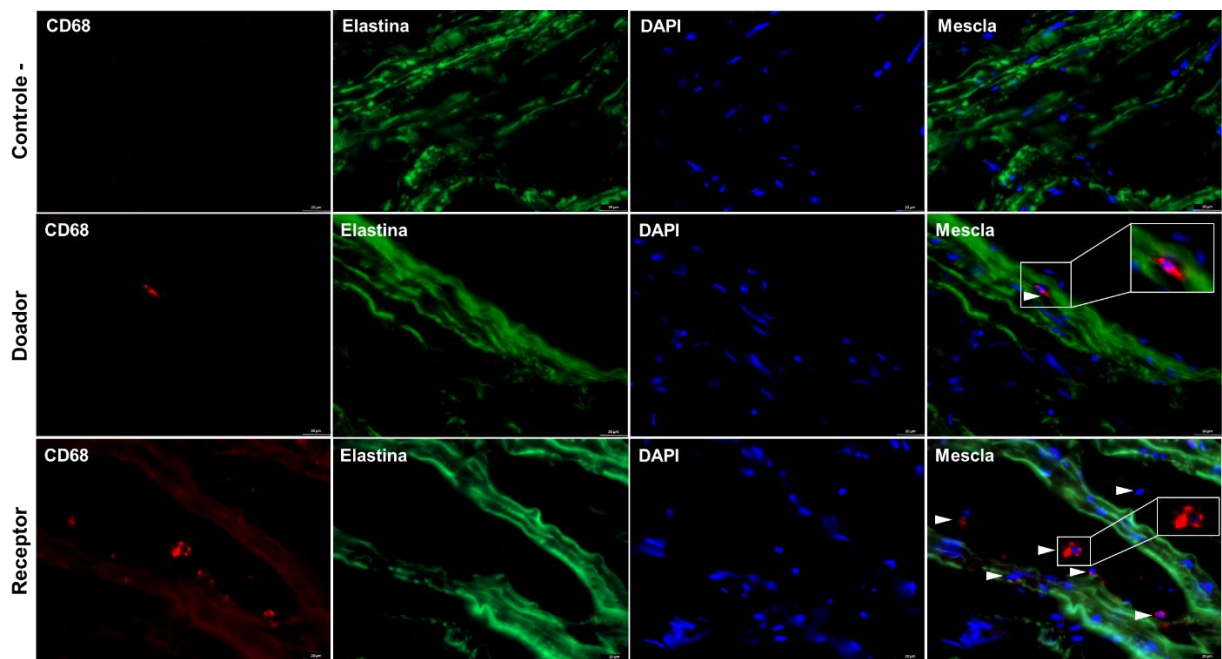


Figure 1 - Representative image of immunostaining of the CD68 molecule showing the presence of macrophages in the pulmonary artery, showing CD68 in red color, elastin autofluorescence in green, cell nucleus in blue and merged in the right corner. Arrows show CD68 staining in red.

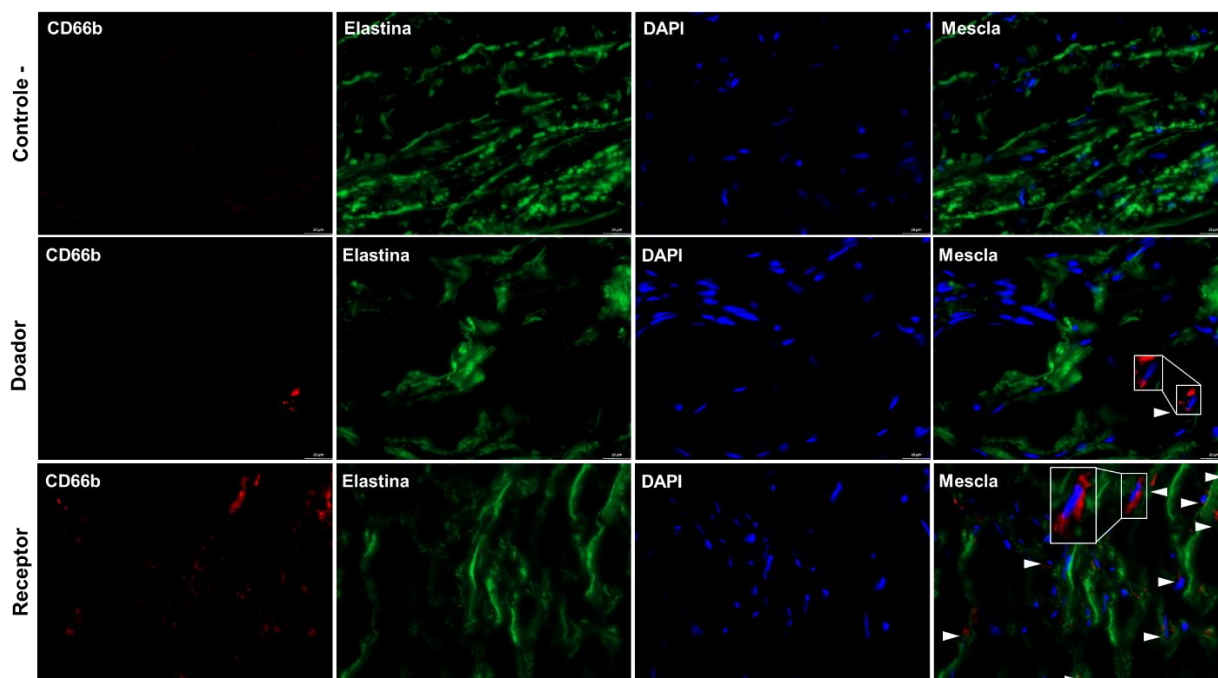


Figure 2 - Representative image of immunostaining of the CD66b molecule showing the presence of neutrophils in the pulmonary artery, showing CD66b in red color, elastin autofluorescence in green, cell nucleus in blue and merged in the right corner. Arrows show CD66b staining in red.

After characterizing the recipient and donor groups, clinical characteristics, expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6, and the count of CD68 macrophages and CD66b neutrophils in the tissue of the pulmonary arteries of chagasic patients and non-chagasic patients undergoing HT were determined.

As shown in Table 3, there was no statistically significant difference ($p \geq 0.05$) between chagasic and non-chagasic recipient patients in terms of physiological variables (age and BMI), echocardiographic, manometric and variables related to inflammatory markers. That is, the distribution of each of the variables of interest is similar between the chagasic and non-chagasic groups.

Table 3 – Descriptive and comparative analyzes between chagasic or non-chagasic recipients regarding clinical, echocardiographic and manometric variables, number of CD66B and CD68 cells per square micrometer and cytokine concentration (pg/ml)

Chagasic				
Variables*	Yes	No	p	r
Age (years)	58,0 (51,0 – 61,0) (n = 19)	55,0 (41,5 – 59,5) (n = 10)	0,370	0,17
IMC	21,4 (18,7 – 24,2) (n = 19)	23,9 (20,9 – 30,4) (n = 10)	0,099	0,31
FE (%)	23,0 (20,0 – 25,0) (n = 19)	22,0 (17,0 – 35,5) (n = 9)	0,844	0,04
SPApecho(mmHg)	41,0 (33,0 – 47,0) (n = 19)	40,0 (26,8 – 47,3) (n = 10)	0,890	0,03
RAP (mmHg)	10,0 (6,5 – 13,3) (n = 18)	8,0 (3,8 – 12,3) (n = 10)	0,386	0,16
sPAP (mmHg)	42,0 (32,0 – 55,0) (n = 19)	49,5 (32,3 – 72,0) (n = 10)	0,302	0,19
dPAP (mmHg)	22,0 (13,0 – 26,0) (n = 19)	21,5 (14,5 – 33,0) (n = 10)	0,535	0,12
mPAP (mmHg)	25,3 (19,3 – 35,0) (n = 19)	31,0 (20,9 – 49,3) (n = 10)	0,383	0,16
CI (L/Min/m ²)	1,56 (1,45 – 1,83) (n = 19)	1,88 (1,50 – 2,07) (n = 10)	0,449	0,14
PVR (W)	3,24 (1,96 – 5,36) (n = 19)	3,70 (2,57 – 7,75) (n = 10)	0,582	0,10
PVRI (W)	5,12 (3,95 – 9,84) (n = 19)	6,39 (4,72 – 12,53) (n = 10)	0,359	0,17
GTP (mmHg)	10,0 (6,0 – 16,0) (n = 18)	13,5 (6,8 – 21,3) (n = 10)	0,301	0,20
PVRnps (W)	2,74 (2,47 – 3,46) (n = 9)	1,77 (0,94 – 3,05) (n = 8)	0,178	0,33
CD66b	0,000130 (0,000047 – 0,000172) (n = 15)	0,000161(0,000061 – 0,000234)(n = 16)	0,484	0,15
CD68	0,00001202(0,00000811– 0,00002136) (n = 15)	0,00001854(0,00000196 – 0,00002204)(n = 7)	0,751	0,07
IL-6	393,6 (344,3 – 630,3) (n = 16)	378,7 (335,0 – 470,8) (n = 8)	0,624	0,10
IL-1 β	152,2 (124,9 – 334,1) (n = 14)	168,5 (94,9 – 508,4) (n = 9)	1,000	0.0

TNF- α	1.100,0(657,5 – 1.777,5) (n = 12)	770,0 (277,5 – 1.210,0) (n = 8)	0,280	0,24
---------------	--------------------------------------	------------------------------------	-------	------

DATABASE: 29 patients overall

NOTE: $p \rightarrow$ Mann-Whitney test significance probability ($Z \rightarrow$ Test statistic).

$r \rightarrow$ Effect size for non-parametric test.

*Median, first quartile (Q1), third quartile (Q3).

- Hemodynamic measures obtained during echocardiogram: FE = Ejection fraction; sPAPEcho – Pulmonary artery pressure, systolic.

- Hemodynamic measures obtained during right heart catheterization: RAP = right atrial pressure, mean; sPAP = Pulmonary artery pressure, systolic; dPAP = Pulmonary artery pressure, diastolic; mPAP = Pulmonary artery pressure, mean; CI = Cardiac index; PVR = pulmonary vascular resistance; PVRI = pulmonary vascular resistance index; GTP = Transpulmonary pressure gradient; PVRnps = pulmonary vascular resistance after sodium nitroprusside.

To investigate the existence of a relationship in pairs between each of the echocardiographic and manometric variables, with each of the variables referring to inflammatory markers, Spearman's correlation analysis (non-parametric test) was applied to the data of chagasic and non-chagasic patients undergoing HT. As shown in Table 4, there is a statistically significant correlation ($r = 0.44$; $p = 0.031$), directly proportional and with a moderate degree of correlation ($0.40 \leq r \leq 0.75$) between the variables right atrial pressure (RAP) and IL-6.

Table 4 – Correlation of manometric variables with the number of cells per square micrometer and concentration of cytokines in HT patients (recipients)

Variables	Cytokines					
	CD66b	CD68	IL-6	IL-1 β	TNF- α	
RAP (mmHg)	-0,22 0,363 0,048 (n = 20)	-0,34 0,127 0,115 (n = 21)	0,44 0,031 0,193 (n = 24)	0,19 0,393 0,03 (n = 23)	0,14 0,550 0,01 (n = 20)	(r) (p) (R ²)
CI (L/Min/m ²)	-0,05 0,834 0,002 (n = 21)	0,21 0,35 0,044 (n = 22)	-0,35 0,093 0,122 (n = 24)	-0,10 0,639 0,01 (n = 23)	-0,51 0,021 0,26 (n = 20)	(r) (p) (R ²)
GTP (mmHg)	-0,35 0,134 0,122 (n = 20)	-0,11 0,644 0,012 (n = 21)	-0,03 0,884 0,009 (n = 24)	0,00 0,991 0 (n = 23)	-0,51 0,023 0,26 (n = 20)	(r) (p) (R ²)

DATABASE: 29 patients overall

NOTE: 1st line $\rightarrow$ Spearman Correlation Coefficient (r).

2nd line → Probability of significance (p) referring to Spearman Correlation Analysis.

3th line → Coefficient of Determination (R^2)

- Hemodynamic measures obtained during right heart catheterization: RAP = right atrial pressure, mean; CI = Cardiac index; GTP = Transpulmonary pressure gradient.

R^2 (Coeficiente de determinação)

Furthermore, there was a statistically significant correlation ($r = -0.51$; $p = 0.021$), inversely proportional and with a moderate degree of correlation ($0.40 \leq r \leq 0.75$) between the cardiac index (CI) variables and TNF- α and it was also observed that there is a statistically significant correlation ($r = -0.51$; $p = 0.023$), inversely proportional and with a moderate degree of correlation ($0.40 \leq r \leq 0.75$) between the variables transpulmonary gradient (GTP) and “TNF- α ”. In this way, it can be stated that the statistically significant correlations found are not statistically null.

No other statistically significant correlation ($p < 0.05$) was found in pairs between the echocardiographic and manometric variables, with each of the variables relating to inflammatory markers.

When analyzing whether there was a correlation between the recipients who died within 30 days (Table 5) in relation to the measurements of each of the five inflammatory marker variables in the recipient's pulmonary artery fragments, the non-parametric Mann-Whitney test revealed a statistically significant difference ($p < 0.05$) between patients who died within 30 days and the highest number of CD68 cells per square micrometer in the recipient patient's vessel.

Table 5 – Association of the variable death within 30 days with the number of CD66b and CD68 cells per square micrometer and concentration of cytokines (pg/ml) in the receptor fragments

Variables*	Death in 30 days		p	r
	Yes	No		
CD66b	0,000251 (0,000111 – 0,012661) (n = 5)	0,000125 (0,000050 – 0,000167) (n = 16)	0,083	0,38
CD68	0,00002385 (0,00001997 – 0,00003244) (n = 5)	0,00001084 (0,00000744 – 0,00001825) (n = 17)	0,003	0,63
IL-6	376,5 (284,1 – 468,1) (n = 4)	385,7 (342,1 – 630,3) (n = 20)	0,535	0,13
IL-1 β	312,6 (— — —) (n = 3)	152,2 (109,6 – 342,3) (n = 20)	--	--
TNF- α	— (— — —) (n = 1)	900,0 (390,0 – 1.770,0) (n = 19)	--	--

DATABASE: 29 patients overall

NOTE: **p** → Mann-Whitney test significance probability (**Z** → Test statistic).

r → Effect size for non-parametric test.

The difference between the total number of patients surveyed and the total number of patients presented in table (n) for each variable refers to the number of cases without information.

*Median, first quartile (Q1), third quartile (Q3).

When analyzing whether there were differences between recipients who died within 30 days and the number of CD66b or CD68 cells per square micrometer in the donor's pulmonary artery fragments, the Mann-Whitney non-parametric test revealed a statistically significant difference ($p < 0.05$) among patients who died within 30 days and the highest number of CD68 cells per square micrometer in the donor patient's vessel (Table 6).

Table 6 - Association of the variable death within 30 days with the number of CD66b and CD68 cells per square micrometer and concentration of cytokines (pg/ml) in donor fragments

Variables*	Death in 30 days		p	r
	Yes	No		
CD66b	0,000278 (0,000154 – 0,000310) (n = 5)	0,000301 (0,000241 – 0,000382) (n = 10)	0,310	0,28
CD68	0,00009034 (0,00006309 – 0,00009532) (n = 4)	0,00003841(0,00002826 – 0,00005863) (n = 13)	0,010	0,60

DATABASE: 29 patients overall

NOTE: **p** → Mann-Whitney test significance probability (**Z** → Test statistic).

r → Effect size for non-parametric test.

The difference between the total number of patients surveyed and the total number of patients presented in table (n), for each variable refers to the number of cases without information.

*Median, first quartile (Q1), third quartile (Q3).

DISCUSSION

We carried out a pioneering quantitative analysis of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 and the count of CD68 macrophages and CD66b neutrophils in the pulmonary artery tissue of recipients and donors at the time of HT. It is believed that the dosage of such inflammatory biomarkers in the pulmonary artery tissue better reflects the inflammatory process in the vessel than the analysis performed in the plasma of surgical patients, which is known to be very high ¹⁷.

Increased pulmonary pressure is an important predictor of death after HT ¹⁸. The mean pulmonary artery pressure (mPAP) obtained during right heart catheterization was 44.7 ± 15.8 in chagasic patients and 53.4 ± 21.1 in non-chagasic patients. When comparing the various pressure parameters measured by right heart catheterization and echocardiography, there was no significant difference between the levels of these parameters and whether the patient was chagasic (Table 3). Gelape et al. found lower levels of pulmonary vascular resistance based on hemodynamic parameters in patients with CCM ¹⁹, which was not identified in our study.

Our results demonstrated that the levels of the inflammatory biomarkers IL-1 β , TNF- α and IL-6 in pulmonary artery tissue were the same in both HT recipients and donors, suggesting the presence of a pro-inflammatory profile in patients with HT and donors. No difference was

found in the concentrations of these biomarkers when compared with the measured pulmonary artery pressure levels. However, a positive correlation was observed between RAP and IL-6, and negative correlations were observed between CI and TNF- α and between GTP and TNF- α (Table 4).

The most accepted hypothesis for finding inflammation in donor pulmonary artery tissue is injury induced by brain death. Mangini et al. demonstrated the presence of a similar inflammatory infiltrate in the myocardial tissue of donors and cardiomyopathies²⁰. Brain death is responsible for a series of neuro-endocrine and hemodynamic changes, particularly through intense activation of the sympathetic system.²¹ Adrenergic storm can lead to myocardial injury, including infiltration of inflammatory cells, which can compromise heart function both before and after transplantation.²¹

In addition to increased perivascular immune cells and intravascular infiltration, circulating levels of certain cytokines are abnormally elevated in PAH patients. These include interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α ⁹.

Chronic HF activates the immune system and inflammatory responses, which are characterized by elevated levels of circulating pro-inflammatory cytokines^{22,23}. Inflammatory factors, such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, are increased in patients with HF²⁴. Small animal models of myocarditis and pressure overload have suggested immune activation during HF²⁵. The positive correlation between RAP and IL-6 levels and the negative correlation between CI and TNF- α levels can be supported by such arguments.

Humbert studied the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the serum of 29 patients with severe PAH referred to a lung transplant center. Serum TNF- α levels were within the normal range in the PAH and control groups. This is in contrast to the increased serum levels of IL-1 β and IL-6 observed in patients with severe PAH⁷. A study by Ildernandes et al. showed that genetic deletion of the type 1 TNF receptor prevented the increase in the expression of inducible nitric oxide synthase (an enzyme that produces nitric oxide in infectious or inflammatory conditions) caused by betacoronavirus infections and the dysfunction of vascular contractility mediated by nitric oxide²⁶. These findings are consistent with the negative correlation between GTP and TNF- α observed in this study.

The receptors studied here had increased levels of the cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6, regardless of chagasic etiology (Table 3), suggesting the participation of these inflammatory markers in the pathophysiological process of HF. These data demonstrated that the etiology of cardiomyopathy does not influence the levels of inflammatory cytokines.

IL-6 is a pro-inflammatory cytokine that is significantly associated with mortality in patients with PAH ²⁷. Similar findings have been reported for patients with congestive HF. These data suggested that IL-6 plays a role in the pathophysiology of HF and PAH ²⁸.

IL-1 β is a potent pro-inflammatory cytokine ⁵. In PAH studies, elevated serum IL-1 β levels were correlated with worse prognosis ²⁹. Furthermore, in an animal model study, treatment with an IL-1 receptor antagonist reduced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy ³⁰.

In this study, no correlation was observed between recipients who died within 30 days (Table 7) in relation to measurements of the inflammatory markers TNF- α , IL-1 β and IL-6, as both had increased levels of cytokines. As described by Rabinovitch, cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 are implicated in patient survival ⁹.

The results of this study showed that the number of CD66b cells per square micrometer in pulmonary artery tissue was similar in the donor and HT recipient groups. The number of CD68 cells per square micrometer in pulmonary artery tissue was higher in the control group than in the recipient group (Table 2).

We compared the number of CD68 and CD66b cells in the pulmonary artery of the recipient and donor groups among recipients who died within 30 days and found that the increased number of CD68 cells in the pulmonary artery of the recipient and donor was a predictive factor for death within 30 days after HT (Tables 5 and 6).

Recent studies have focused on the role of perivascular macrophages in the infiltration of pulmonary arterioles in PAH ⁹. CD68 macrophages are prominent in advanced obliterating plexiform lesions observed in experimental and clinical studies of PAH ^{31,32} and depletion or inactivation of macrophages prevents PAH in several experimental models ^{33,34}.

In an experimental study of PAH carried out by Xu et al. through intraperitoneal injection of monocrotaline to induce pulmonary hypertension in rats, the distribution and density of CD68-positive macrophages in lung tissues were compared ³⁵. It was evident in the experiment that the density of CD68-positive macrophages in lung tissues increased slightly on days 3 and 7, and increased significantly on days 14 and 28 ³⁵. This was mainly observed in the alveolar regions and small pulmonary vessels. In large pulmonary vessels, the increase was not significant over time ³⁵. This may indicate that the involvement of CD68 in the pathophysiology of PAH occurs preferentially in the more distal vessels. The present study was performed using proximal fragments of pulmonary arteries. This may explain the lower number of CD68 cells per square micrometer in the pulmonary artery tissue in the recipient group than in the donor group.

The study by Pinto et al. found no significant difference when comparing the number of CD68 cells in the wall of peripheral pulmonary arteries in patients with HAP and their control group³⁶. Mangini et al. evaluated the count of CD68 macrophages in biopsy fragments from the right ventricle and found no difference in their numbers between donors and cardiomyopathies²⁰.

Histological studies on donors are scarce and have described the presence of apoptosis, necrosis in contraction bands and small inflammatory infiltrates with a mononuclear pattern, including lymphocytes and macrophages^{37,38}. The most accepted hypothesis for finding inflammation in donor myocardial tissue is injury induced by brain death²⁰. Therefore, the high number of CD68 cells per square micrometer in the pulmonary artery tissue of the control group was justified.

In our series, the increased number of CD68 cells in the pulmonary artery of the donor and recipient was a predictive factor for death within 30 days after HT in the recipient. New studies using this marker would be useful in clarifying these issues.

Neutrophils are the most abundant type of white blood cells in human circulation¹². In contrast to monocytes and macrophages, they have traditionally been considered bystanders of cardiovascular disease; however, recent studies have demonstrated the important functional roles of neutrophils in inflammation and cardiovascular repair^{39,40}.

In the case of inflammation, neutrophils are rapidly recruited from the bloodstream to tissues⁴¹. CD66b is a marker of neutrophil activation. In the present study, the number of CD66b cells per square micrometer in pulmonary artery tissue was similar in the donor group and in the HT recipient group, both situations in which there is inflammation and hypoxemia.

Data reported by Prausmuller et al. CD66b neutrophils were inversely correlated with HF severity as reflected by B-type natriuretic peptide hormone levels and NYHA class¹². The analysis of the results did not reveal a significant association between CD66b expression and all-cause mortality in this population¹². Therefore, the present study did not find a correlation between CD66b levels and death within 30 days.

CONCLUSION

The authors suggest the presence of a pro-inflammatory profile in the pulmonary artery tissue of HT recipients, and likewise, in their donors, regardless of the measured levels of pressure in the pulmonary artery. Furthermore, negative correlations were observed between the variables CI and TNF- α , and between the levels GTP and TNF- α , and a positive correlation

between the pressure levels in the right atrium and IL-6. The study also suggests the presence of a statistically significant difference between patients who died within 30 days and the highest number of CD68 cells per square micrometer in the vessel of the donor and recipient patient.

REFERENCES

- [1] S. Mangini, B.R. Alves, O.M. Silvestre, et al., Heart transplantation: review, Einstein (sao Paulo). 13 (2) (2015) 310–318, <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RW3154>.
- [2] A. Rassi, A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Chagas heart disease: Pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 (SUPPL. 1) (2009) 152–158, <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900021>.
- [3] M.V. Mogollón, E. Lage Gallé, R. Hinojosa Pérez, et al., Prognosis after heart transplant in patients with pulmonary hypertension secondary to cardiopathy, Transpl. Proc. 40 (9) (2008) 3031–3033, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.09.051>.
- [4] M. Humbert, G. Kovacs, M.M. Hoeper, et al., 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension, Eur. Heart J. 43 (38) (2022) 3618–3731, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac237>.
- [5] L.C. Price, S.J. Wort, F. Perros, et al., Inflammation in pulmonary arterial hypertension, Chest 141 (1) (2012) 210–221, <https://doi.org/10.1378/chest.11-0793>.
- [6] M. Jäattelä, Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor α /cachectin, Lab. Invest. 64 (6) (1991) 724–742.
- [7] Humbert M, Monti G, Brenot F, et al. *Increased Interleukin-1 and Interleukin-6 Serum Concentrations in Severe Primary Pulmonary Hypertension*. Vol 151.; 1995.
- [8] Y. Hu, L. Chi, W.M. Kuebler, N.M. Goldenberg, Perivascular inflammation in pulmonary arterial hypertension, Cells. 9 (11) (2020) 2338, <https://doi.org/10.3390/cells9112338>.
- [9] M. Rabinovitch, C. Guignabert, M. Humbert, M.R. Nicolls, Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension, Circ. Res. 115 (1) (2014) 165–175, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301141>.
- [10] Y.M. Kim, L. Haghighat, E. Spiekerkoetter, et al., Neutrophil elastase is produced by pulmonary artery smooth muscle cells and is linked to neointimal lesions, Am. J. Pathol. 179 (3) (2011) 1560–1572, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.051>.

- [11] S.H.E. Zaidi, X.M. You, S. Ciura, M. Husain, M. Rabinovitch, Overexpression of the serine elastase inhibitor elafin protects transgenic mice from hypoxic pulmonary hypertension, *Circulation* 105 (4) (2002) 516–521, <https://doi.org/10.1161/hc0402.102866>.
- [12] S. Prausmüller, G. Spinka, S. Stasek, et al., Neutrophil activation/maturation markers in chronic heart failure with reduced ejection fraction, *Diagnostics*. 12 (2) (2022) 444, <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020444>.
- [13] C.L. Holness, D.L. Simmons, Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins, *Blood* 81 (6) (1993) 1607–1613.
- [14] R. Savai, S.S. Pullamsetti, J. Kolbe, et al., Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186 (9) (2012) 897–908, <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0335OC>.
- [15] S.C. Pugliese, J.M. Poth, M.A. Fini, A. Olschewski, K.C. El Kasmi, K.R. Stenmark, The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes, *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 308 (3) (2015) L229–L252, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00238.2014>.
- [16] A. Zawia, N.D. Arnold, L. West, et al., Altered macrophage polarization induces experimental pulmonary hypertension and is observed in patients with pulmonary arterial hypertension, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 41 (1) (2021) 430–445, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314639>.
- [17] S. Wan, A. Marchant, J.M. DeSmet, et al., Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 111 (2) (1996) 469–477, [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(96\)70458-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(96)70458-0).
- [18] C. Tei, K.S. Dujardin, D.O. Hodge, et al., Doppler echocardiographic index for assessment of global right ventricular function, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 9 (6) (1996) 838–847, [https://doi.org/10.1016/S0894-7317\(96\)90476-9](https://doi.org/10.1016/S0894-7317(96)90476-9).
- [19] C.L. Gelape, M. do CP Nunes, R. Bráulio, et al., Pressão pulmonar aferida pela ecocardiografia em pacientes chagásicos indicados para transplante cardíaco TT - Pulmonary pressure by echocardiophy in chagasic patients on heart transplant waiting list, Published Online, *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* (2011).
- [20] S. Mangini, Agentes infecciosos e inflamação em miocárdio de pacientes com miocardiopatia dilatada, Universidade De São Paulo (2013), <https://doi.org/10.11606/T.5.2013.tde-14082013-162502>.

- [21] M. Berman, A. Ali, E. Ashley, et al., Is stress cardiomyopathy the underlying cause of ventricular dysfunction associated with brain death? *J. Heart Lung Transplant.* 29 (9) (2010) 957–965, <https://doi.org/10.1016/j.healun.2010.04.008>.
- [22] L. Adamo, C. Rocha-Resende, S.D. Prabhu, D.L. Mann, Reappraising the role of inflammation in heart failure, *Nat. Rev. Cardiol.* 17 (5) (2020) 269–285, <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0315-x>.
- [23] A.M. Marra, M. Arcopinto, A. Salzano, et al., Detectable interleukin-9 plasma levels are associated with impaired cardiopulmonary functional capacity and all-cause mortality in patients with chronic heart failure, *Int. J. Cardiol.* 209 (2016) 114–117, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.017>.
- [24] S. Van Linthout, C. Tschöpe, Inflammation – cause or consequence of heart failure or both? *Curr. Heart Fail. Rep.* 14 (4) (2017) 251–265, <https://doi.org/10.1007/s11897-017-0337-9>.
- [25] F.J. Carrillo-Salinas, N. Ngwenyama, M. Anastasiou, K. Kaur, P. Alcaide, Heart inflammation, *Am. J. Pathol.* 189 (8) (2019) 1482–1494, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.04.009>.
- [26] I. Vieira-Alves, A.R.P. Alves, N.M.V. Souza, et al., TNF/iNOS/NO pathway mediates host susceptibility to endothelial-dependent circulatory failure and death induced by betacoronavirus infection, *Clin. Sci.* 137 (7) (2023) 543–559, <https://doi.org/10.1042/CS20220663>.
- [27] N. Selimovic, C.H. Bergh, B. Andersson, E. Sakiniene, H. Carlsten, B. Rundqvist, Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension, *Eur. Respir. J.* 34 (3) (2009) 662–668, <https://doi.org/10.1183/09031936.00174908>.
- [28] A. Deswal, N.J. Petersen, A.M. Feldman, J.B. Young, B.G. White, D.L. Mann, Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure, *Circulation* 103 (16) (2001) 2055–2059, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.16.2055>.
- [29] E. Soon, A.M. Holmes, C.M. Treacy, et al., Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension, *Circulation* 122 (9) (2010) 920–927, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762>.
- [30] N.F. Voelkel, R.M. Tuder, J. Bridges, W.P. Arend, Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11 (6) (1994) 664–675, <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.11.6.7946395>.

[31] R.M. Tuder, B. Groves, D.B. Badesch, N.F. Voelkel, Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension, *Am. J. Pathol.* 144 (2) (1994) 275–285.

[32] E. Vergadi, M.S. Chang, C. Lee, et al., Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension, *Circulation* 123 (18) (2011) 1986–1995, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.978627>.

[33] T. Thenappan, A. Goel, G. Marsboom, et al., A central role for CD68(+) macrophages in hepatopulmonary syndrome, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183 (8) (2011) 1080–1091, <https://doi.org/10.1164/rccm.201008-1303OC>.

[34] W. Tian, X. Jiang, R. Tamosiuniene, et al., Blocking macrophage leukotriene B₄ prevents endothelial injury and reverses pulmonary hypertension, *Sci. Transl. Med.* 5 (200) (2013), <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006674>.

[35] J. Xu, J. Wang, C. Shao, et al., New dynamic viewing of mast cells in pulmonaryarterial hypertension (PAH): contributors or outsiders to cardiovascular remodeling, *J. Thorac. Dis.* 10 (5) (2018) 3016–3026, <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.05.59>.

[36] R.F.A. Pinto, Avaliação Imunohistoquímica Das Células Inflamatórias Presentes Na Parede de Artérias Pulmonares Periféricas de Pacientes Com Doença Vaso-Oclusiva Pulmonar Secundária a Defeitos Cardíacos Congênitos, Universidade De São Paulo (2004), <https://doi.org/10.11606/T.5.2004.tde-26102005-163503>.

[37] G. Baroldi, G. Di Pasquale, M.D. Silver, G. Pinelli, A.M. Lusa, V. Fineschi, Type and extent of myocardial injury related to brain damage and its significance in heart transplantation: a morphometric study, *J. Heart Lung Transplant* 16 (10) (1997) 994–1000.

[38] B. Shivalkar, J. Van Loon, W. Wieland, et al., Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function, *Circulation* 87 (1) (1993) 230–239, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.87.1.230>.

[39] F.K. Swirski, M. Nahrendorf, Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 18 (12) (2018) 733–744, <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0065-8>.

[40] C. Silvestre-Roig, Q. Braster, A. Ortega-Gomez, O. Soehnlein, Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation, *Nat. Rev. Cardiol.* 17 (6) (2020) 327–340, <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0326-7>.

[41] S.L. Maas, O. Soehnlein, J.R. Viola, Organ-specific mechanisms of transendothelial neutrophil migration in the lung, liver, kidney, and aorta, *Front. Immunol.* 9 (2018), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02739>.

6.2 Artigo 2

Situação: publicado no periódico Brazilian Journal of Transplantation, <https://doi.org/10.53855/bjt.v27i1.561> PORT.

TÍTULO

Avaliação de Biomarcadores Inflamatórios em Artérias Pulmonares de Transplantados Cardíacos Chagásicos e Não Chagásicos

Marcus Vinícius de Paula da Silva^{1,*} [<https://orcid.org/0000-0001-6943-3718>], Ildernandes Vieira Alves² [<https://orcid.org/0000-0001-8635-1642>], Antonielle Rodrigues Pereira Alves² [<https://orcid.org/0000-0002-5022-8156>], Virginia Soares Lemos² [<https://orcid.org/0000-0003-1234-9325>], Gabriel Assis Lopes do Carmo¹ [<https://orcid.org/0000-0002-3610-6507>], Fábio Morato de Castilho¹ [<https://orcid.org/0000-0002-0489-3737>], Cláudio Léo Gelape¹ [<https://orcid.org/0000-0002-8287-0733>]

¹ Universidade Federal de Minas Gerais [<https://ror.org/0176yjwt32>] – Faculdade de Medicina – Departamento de Cirurgia Cardiovascular – Belo Horizonte (MG) – Brasil.

² Universidade Federal de Minas Gerais [<https://ror.org/0176yjwt32>] – Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Fisiologia e Biofísica – Belo Horizonte (MG) – Brasil.

*Autor correspondente: marcus@cardiol.br

Editora de Seção: Ilka de Fátima Santana F. Boin [<https://orcid.org/0000-0002-1165-2149>]

Recebido: Jan 26 2024 Aceito: Jun 11 2024

RESUMO

No Brasil, a miocardiopatia chagásica constitui a terceira causa mais comum de indicação para transplante cardíaco (TxC). A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma condição grave frequentemente presente em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) terminal que piora o prognóstico daqueles submetidos a TxC. O mecanismo etiológico da HAP é multifatorial, sendo o aumento da pressão de enchimento ventricular um dos principais. Recentemente, entretanto, vários trabalhos procuraram demonstrar o papel do processo inflamatório local, contribuindo para o enrijecimento das artérias pulmonares e o surgimento

ou piora da HAP no cenário da IC. **Objetivos:** Avaliar o processo inflamatório nas artérias pulmonares de transplantados cardíacos chagásicos (Tx-C) e não chagásicos (Tx-NC), com e sem HAP, por meio da concentração tecidual das citocinas inflamatórias obtidas no momento do Tx. **Métodos:** Os níveis das interleucinas (IL)-6, IL-1 β , e do fator de necrose tumoral alfa [*tumor necrosis factor alpha*] (TNF- α) e de neutrófilos CD68 e CD66b foram aferidos em fragmentos das artérias pulmonares de pacientes Tx-C e Tx-NC com e sem HAP. **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre os níveis dos biomarcadores inflamatórios aferidos nas artérias pulmonares dos Tx-C e Tx-NC com ou sem HAP. **Conclusão:** Observamos que os pacientes Tx-C e Tx-NC com ou sem HAP apresentam níveis semelhantes de marcadores inflamatórios expressos no tecido das artérias pulmonares. Tal fato sugere que a HAP dos pacientes Tx-C e Tx-NC é um processo que se relaciona com a própria IC e pode não ter relação com o perfil inflamatório dos pacientes.

Palavras-chave: Transplante Cardíaco; Hipertensão Arterial Pulmonar; Biomarcadores Inflamatórios.

Evaluación de Biomarcadores Inflamatorios en Arterias Pulmonares de Receptores de Trasplante Cardíaco Chagásico y no Chagásico

RESUMEN

En Brasil, la miocardiopatía de Chagas es la tercera causa más común de indicación de trasplante de corazón (Tx). La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una afección grave frecuentemente presente en pacientes con insuficiencia cardíaca terminal que empeora el pronóstico de los pacientes sometidos a Tx. El mecanismo etiológico de la HAP es multifactorial, siendo el aumento de la presión de llenado ventricular uno de los principales. Sin embargo, recientemente, varios estudios han tratado de demostrar el papel del proceso inflamatorio local al contribuir al endurecimiento de las arterias pulmonares y la aparición o empeoramiento de la HAP en el contexto de insuficiencia cardíaca (IC). **Objetivos:** Evaluar el proceso inflamatorio en las arterias pulmonares de pacientes chagásicos Tx (Tx-C) y no chagásicos (Tx-NC), con y sin HAP, a través de la concentración tisular de citocinas inflamatorias obtenidas en el momento del Tx. **Métodos:** Se midieron los niveles de

interleucinas (IL)-6, IL-1 β y TNF- α y de neutrófilos CD68 y CD66b en fragmentos de arterias pulmonares de pacientes TxC-C y TxC-NC con y sin HAP. **Resultados:** No hubo diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre los niveles de biomarcadores inflamatorios medidos en las arterias pulmonares de TxC-C y TxC-NC, con o sin HAP. **Conclusión:** Observamos que los pacientes TxC-C y TxC-NC, tengan o no HAP, presentan los mismos niveles de marcadores inflamatorios expresados en el tejido de la arteria pulmonar. Este hecho sugiere que la HAP en pacientes TxC-C y TxC-NC es un proceso relacionado con la IC en sí y no con el perfil inflamatorio de los pacientes.

Palabras clave: Trasplante de Corazón. Hipertensión Arterial Pulmonar. Biomarcadores Inflamatorios.

Assessment of Inflammatory Biomarkers in Pulmonary Arteries of Chagasic and Non-Chagasic Heart Transplant Recipients

SUMMARY

In Brazil, Chagas cardiomyopathy is the third most common cause of indication for heart transplantation (TxC). Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a serious condition frequently present in patients with terminal heart failure that worsens the prognosis of patients undergoing TxC. The etiological mechanism of PAH is multifactorial, with increased ventricular filling pressure being one of the main ones. Recently, however, several studies have sought to demonstrate the role of the local inflammatory process in contributing to the stiffening of the pulmonary arteries and the emergence or worsening of PAH in the setting of heart failure (HF). **Objectives:** To evaluate the inflammatory process in the pulmonary arteries of chagasic TxC (TxC-C) and non-chagasic (TxC-NC) patients, with and without PAH, through the tissue concentration of inflammatory cytokines obtained at the time of TxC. **Methods:** The levels of interleukins (IL)-6, IL-1 β , and TNF- α and of CD68 and CD66b neutrophils were measured in fragments of the pulmonary arteries of TxC-C and TxC-NC patients with and without PAH. **Results:** There was no statistically significant difference ($p \geq 0.05$) between the levels of inflammatory biomarkers measured in the pulmonary arteries of TxC-C and TxC-NC, with or without PAH. **Conclusion:** We observed that TxC-C and TxC-NC patients, whether or not they have PAH, present the same levels of inflammatory markers expressed in the pulmonary artery tissue. This fact suggests that PAH in TxC-C and TxC-NC

patients is a process that is related to HF itself and is not related to the patients' inflammatory profile.

Keywords: Heart Transplant; Pulmonary Arterial Hypertension; Inflammatory Biomarkers.

INTRODUÇÃO

O transplante cardíaco (TxC) é uma excelente opção terapêutica para pacientes com insuficiência cardíaca (IC) avançada e refratária ao tratamento clínico, de acordo com diretrizes nacionais e internacionais¹. A IC é uma doença progressiva que afeta milhões de pessoas. Aproximadamente 10% dos pacientes com IC têm a forma avançada da doença ou estágio D, a qual está associada com alta mortalidade e qualidade de vida muito ruim^{1,2}. Há consenso de que o TxC, com critérios apropriados de seleção, aumenta a sobrevida e a qualidade de vida, a capacidade ao exercício e proporciona retorno mais rápido ao trabalho quando comparado ao tratamento convencional^{1,2}.

O Brasil tem ocupado cada vez mais destaque no campo dos transplantes, principalmente na América Latina³. No registro de 2019 da International Society for Heart & Lung Transplantation (ISHLT) sobre dados de receptores de TxC, os diagnósticos mais frequentes da causa da IC foram cardiomiopatia não isquêmica (50,8% dos casos), cardiomiopatia isquêmica (32,4%), cardiomiopatia restritiva (3,5%), cardiomiopatia hipertrófica (3,4%), doença cardíaca congênita (3,1%), retransplante (2,8%), cardiomiopatia valvular (2,5%) e outros (1,5%)⁴.

Atualmente, o estado de Minas Gerais é o segundo com maior número de TxC realizados no país⁵, sendo a doença de Chagas (DCH) responsável por 50% dos casos⁶. A DCH é responsável pelo processo inflamatório crônico e persistente do miocárdio que leva à destruição de cardiomiócitos, associada a arritmias e eventos embólicos, as principais causas de morte⁷.

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) está frequentemente associada à IC devido ao aumento das pressões de enchimento do ventrículo esquerdo⁸. Essa condição piora o resultado do TxC e pode ser contraindicação se muito elevada e fixa⁸.

A HAP é definida como condição em que a pressão média da artéria pulmonar é superior a 20 mmHg⁹. Recentemente, demonstrou-se que a inflamação local em nível tecidual pode ser um aspecto importante na etiologia da HAP e que células T, B,

mastócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas participam desse processo¹⁰. Parece haver um insulto inicial do endotélio que leva à propagação de um processo inflamatório com a produção de citocinas, culminando em remodelamento vascular¹⁰.

Portanto, entender a etiologia e o mecanismo da HAP nos pacientes candidatos a TxC e a contribuição do processo inflamatório local para essa condição podem abrir campo de pesquisa novo e promissor, com objetivo de melhorar o status clínico dos pacientes para o TxC e, além disso, aumentar o número de candidatos ao procedimento.

As citocinas interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa [*tumor necrosis factor alpha*] (TNF- α) são produzidas por monócitos/macrófagos, células endoteliais e muitos outros tipos de células, e têm ação pró-inflamatória^{11,12}. Essas citocinas podem ser particularmente relevantes para a patogênese da HAP¹³. O grupamento de diferenciação 66b (CD66b) e 68 (CD68), respectivamente marcadores de neutrófilos e macrófagos, são relatados em pacientes com HAP^{14,15}.

Este estudo traz contribuições para a elucidação de mecanismos fisiopatológicos envolvidos na HAP associada a TxC.

Objetivos

Avaliar a contribuição do processo inflamatório local para a etiologia da HAP de pacientes chagásicos e não chagásicos candidatos e submetidos a TxC.

MÉTODOS

Foram incluídos 29 pacientes submetidos a TxC no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM) e no Hospital Santa Casa de Belo Horizonte no período de janeiro de 2021 a fevereiro de 2023. O dimensionamento amostral do estudo foi feito com amostra de conveniência. Não foi possível coletar fragmentos de artérias pulmonares de todos os pacientes submetidos a TxC nesses centros de referência no período do estudo. Os principais fatores que interferiram na não realização dos experimentos foram a não coleta específica da artéria pulmonar, quantidade insuficiente de tecido arterial pulmonar para os experimentos e ressecção de tecido adiposo desprovido do próprio vaso.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, CAAE: 39274420.0.0000.5149, da UFGM. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Trata-se de um estudo transversal comparativo de grupos paralelos.

Os dados clínicos da amostra do estudo foram coletados por meio de análise de prontuários acessados nos bancos de dados dos hospitais participantes.

Critérios de inclusão

Foram incluídos os receptores que concordaram em assinar o TCLE, pacientes de ambos os sexos, com 18 anos ou mais e com cardiomiopatia terminal submetidos a TxC.

Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com câncer, demência, processo inflamatório clinicamente diagnosticável, diabetes mellitus tipo I, história de cirurgia ou trauma nas últimas 4 semanas, gestantes, doença autoimune, sabidamente com o vírus da imunodeficiência humana, hepatite C, hepatite B e aqueles que não concordaram em assinar o TCLE.

A HAP foi aferida por manometria pulmonar durante o cateterismo cardíaco direito e pela ecocardiografia realizada no pré-operatório. Pelo ecocardiograma, definiu-se pressão sistólica da artéria pulmonar (PSAP) elevada quando superior a 35 mmHg¹⁶.

Foram coletados fragmentos da artéria pulmonar dos receptores durante a cardiectomia e acondicionados em frascos com ringer lactato.

A artéria pulmonar foi isolada e o tecido perivascular circundante foi removido. Em seguida, esses segmentos foram incluídos em meio de congelamento Tissue-Tek[®] OCT[™] (Sakura[®], EUA) e cortes transversais (10 μ m) das artérias foram obtidos usando um criostato. As lâminas foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 15 min antes da imunofluorescência ser realizada. Realizaram-se as contagens de CD68 e de neutrófilos CD66b pela técnica de imunofluorescência. O software Fiji (versão 1.51j8) foi utilizado para quantificar as células positivas para marcação de interesse e núcleo. O resultado foi expresso como número de células positivas por μ m² de tecido.

A quantificação das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 foi feita em fragmentos de artéria pulmonar. A técnica de ensaio immunosorbent [*enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)] foi utilizada para quantificação da concentração de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , conforme indicado nas instruções dos kits comerciais (R&D

Systems). Os resultados foram apresentados como picograma (pg) de proteína por mililitro de tecido (pg/mL).

Neste estudo, foram apresentadas as medidas descritivas mediana (Q_2), quartis (Q_1 e Q_3), média e desvio-padrão (DP) para descrever, respectivamente, as variáveis do tipo quantitativo de distribuição não normal e normal, e frequências absoluta (n) e relativa (%) como estatísticas para descrever os resultados das variáveis do tipo categórico. Comparação da distribuição entre as medidas (mediana, Q_1 e Q_3) da variável foram efetuadas pelos testes Mann-Whitney. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Foram coletadas amostras de 29 pacientes submetidos a TxC, sendo 19 chagásicos. A Tabela 1 demonstra as características da população estudada. A idade dos pacientes foi de $54,9 \pm 9,1$ anos, sendo 13 do sexo feminino. O índice de massa corporal (IMC) foi de $23,1 \pm 4,7$.

Dezenove pacientes (65,5%) tinham cardiomiopatia chagásica, quatro cardiomiopatia não isquêmica, três cardiomiopatia isquêmica (10,4%), um (3,4%) cardiopatia congênita e dois tinham outras etiologias (6,9%).

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes receptores (transplantados cardíacos).

Parâmetros	Receptor (n = 29)
Idade (anos) ^a	$54,9 \pm 9,1$
Sexo (feminino/masculino)	13/16
IMC ^a	$23,1 \pm 4,7$

Source: Elaborated by the authors.

a = dados expressos em média $\pm$ DP.

Avaliaram-se características clínicas, expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 e contagem de macrófagos CD68 e neutrófilos CD66b no tecido das artérias pulmonares de pacientes transplantados cardíacos chagásicos (TxC-C) e não chagásicos (TxC-NC) (Tabela 2).

Tabela 2. Análises descritivas e comparativas entre os receptores TxC-C e TxC-NC quanto às variáveis clínicas, ecocardiográficas, manométricas, número de células por micrômetro quadrado e concentração de citocinas (pg/mL).

Variáveis	Chagásicos (n = 19)	Não chagásicos (n = 10)	p	r
Idade (em anos)	58,0 (51,0-61,0)	55,0 (41,5-59,5)	0,370	0,17
IMC	21,4 (18,7-24,2)	23,9 (20,9-30,4)	0,099	0,31
PSAPeco (mmHg)	41,0 (33,0-47,0)	40,0 (26,8-47,3)	0,890	0,03
TP média (mmHg)	25,3 (19,3-35,0)	31,0 (20,9-49,3)	0,383	0,16
RVP (W)	3,24 (1,96-5,36)	3,70 (2,57-7,75)	0,582	0,10
IND RVP (W)	5,12 (3,95-9,84)	6,39 (4,72-12,53)	0,359	0,17
RVS (W)	22,96 (19,67-26,17)	22,51 (19,32-28,83)	0,854	0,03
IND RVS (W)	38,02 (34,70-42,46)	38,78 (31,61-48,02)	0,854	0,03
GTP (mmHg)	10,0 (6,0-16,0)	13,5 (6,8-21,3)	0,301	0,20
RVP (NPS) (W)	2,74 (2,47-3,46)	1,77 (0,94-3,05)	0,178	0,33

CD66b	0,000130 0,000172)	(0,000047- 0,000234)	0,000161(0,000061- 0,000234)	0,484	0,15
CD68	0,00001202 0,00002136)	(0,00000811- 0,00002204)	0,00001854 (0,00000196- 0,00002204)	0,751	0,07
IL-6	393,6 (344,3-630,3)		378,7 (335,0-470,8)	0,624	0,10
IL-1 β	152,2 (124,9-334,1)		168,5 (94,9-508,4)	1,000	0,00
TNF- α	1.100,0 (657,5-1.777,5)		770,0 (277,5-1.210,0)	0,280	0,24

Source: Elaborated by the authors.

Base de dados: 29 pacientes, no geral (sim 19 casos e não 10 casos).

Dados expressos em mediana (Q1-Q3).

Dados aferidos por ecocardiograma: PSAPeco (PSAP).

Dados aferidos por cateterismo cardíaco direito: TP media [pressão média no tronco pulmonar (artéria pulmonar)]; RVP; IND RVP (índice de RVP); RVS (resistência vascular sistêmica); IND RVS (índice de RVS); GTP (gradiente de pressão transpulmonar); RVP (NPS) (resistência pulmonar após o nitroprussiato de sódio).

p = probabilidade de significância do teste de Mann-Whitney (z – estatística do teste); r = tamanho de efeito para teste não paramétrico; W = Wood.

Os dados da Tabela 2 demonstram que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os TxC-C e TxC-NC no que diz respeito às variáveis fisiológicas (idade e IMC), ecocardiográficas, manométricas e aquelas referentes aos marcadores inflamatórios.

A Tabela 3 demonstra dados de parâmetros inflamatórios comparativos entre os TxC em relação à medida da HAP < 20 mmhg ou ≥ 20 mmhg.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as interleucinas quando comparado o grupo com HAP e os pacientes sem HAP.

Tabela 3. Análises descritivas e comparativas entre os TxC com TP média ≥ 20 ou TP média < 20 quanto às variáveis número de células por micrômetro quadrado e concentração de citocinas e TxC-C quanto às variáveis número de células por micrômetro quadrado.

Variáveis	TP média < 20 – TxC (n = 5)	TP média ≥ 20 – TxC (n = 18)	p	r
CD66b	0,000140 (0,000061-0,000267)	0,000139 (0,000061-0,000174)	0,804	0,05
CD68	0,00002136 (0,00000502– 0,00002295)	0,00001270 (0,00000785– 0,00001940)	0,611	0,11
IL-6	333,7 (241,2-393,2)	385,7 (347,4-630,3)	0,063	0,38
IL-1 β	138,0 (36,5-438,6)	160,9 (118,4-368,8)	0,371	0,19
TNF- α	800,0 (0,0-0,0)	970,0 (490,0-1.530,0)	-	-
Variáveis	TP média < 20 – TxC-C	TP média ≥ 20 – TxC-C		
CD66b	0,000111(0,000051-0,000265)	0,000130 (0,000047-0,000172)	0,896	0,03
CD68	0,00001480 (0,00000341- 0,00002323)	0,00001202 (0,00000811- 0,00001858)	1	0

Source: Elaborated by the authors.

Base de dados: 29 pacientes, no geral.

Dados expressos em mediana (Q1-Q3).

Dados aferidos por cateterismo cardíaco direito: TP media.

A diferença entre o total de pacientes pesquisados e o total de pacientes apresentados na tabela (n) refere-se ao número de casos sem informação.

p = probabilidade de significância do teste de Mann-Whitney (z – estatística do teste); r = tamanho de efeito para teste não paramétrico.

DISCUSSÃO

Foram realizadas, de forma precursora, a análise quantitativa das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 e a contagem de macrófagos CD68 e de neutrófilos CD66b no tecido de artérias pulmonares de TxC. Acredita-se que a dosagem de tais biomarcadores inflamatórios no tecido da artéria pulmonar reflita melhor o processo inflamatório no vaso do que a análise feita no plasma dos pacientes cirúrgicos que sabidamente encontram-se muito elevadas¹⁷.

A HAP é uma condição associada à IC terminal que representa desafio adicional no cuidado dos pacientes TxC². A fisiopatologia da HAP no cenário da IC pode ser explicada por diferentes mecanismos, mas ainda há poucas pesquisas sobre o real efeito do processo inflamatório local no desenvolvimento desse grave problema.

Lesões vasculares pulmonares que ocorrem em pacientes com HAP, bem como em modelos animais de hipertensão pulmonar, são caracterizadas por graus variados de infiltrados inflamatórios perivasculares, compreendendo linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas e mastócitos¹⁸. Além do aumento de células imunes perivasculares e da infiltração intravascular, os níveis circulantes de certas citocinas estão anormalmente elevados na HAP, incluindo as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α ¹⁸. O aumento da pressão pulmonar é um dos mais importantes preditores de morte após TxC¹⁹, determinando a importância da análise da pressão arterial pulmonar e sua reatividade pulmonar no pré-transplante¹⁹.

Sabe-se que a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que apresenta associação significativa com a mortalidade em pacientes com HAP²⁰. Achados semelhantes foram relatados em pacientes com IC congestiva²¹, sugerindo que a IL-6 tem papel na fisiopatologia da IC e HAP²¹. A IL-1 β é bem reconhecida como clinicamente relevante em pacientes com hipertensão²². Devido ao seu papel essencial na inflamação, a forma como a IL-1 β influencia as alterações relacionadas à patologia vascular na hipertensão ganhou muito interesse e está sendo explorada atualmente²³. Por exemplo, relatórios recentes sugerem que a IL-1 β não apenas participa da resposta pró-inflamatória nos vasos, mas também influencia o fenótipo e as funções das células musculares lisas vasculares e a remodelação vascular em vários tipos de hipertensão por meio de inflamação²⁴.

O TNF- α é considerado uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes²⁵, desempenhando um papel direto na adesão de células inflamatórias circulantes nos tecidos²⁶. Estudos mostraram que o TNF- α foi notavelmente maior na HAP²⁷, porém tal fato não foi corroborado em nosso estudo.

Pesquisas recentes avaliaram o papel dos macrófagos perivasculares que infiltram as arteríolas pulmonares na HAP¹⁸. Os macrófagos CD68 são proeminentes em lesões plexiformes obliterantes avançadas observadas em estudos experimentais e clínicos de HAP^{28,29} e a depleção ou inativação de macrófagos previne a HAP em vários modelos de estudos experimentais^{30,31}. Os macrófagos do tipo M1 amplificam a inflamação, secretando fatores pró-inflamatórios, enquanto os macrófagos do tipo M2 promovem a inflamação e o reparo tecidual, desempenhando papel importante na remodelação vascular pulmonar³².

Com relação aos neutrófilos, trata-se do tipo mais abundante de glóbulos brancos na circulação humana³³. Em contraste com monócitos e macrófagos, são tradicionalmente considerados espectadores de doenças cardiovasculares, mas estudos nos últimos anos demonstraram importantes papéis funcionais dos neutrófilos na inflamação e reparo cardiovascular^{34,35}. O CD66b é um marcador de ativação de neutrófilo³⁶.

Os resultados desta pesquisa demonstraram que a mediana da pressão média aferida no tronco da artéria pulmonar pela manometria foi de 25,3 (19,3-35,0) nos pacientes chagásicos e 31,0 (20,9-49,3) nos pacientes não chagásicos. Na comparação entre os diversos parâmetros de pressão aferidos pelo cateterismo cardíaco direito e ecocardiografia, não houve diferença significativa entre seus níveis e o fato de os pacientes serem TxC-C e TxC-NC (Tabela 2). Gelape et al.⁸ encontraram menores níveis de resistência vascular pulmonar (RVP) por parâmetros hemodinâmicos nos pacientes com cardiomiopatia chagásica, fato não identificado neste estudo.

Os TxC aqui estudados tiveram níveis aumentados das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6, independentemente de a etiologia ser chagásica ou não (Tabela 2), sugerindo a participação desses marcadores inflamatórios no processo fisiopatológico da IC. Esse dado sugere que a etiologia da cardiomiopatia não influencia os níveis diferentes de citocinas inflamatórias.

Além disso, não encontramos diferenças significativas nos níveis teciduais de IL-1 β , TNF- α , IL-6, CD66b e CD68 na comparação entre pacientes TxC com e sem HAP (Tabela 3). Observou-se, também, que TxC-C com e sem HAP apresentaram o mesmo número de células inflamatórias CD66b e CD68 no tecido. Esses dados sugerem que o mecanismo fisiopatológico da HAP está mais relacionado à própria IC do que à resposta inflamatória.

O paciente com IC avançada frequentemente desenvolve aumento da pressão pulmonar por mecanismo retrógrado³⁷. A disfunção ventricular esquerda causa aumento da pressão diastólica final que é transmitida ao leito vascular pulmonar, aumentando a pressão venosa³⁷. Ocorrem, com o passar do tempo, vasoconstrição vascular e, subsequentemente, reestruturação patológica com aumento da proliferação celular e hipertrofia associada à fibrose intimal⁸. Até um terço dos pacientes desenvolve HAP⁸.

Sabe-se que a IC crônica ativa o sistema imunológico e as respostas inflamatórias caracterizadas por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias circulantes^{38,39}. A inflamação e as células imunológicas participam tanto da lesão aguda dos miócitos quanto da IC crônica⁴⁰. Fatores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão aumentados em pacientes com IC⁴⁰. Modelos de miocardite e sobrecarga de pressão em pequenos animais sugerem uma ativação imunológica durante a IC⁴¹. Tais argumentos podem justificar os níveis dos marcadores inflamatórios serem semelhantes nos receptores do TxC apesar do diagnóstico de HAP.

CONCLUSÃO

Observamos que os TxC-C e os TxC-NC, com ou sem HAP, apresentaram níveis semelhantes de marcadores inflamatórios expressos nas artérias pulmonares, o que sugere que o mecanismo da HAP está mais associado à IC propriamente dita do que à resposta inflamatória secundária à miocardiopatia associada. Neste estudo, a miocardiopatia chagásica, mesmo sendo uma doença com substrato inflamatório local bastante evidente e comprovado, não apresenta maiores níveis de HAP e inflamação local quando comparada a outras etiologias de IC.

Assessment of Inflammatory Biomarkers in Pulmonary Arteries of Chagasic and Non-Chagasic Heart Transplant Recipients ABSTRACT

In Brazil, Chagas cardiomyopathy is the third most common cause of indication for heart transplantation (HTx). Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe condition frequently present in patients with terminal heart failure that worsens the prognosis of patients undergoing HTx. The etiological mechanism of PAH is multifactorial, with increased ventricular filling pressure being one of the main ones. Recently, however, several studies have sought to demonstrate the role of the local inflammatory process in contributing to the stiffening of the pulmonary arteries and the emergence or worsening of PAH in the heart failure (HF) setting. **Objectives:** To evaluate the inflammatory process in the pulmonary

arteries of chagasic HTx (HTx-C) and non-chagasic (HTx-NC) patients, with and without PAH, through the tissue concentration of inflammatory cytokines obtained at the time of HTx. **Methods:** The levels of interleukins (IL)-6, IL-1 β , TNF- α , and CD68 and CD66b neutrophils were measured in fragments of the pulmonary arteries of HTx-C and HTx-NC patients with and without PAH. **Results:** No statistically significant difference ($p \geq 0.05$) between the inflammatory biomarkers measured in HTx-C and HTx-NC pulmonary arteries, with or without PAH. **Conclusion:** We observed that HTx-C and HTx-NC patients present the same levels of inflammatory markers expressed in the pulmonary artery tissue, whether or not they have PAH. This fact suggests that PAH in HTx-C and HTx-NC patients is a process that is related to HF itself and not to the patients' inflammatory profile.

Descriptors: Heart Transplant; Pulmonary Arterial Hypertension; Inflammatory Biomarkers.

INTRODUCTION

Heart transplantation (HTx) is an excellent therapeutic option for patients with advanced heart failure (HF) refractory to clinical treatment, according to national and international guidelines¹. HF is a progressive disease that affects millions of people. Approximately 10% of patients with HF have the advanced form of the disease or stage D, which is associated with high mortality and inferior quality of life^{1,2}. There is consensus that HTx, with appropriate selection criteria, increases survival quality of life and exercise capacity and provides a faster return to work compared to conventional treatment^{1,2}.

Brazil has become increasingly prominent in transplants, especially in Latin America³. In the 2019 International Society for Heart & Lung Transplantation (ISHLT) registry of HTx recipient data, the most frequent diagnoses of the cause of HF were non-ischemic cardiomyopathy (50.8% of cases), ischemic cardiomyopathy (32.4%), restrictive cardiomyopathy (3.5%), hypertrophic cardiomyopathy (3.4%), congenital heart disease (3.1%), retransplantation (2.8%), valvular cardiomyopathy (2.5%) and others (1.5%)⁴.

Currently, the state of Minas Gerais is the second with the highest number of HTx performed in the country⁵, with Chagas disease (CHD) responsible for 50% of cases⁶. CHD is responsible for the chronic and persistent inflammatory process of the

myocardium that leads to the destruction of cardiomyocytes, associated with arrhythmias and embolic events, the leading causes of death⁷.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is often associated with HF due to increased left ventricular filling pressures⁸. This condition worsens the HTx result and may be a contraindication if very high and fixed⁸.

PAH is defined as a condition with a mean pulmonary artery pressure greater than 20 mmHg⁹. Recently, it was demonstrated that local inflammation at the tissue level may be a critical aspect in the etiology of PAH and that T cells, B cells, mast cells, macrophages, neutrophils and dendritic cells participate in this process¹⁰. There appears to be an initial insult to the endothelium that leads to the propagation of an inflammatory process with the production of cytokines, culminating in vascular remodeling¹⁰.

Therefore, understanding the etiology and mechanism of PAH in candidate patients for HTx and the contribution of the local inflammatory process to this condition can open up a new and promising field of research. The aim is to improve the clinical status of patients for HTx and, furthermore, increase the number of candidates for the procedure.

The cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) are produced by monocytes/macrophages, endothelial cells and many other types of cells and have pro-inflammatory action^{11,12}. These cytokines may be particularly relevant to the pathogenesis of PAH¹³. Cluster of differentiation 66b (CD66b) and 68 (CD68), respectively, markers of neutrophils and macrophages, are reported in patients with PAH^{14,15}.

This study contributes to elucidating pathophysiological mechanisms involved in PAH associated with HTx.

Objectives

To evaluate the contribution of the local inflammatory process to the etiology of PAH in chagasic and non-chagasic patients who are candidates and undergo HTx.

METHODS

29 patients undergoing HTx were included at the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais (HC-UFG) and the Hospital Santa Casa de Belo Horizonte from January 2021 to February 2023. The study's sample size was carried out with a sample of convenience. It was impossible to collect pulmonary artery fragments from all patients undergoing HTx in these reference centers during the study period. The main factors that interfered with the experiments not being carried out were not specifically collecting the

pulmonary artery, insufficient quantity of pulmonary arterial tissue for the experiments and resection of adipose tissue devoid of the vessel itself.

This study was approved by the UFMG Research Ethics Committee, CAAE: 39274420.0.0000.5149. All patients signed the free and informed consent form (ICF). It is a comparative cross-sectional study of parallel groups.

The clinical data of the study sample were collected through analysis of medical records accessed in the databases of the participating hospitals.

Inclusion criteria

Recipients who agreed to sign the informed consent form, patients of both sexes, aged 18 or over and with terminal cardiomyopathy undergoing HTx were included.

Exclusion criteria

Exclusion criteria covered patients with cancer, dementia, clinically diagnosable inflammatory process, type I diabetes mellitus, history of surgery or trauma in the last 4 weeks, pregnant women, autoimmune disease, known to have the human immunodeficiency virus, hepatitis C, hepatitis B and those who did not agree to sign the ICF.

PAH was measured by pulmonary manometry during right heart catheterization and by echocardiography performed preoperatively. The echocardiogram defined elevated pulmonary artery systolic pressure (PASP) as higher than 35 mmHg¹⁶.

Pulmonary artery fragments were collected from recipients during cardiectomy and placed in vials with the lactated ringer.

The pulmonary artery was isolated, and the surrounding perivascular tissue was removed. Then, these segments were embedded in Tissue-Tek® OCT™ freezing medium (Sakura®, USA), and cross sections (10 µm) of the arteries were obtained using a cryostat. Slides were fixed in 4% paraformaldehyde solution for 15 minutes before immunofluorescence. CD68 and CD66b neutrophil counts were performed using the immunofluorescence technique. Fiji software (version 1.51j8) was used to quantify positive cells for labeling of interest and nucleus. The result was expressed as the number of positive cells per µm² of tissue.

The inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 were quantified in pulmonary artery fragments. The immunosorbent assay technique [enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)] was used to quantify the concentration of TNF- α , IL-6 and IL-1 β , as indicated in the instructions of the commercial kits (R&D Systems). Results were presented as picograms (pg) of protein per milliliter of tissue (pg/mL).

In this study, the descriptive measures median (Q_2), quartiles (Q_1 and Q_3), mean, and standard deviation (SD) were presented to describe, respectively, the variables of the quantitative type of non-normal and normal distribution and absolute frequencies (n) and relative (%) as statistics to describe the results of categorical variables. Comparison of the distribution between the variable's measurements (median, Q_1 and Q_3) was carried out using the Mann-Whitney tests. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Samples were collected from 29 patients undergoing HTx, 19 of whom were chagasic patients. Table 1 demonstrates the characteristics of the studied population. The patients' age was 54.9 ± 9.1 years, 13 of whom were female. Their body mass index (BMI) was 23.1 ± 4.7 .

Nineteen patients (65.5%) had chagasic cardiomyopathy; four had non-ischemic cardiomyopathy; three had ischemic cardiomyopathy (10.4%); one (3.4%) had congenital heart disease, and two had other etiologies (6.9%).

Table 1. Clinical characteristics of recipient patients (heart transplant recipients).

Parameters	Recipient (n = 29)
Age (years) ^a	54,9 $\pm$ 9,1
Gender (female/male)	13/16
BMI ^a	23,1 $\pm$ 4,7

Source: Elaborated by the authors.

a = data expressed as mean $\pm$ SD.

Clinical characteristics, expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 and counts of CD68 macrophages and CD66b neutrophils were evaluated in the pulmonary artery tissue of chagasic (HTx-C) and non-chagasic (HTx) heart transplant patients. -NC) (Table 2).

Table 2. Descriptive and comparative analyses between HTx-C and HTx-NC recipients regarding clinical, echocardiographic, and manometric variables, number of cells per square micrometer and cytokine concentration (pg/mL).

Variables	Chagasics (n = 19)	Non-Chagasic (n = 10)	p	r
Age (years)	58,0 (51,0-61,0)	55,0 (41,5-59,5)	0,370	0,17
BMI	21,4 (18,7-24,2)	23,9 (20,9-30,4)	0,099	0,31
PSAPeco (mmHg)	41,0 (33,0-47,0)	40,0 (26,8-47,3)	0,890	0,03
PT média (mmHg)	25,3 (19,3-35,0)	31,0 (20,9-49,3)	0,383	0,16
PVR (W)	3,24 (1,96-5,36)	3,70 (2,57-7,75)	0,582	0,10
IND PVR (W)	5,12 (3,95-9,84)	6,39 (4,72-12,53)	0,359	0,17
SVR(W)	22,96 (19,67-26,17)	22,51 (19,32-28,83)	0,854	0,03
IND SVR (W)	38,02 (34,70-42,46)	38,78 (31,61-48,02)	0,854	0,03
TPG (mmHg)	10,0 (6,0-16,0)	13,5 (6,8-21,3)	0,301	0,20
VPS (SNP) (W)	2,74 (2,47-3,46)	1,77 (0,94-3,05)	0,178	0,33
CD66b	0,000130 (0,000047-0,000172)	0,000161(0,000061-0,000234)	0,484	0,15
CD68	0,00001202 (0,00000811-0,00002136)	0,00001854 (0,00000196-0,00002204)	0,751	0,07
IL-6	393,6 (344,3-630,3)	378,7 (335,0-470,8)	0,624	0,10
IL-1 β	152,2 (124,9-334,1)	168,5 (94,9-508,4)	1,000	0,00
TNF- α	1.100,0 (657,5-1.777,5)	770,0 (277,5-1.210,0)	0,280	0,24

Source: Elaborated by the authors.

Database: 29 patients overall (yes, 19 cases and no, 10 cases).

Data expressed as median (Q1-Q3).

Data measured by echocardiogram: PSAPeco (PSAP).

Data measured by right heart catheterization: PT mean [mean pressure in the pulmonary trunk (pulmonary artery)]; PVR; IND PVR (PVR index); SVR (systemic vascular resistance); IND SVR (SVR index); TPG (transpulmonary pressure gradient); PVR (SNP) (pulmonary resistance after sodium nitroprusside).

p = probability of significance from the Mann-Whitney test (z-test statistic); r = effect size for the non-parametric test; W =Wood.

The data in Table 2 demonstrate that there was no significant difference ($p \geq 0.05$) between HTx-C and HTx-NC concerning physiological variables (age and BMI), echocardiographic, manometric and those referring to inflammatory markers.

Table 3 shows data on comparative inflammatory parameters between HTx concerning PAH measurement < 20 mmHg or ≥ 20 mmHg.

There was no statistically significant difference between interleukins when comparing the group with PAH and patients without PAH.

Table 3. Descriptive and comparative analyses between HTx with mean PT ≥ 20 or mean PT < 20 regarding the number of cells per square micrometer and concentration of cytokines and HTx-C regarding the number of cells per square micrometer.

Variables	PT mean < 20 – HTx (n = 5)	PT mean ≥ 20 – HTx (n = 18)	p	r
CD66b	0,000140 (0,000061-0,0000267)	0,000139 (0,000061-0,000174)	0,804	0,05
CD68	0,00002136 (0,00000502– 0,00002295)	0,00001270 (0,00000785– 0,00001940)	0,611	0,11
IL-6	333,7 (241,2-393,2)	385,7 (347,4-630,3)	0,063	0,38
IL-1 β	138,0 (36,5-438,6)	160,9 (118,4-368,8)	0,371	0,19
TNF- α	800,0 (0,0-0,0)	970,0 (490,0-1.530,0)	-	-
Variables	PT mean < 20 – HTx-C	PT mean ≥ 20 – HTx-C		
CD66b	0,000111(0,000051-0,000265)	0,000130 (0,000047-0,000172)	0,896	0,03
CD68	0,00001480 (0,00000341-0,00002323)	0,00001202 (0,00000811-0,00001858)	1	0

Source: Elaborated by the authors.

Database: 29 patients overall.

Data expressed as median (Q1-Q3).

Data measured by right heart catheterization: PT mean.

The difference between the total number of patients surveyed and those presented in Table (n) refers to the number of cases without information.

p = probability of significance from the Mann-Whitney test (z-test statistic); r = effect size for non-parametric test.

DISCUSSION

Preliminarily, quantitative analysis of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 and the count of CD68 macrophages and CD66b neutrophils in HTx pulmonary artery tissue were carried out. It is believed that the dosage of such inflammatory biomarkers in the pulmonary artery tissue better reflects the inflammatory process in the vessel than the analysis carried out in the plasma of surgical patients, which are known to be very elevated¹⁷.

PAH is a condition associated with terminal HF that represents an additional challenge in the care of HTx patients². Different mechanisms can explain the pathophysiology of PAH in the setting of HF, but little research exists into the real effect of the local inflammatory process on the development of this serious problem.

Pulmonary vascular lesions occurring in patients with PAH and in animal models of pulmonary hypertension are characterized by varying degrees of perivascular inflammatory infiltrates, comprising T and B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, and mast cells¹⁸. In addition to increased perivascular immune cells and intravascular infiltration, circulating levels of specific cytokines are abnormally elevated in PAH, including the cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α ¹⁸. Increased pulmonary pressure is one of the most important predictors of death after HTx¹⁹, determining the importance of analyzing pulmonary arterial pressure and its pulmonary reactivity in the pre-transplant period¹⁹.

It is known that IL-6 is a pro-inflammatory cytokine that has a significant association with mortality in patients with PAH²⁰. Similar findings have been reported in patients with congestive HF²¹, suggesting that IL-6 plays a role in the pathophysiology of HF and PAH²¹. IL-1 β is well recognized as clinically relevant in patients with hypertension²². Due to its essential role in inflammation, how IL-1 β influences changes related to vascular pathology in hypertension has gained much interest and is currently being explored²³. For example, recent reports suggest that IL-1 β not only participates in the pro-inflammatory response in vessels but also influences the phenotype and functions of vascular smooth muscle cells and vascular remodeling in various types of hypertension through inflammation²⁴.

TNF- α is considered one of the main cytokines related to inflammatory and immune processes²⁵, directly influencing the adhesion of circulating inflammatory cells in tissues²⁶. Studies showed that TNF- α was notably higher in PAH²⁷; however, our study did not corroborate this fact.

Recent research has evaluated the role of perivascular macrophages infiltrating pulmonary arterioles in PAH¹⁸. CD68 macrophages are prominent in advanced plexiform obliterans lesions observed in experimental and clinical studies of PAH^{28,29}, and depletion or

inactivating macrophages prevents PAH in several experimental study models^{30,31}. M1-type macrophages amplify inflammation by secreting pro-inflammatory factors, while M2-type macrophages promote inflammation and tissue repair, playing an essential role in pulmonary vascular remodeling³².

Neutrophils are the most abundant type of white blood cells in human circulation³³. In contrast to monocytes and macrophages, neutrophils are traditionally considered bystanders of cardiovascular disease, but studies in recent years have demonstrated important functional roles of neutrophils in inflammation and cardiovascular repair^{34,35}. CD66b is a marker of neutrophil activation³⁶.

This research demonstrated that the median mean pressure measured in the pulmonary artery trunk by manometry was 25.3 (19.3-35.0) in chagasic patients and 31.0 (20.9-49.3) in those with non-chagasic patients. When comparing the various pressure parameters measured by right heart catheterization and echocardiography, there was no significant difference between their levels and the fact that the patients were HTx-C and HTx-NC (Table 2). Gelape et al.⁸ found lower pulmonary vascular resistance (PVR) levels based on hemodynamic parameters in patients with Chagas cardiomyopathy, a fact not identified in this study.

The HTx studied here had increased levels of the cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6, regardless of whether the etiology was chagasic (Table 2). This suggests that these inflammatory markers participate in the HF pathophysiological process. This data indicates that the etiology of cardiomyopathy does not influence the different levels of inflammatory cytokines.

Furthermore, we did not find significant differences in the tissue levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, CD66b and CD68 when comparing HTx patients with and without PAH (Table 3). It was also observed that HTx-C with and without PAH presented the same number of CD66b and CD68 inflammatory cells in the tissue. These data suggest that the pathophysiological mechanism of PAH is more related to HF than the inflammatory response.

Patients with advanced HF often develop an increase in pulmonary pressure through a retrograde mechanism.³⁷ Left ventricular dysfunction causes an increase in end-diastolic pressure transmitted to the pulmonary vascular bed, increasing venous pressure³⁷. Over time, vascular vasoconstriction and, subsequently, pathological restructuring occur with increased cell proliferation and hypertrophy associated with intimal fibrosis⁸. Up to a third of patients develop PAH⁸.

It is known that chronic HF activates the immune system and inflammatory responses characterized by elevated levels of circulating pro-inflammatory cytokines^{38,39}. Inflammation and immune cells participate in both acute myocyte injury and chronic HF⁴⁰. Inflammatory factors such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 are increased in patients with HF⁴⁰. Small animal models of myocarditis and pressure overload suggest immune activation during HF⁴¹. Such arguments may justify the levels of inflammatory markers being similar in HTx recipients despite the diagnosis of PAH.

CONCLUSION

We observed that HTx-C and HTx-NC, with or without PAH, presented similar levels of inflammatory markers expressed in the pulmonary arteries, which suggests that the mechanism of PAH is more associated with HF itself than with the inflammatory response secondary to associated cardiomyopathy. In this study, Chagas cardiomyopathy, even though it is a disease with a very evident and proven local inflammatory substrate, does not present higher levels of PAH and local inflammation compared to other HF etiologies.

REFERÊNCIAS

1. Rohde LEP, Montera MW, Bocchi EA, Clausell NO, de Albuquerque DC, Rassi S, et al. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. *Arq Bras Cardiol* 2018; 111(3): 436-539. <https://doi.org/10.5935/abc.20180190>
2. Bacal F, Marcondes-Braga FG, Rohde LEP, Xavier Júnior JL, Brito F de S, Moura LAZ, et al. 3ª Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. *Arq Bras Cardiol* 2018;111(2):230-89. <https://doi.org/10.5935/abc.20180153>
3. Pêgo-Fernandes PM, Pestana JOM, Garcia VD. Transplants in Brazil: where are we? *Clinics* 2019;74:1-2. <https://doi.org/10.6061/clinics/2019/e832>
4. Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, Harhay MO, Hayes D, Hsich E, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-sixth adult heart transplantation report – 2019; focus theme: donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant* 2019;38(10):1056-66. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.08.004>
5. Registro Brasileiro de Transplantes. Ano XXVIII Nº 3. 2022. [acesso 27 dez. 2023] Disponível em: <https://site.abto.org.br/wp-content/uploads/2022/11/rbt-naoassociado.pdf>
6. Araújo E, Silva DA. Transplante cardíaco: co-morbidades e complicações apresentadas por pacientes em um hospital universitário de Belo Horizonte. Dissertação [Mestrado em Enfermagem] – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais; 2011. [acesso 08 jan. 2024] Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/GCPA-8KUGWN>

7. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:152-8. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900021>
8. Gelape CL, Nunes M do CP, Bráulio R, Nogueira PH, Andrade SA de, Machado PAB, et al. Pressão pulmonar aferida pela ecocardiografia em pacientes chagásicos indicados para transplante cardíaco. *Braz J Cardiovasc Surg* 2011;26(1). <https://doi.org/10.1590/S0102-76382011000100012>
9. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019;53:1801913. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
10. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2012;141:210-21. <https://doi.org/10.1378/chest.11-0793>
11. Jäättelä M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor-alpha/cachectin. *Lab Invest* 1991;64:724-42. [acesso em 10 jan. 2024] Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1646350/>
12. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991;77(8):1627-52. <https://doi.org/10.1182/blood.V77.8.1627.1627>
13. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(5). <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.5.7735624>
14. Savai R, Pullamsetti SS, Kolbe J, Bieniek E, Voswinckel R, Fink L, et al. Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:897-908. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0335OC>
15. Pugliese SC, Poth JM, Fini MA, Olschewski A, El Kasmi KC, Stenmark KR. The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;308:L229-52. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00238.2014>
16. McQuillan BM, Picard MH, Leavitt M, Weyman AE. Clinical correlates and reference intervals for pulmonary artery systolic pressure among echocardiographically normal subjects. *Circulation* 2001;104:2797-802. <https://doi.org/10.1161/hc4801.100076>
17. Wan S, Marchant A, DeSmet J-M, Antoine M, Zhang H, Vachier J-L, et al. Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:469-77. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(96\)70458-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(96)70458-0)
18. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2014;115:165-75. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301141>
19. Tei C, Dujardin KS, Hodge DO, Bailey KR, McGoon MD, Tajik AJ, et al. Doppler

echocardiographic index for assessment of global right ventricular function. *J Am Soc Echocardiogr* 1996;9:838-47. [https://doi.org/10.1016/S0894-7317\(96\)90476-9](https://doi.org/10.1016/S0894-7317(96)90476-9)

20. Mogollón MV, Lage Gallé E, Hinojosa Pérez R, Herruzo Avilés A, Sobrino Márquez JM, Romero Rodríguez N, et al. Prognosis after heart transplant in patients with pulmonary hypertension secondary to cardiopathy. *Transplant Proc* 2008;40:3031-3. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.09.051>

21. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure. *Circulation* 2001;103:2055-9. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.16.2055>

22. Dalekos GN, Elisaf M, Bairaktari E, Tsolas O, Siamopoulos KC. Increased serum levels of interleukin-1 β in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? *J Lab Clin Med* 1997;129:300-8. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(97\)90178-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(97)90178-5)

23. Melton E, Qiu H. Interleukin-1 β in multifactorial hypertension: inflammation, vascular smooth muscle cell and extracellular matrix remodeling, and non-coding RNA regulation. *Int J Mol Sci* 2021;22:8639. <https://doi.org/10.3390/ijms22168639>

24. Postlethwaite A, Raghow R, Stricklin G, Poppleton H, Seyer J, Kang A. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol* 1988;106:311-8. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.2.311>

25. Vitale RF, Ribeiro F de AQ. O papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Braz J Otorhinolaryngol* 2007;73:123-7. <https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000100020>

26. Gao X, Zhang H, Belmadani S, Wu J, Xu X, Elford H, et al. Role of TNF- α -induced reactive oxygen species in endothelial dysfunction during reperfusion injury. *Am J Physiol - Heart and Circulatory Physiology* 2008;295:H2242-9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00587.2008>

27. Zhu T, Zhang W, Yin Y, Liu Y, Song P, Xu J, et al. MicroRNA-140-5p targeting tumor necrosis factor- α prevents pulmonary arterial hypertension. *J Cell Physiol* 2019;234:9535-50. <https://doi.org/10.1002/jcp.27642>

28. Tudor RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1994;144:275-85. [acesso 05 fev. 2024] Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1887146/>

29. Vergadi E, Chang MS, Lee C, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A, et al. Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2011;123:1986-95. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.978627>

30. Thenappan T, Goel A, Marsboom G, Fang Y-H, Toth PT, Zhang HJ, et al. A central role

for CD68(+) macrophages in hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1080-91. <https://doi.org/10.1164/rccm.201008-1303OC>

31. Tian W, Jiang X, Tamosiuniene R, Sung YK, Qian J, Dhillon G, et al. Blocking macrophage leukotriene B₄ prevents endothelial injury and reverses pulmonary hypertension. *Sci Transl Med* 2013;5(200):200ra117. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006674>

32. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology* 2018;154:186-95. <https://doi.org/10.1111/imm.12910>

33. Prausmüller S, Spinka G, Stasek S, Arfsten H, Bartko PE, Goliasch G, et al. Neutrophil activation/maturation markers in chronic heart failure with reduced ejection fraction. *Diagnostics* 2022;12:444.

34. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;18:733-44. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0065-8>

35. Silvestre-Roig C, Braster Q, Ortega-Gomez A, Soehnlein O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol* 2020;17:327-40. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0326-7>

36. Torsteinsdottir I, Arvidson N-G, Hallgren R, Hakansson L. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scand J Immunol* 1999;50:433-9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00602.x>

37. Mogollón MV, Lage Gallé E, Hinojosa Pérez R, Herruzo Avilés A, Sobrino Márquez JM, Romero Rodríguez N, et al. Prognosis after heart transplant in patients with pulmonary hypertension secondary to cardiopathy. *Transplant Proc* 2008;40:3031-3. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.09.051>

38. Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL. Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2020;17:269-85. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0315-x>

39. Marra AM, Arcopinto M, Salzano A, Bobbio E, Milano S, Misiano G, et al. Detectable interleukin-9 plasma levels are associated with impaired cardiopulmonary functional capacity and all-cause mortality in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2016;209:114-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.017>

40. Van Linthout S, Tschöpe C. Inflammation – cause or consequence of heart failure or both? *Curr Heart Fail Rep* 2017;14:251-65. <https://doi.org/10.1007/s11897-017-0337-9>

41. Carrillo-Salinas FJ, Ngwenyama N, Anastasiou M, Kaur K, Alcaide P. Heart inflammation. *Am J Pathol* 2019;189:1482-94. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.04.009>

6.3 Artigo 3

Situação: submetido para publicação no periódico Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery.

TITLE

Correlation of inflammatory markers with prognostic factors in heart transplant patients

Marcus Vinícius de Paula da Silva^{1,*} [<https://orcid.org/0000-0001-6943-3718>],
Ildernandes Vieira Alves² [<https://orcid.org/0000-0001-8635-1642>], Antonielle Rodrigues
Pereira Alves² [<https://orcid.org/0000-0002-5022-8156>], Virginia Soares Lemos²
[<https://orcid.org/0000-0003-1234-9325>], Gabriel Assis Lopes do Carmo¹
[<https://orcid.org/0000-0002-3610-6507>], Fábio Morato de Castilho¹ [<https://orcid.org/0000-0002-0489-3737>], Cláudio Léo Gelape¹ [<https://orcid.org/0000-0002-8287-0733>]

¹ Universidade Federal de Minas Gerais [<https://ror.org/0176yjwt32>] – Faculdade de Medicina – Departamento de Cirurgia Cardiovascular – Belo Horizonte (MG) – Brasil.

² Universidade Federal de Minas Gerais [<https://ror.org/0176yjwt32>] – Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Fisiologia e Biofísica – Belo Horizonte (MG) – Brasil.

ABBREVIATIONS PAGE

Cluster of differentiation 66b (CD66b)

Cluster of differentiation 68 (CD68)

Body mass index (BMI)

Enzyme-linked ImmunoSorbent assay (ELISA)

Heart failure (HF)

Heart transplant (HT)

Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin – 6 (IL-6)

INTERMACS - Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support

Mean pulmonary artery pressure (mPAP)

Milliliter (mL)

NYHA - New York Heart Association

Picogram (pg)

Pulmonary arterial hypertension (PAH)

Standard deviation (SD)

Tumor necrosis factor – α (TNF- α)

Vasoplegic syndrome (VS)

ABSTRACT

Heart transplantation (HT) is the preferred treatment for many patients with end-stage heart failure (HF) who have severely impaired functional capacity despite receiving optimal medical therapy. Patients who are at the highest risk of dying while waiting for a heart transplant are prioritized for surgery. Other methods of assessing the prognosis of HF patients include the INTERMACS classification and the occurrence of vasoplegic syndrome after cardiovascular surgery. Chronic HF has been associated with systemic inflammation. Inflammatory markers are linked to the development and progression of HF and are predictors of poor outcomes in HF. In this context, this work aimed to correlate the expression of inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α IL-6, and the count of CD68 macrophages and CD66b neutrophils in pulmonary artery tissue of HT patients with factors of poor prognosis in HT. Methods: The levels of interleukins IL-6, IL-1 β and TNF- α and CD68 and CD66b neutrophils were measured in fragments of the pulmonary arteries of HT patients with and without poor prognostic factors. Results: There was no statistically significant difference ($p \geq 0.05$) between the levels of inflammatory markers measured in the pulmonary arteries of HT patients with or without poor prognostic factors. Conclusion: We observed that HT patients, with or without poor prognostic factors, presented similar inflammatory markers in the pulmonary arteries. This fact suggests that the poor prognosis in HT is more correlated with clinical parameters per se than with the inflammatory response secondary to associated cardiomyopathy.

Keywords: Heart transplantation. Inflammatory markers. Prognosis in heart transplantation.

INTRODUCTION

Heart transplantation (HT) remains the treatment of choice for many patients with end-stage heart failure (HF) with severely impaired functional capacity despite optimal medical therapy (1). There is consensus that HT, with appropriate selection criteria, increases survival and quality of life, exercise capacity, and provides a faster return to work compared to conventional treatment (1).

Patients with a higher probability of death on the HT waiting list have priority to undergo the surgical procedure. In this clinical condition, some patients require mechanical circulatory assistance, inotropic support, or mechanical ventilation (1).

Another way to assess the prognosis of patients with HF is through the Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support (INTERMACS) classification. Although it was not created to define criteria for HT, it can be useful in clinical and prognostic assessments when indicating therapies for advanced HF and/or cardiogenic shock (2). It is divided into seven categories, with patients in critical condition (INTERMACS 1 and 2) representing situations in which the perioperative risk for transplantation is very unfavorable (3).

Vasoplegic syndrome (VS), also known as vasodilatory shock, occurs after cardiopulmonary bypass and can affect up to half of all patients undergoing HT (4). It is characterized by target organ hypoperfusion secondary to arterial hypotension, accompanied by normal or high cardiac output, low systemic vascular resistance, and increased intravascular volume or vasopressor requirements (4). It is characterized not only by vasodilation but mainly by loss of basal vascular reactivity and tone (5). The pathogenesis of VS involves, as with septic shock, inflammatory reaction, macrophage activation, and cytokine release (5). From a cellular perspective, VS consists of a contractile deficit of vascular smooth muscle (5).

Systemic inflammation has been recognized as a pathophysiological feature of chronic HF (6). Specifically, inflammation has been associated with the development, progression, and complications of the disease, and is a predictor of poor outcomes, independent of traditional metrics such as left ventricular ejection fraction or New York Heart Association (NYHA) functional class (6). Inflammatory factors such as Tumor necrosis factor – α (TNF- α), interleukin 1 Beta (IL-1 β), and interleukin 6 (IL-6) are increased in patients with HF (6). Small animal models of myocarditis and pressure overload suggest immune activation during HF (6). Cluster of differentiation 66b (CD66b) is a cell adhesion molecule that marks neutrophil activation in response to pro-inflammatory stimuli (7). Cluster of differentiation 68 (CD68) is a transmembrane glycoprotein expressed by monocytes and macrophages (8). Our study contributes to the elucidation of pathophysiological mechanisms involved in the prognosis of heart transplant patients.

OBJECTIVE

This study aimed to correlate the expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 and the count of CD68 macrophages and CD66b neutrophils in the pulmonary artery tissue of HT patients with worse prognostic factors.

METHODS

The study protocol complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the UFMG Institutional Review Board. All patients provide written consent for this cross-sectional comparative study of parallel groups.

Twenty-five patients who underwent HT at the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais between January 2021 and February 2023 were included in the study. The study sample size was based on a convenience sample.

The clinical data of the study sample were collected through analysis of medical records accessed by the computer (database) of the participating hospital.

Inclusion criteria: recipients who agreed to sign the informed consent form were included. Patients of both sexes, aged 18 years or older, with terminal cardiomyopathy undergoing TxC were selected.

Exclusion criteria: patients with cancer, dementia, clinically diagnosable inflammatory process, type I diabetes mellitus, history of surgery or trauma in the last four weeks, pregnant women, autoimmune disease, known carriers of the human immunodeficiency virus, hepatitis C, hepatitis B and those who did not agree to sign the informed consent form were excluded from the study.

Pulmonary artery fragments were collected from recipients during cardiectomy. These fragments were stored in vials with a lactated ringer. The pulmonary artery was isolated and the surrounding perivascular tissue was removed. These segments were then embedded in Tissue-Tek® OCT™ freezing medium (Sakura®, USA), and cross-sections (10 µm) of the arteries were obtained using a cryostat. The slides were fixed in 4% paraformaldehyde solution for 15 min before immunofluorescence was performed. CD68 and CD66b neutrophil counts were performed using the immunofluorescence technique. Fiji software (version 1.51j8) was used to quantify the number of cells positive for the target and nuclei. The result was expressed as the number of positive cells per µm² of tissue.

The quantification of the inflammatory cytokines IL-1β, TNF-α, and IL-6 was performed in pulmonary artery fragments. Enzyme-linked ImmunoSorbent assay (ELISA) technique was used to quantify the concentration of TNF-α, IL-6, and IL-1β as indicated in the instructions of the commercial kits (R&D Systems). The results were presented as a picogram (pg) of protein per milliliter of tissue (pg/ml).

In this study, the descriptive measures median (Q2), quartiles (Q1 and Q3), mean, and standard deviation (SD) were presented to describe, respectively, the quantitative variables with non-normal and normal distribution; and absolute frequencies (n) as statistics to describe the results of the categorical variables. A comparison of the distribution between the measures (Median, Q1, and Q3) of the variable was performed using the Mann-Whitney test. A p-value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Samples were collected from 25 patients undergoing HT. Table 1 shows the characteristics of the study population. The age of the patients was 53.1 ± 8.5 years, and 12 were female. The body mass index (BMI) was 22.6 ± 4.0 .

Table 1 – Clinical characteristics of recipient patients (HT)

PARAMETERS	RECIPIENTS (N = 25)
AGE (YEARS) ^a	53,1 ± 8,5
SEX (FEMALE/MALE)	12/13
BMI ^a	22,6 ± 4,0

^a Data are expressed as mean ± standard deviation, Student's t-test for dependent samples. Body mass index (BMI)

^a Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, Student's t-test for dependent samples. Body mass index (BMI)

Table 2 shows comparative inflammatory parameter data between the HT about the prognostic factors: priority of the surgery, postoperative period with VS or not, preoperative period with INTERMACS ≤ 3 or > 3 .

There was no statistically significant difference between the inflammatory markers when we compared these groups.

Table 2 – Descriptive and comparative analyses between recipients in the priority of the surgery, with VS or not, with INTERMACS ≤ 3 or > 3 regarding the variable number of cells per square micrometer and cytokine concentration

Transplant character			p	r
Variables*	Priority	Out of priority		
CD66b	(n = 11)	(n = 5)		
	0,000081 (0,000047 0,000172)	0,000175 (0,000135 – 0,000267)	0,126	0,38
CD68	(n = 12)	(n = 5)		
	0,00001725(0,00000750- 0,00002066)	0,00001270(0,00000537 –0,00002295)	0,916	0,03
IL-6	(n = 13)	(n = 7)		
	376,0 (329,3 – 551,4)	522,7 $\pm$ 362,1	0,782	0,06
IL-1β	(n = 11)	(n = 8)		
	312,6 (151,1 – 581,0)	136,4 (62,7 – 384,0)	0,186	0,3
TNF-α	(n = 10)	(n = 6)		
	1.190,0 (542,5 – 1.830,0)	710,0 (262,5 – 1.897,5)	0,515	0,16
Vasoplegic syndrome				
Variables*	Yes	No	p	r
IL-6	(n = 6)	(n = 14)		
	351,3 (289,2 – 689,4)	380,0 (343,0 – 580,1)	0,366	0,2
IL-1β	(n = 6)	(n = 13)		

	374,2 (110,5 – 609,1)	153,3 (114,0 – 338,2)	0,086	0,39
TNF-α	(n = 4)	(n = 12)		
	1.630,0 (422,5 – 3.362,5)	1.100,0 (352,5 – 1.650,0)	0,123	0,39
INTERMACS				
Variables*	≤ 3	> 3	p	r
CD66b	(n = 11)	(n = 5)		
	0,000081 (0,000047 – 0,000172)	0,000175 (0,000135 – 0,000175)	0,126	0,38
CD68	(n = 12)	(n = 5)		
	0,00001725 (0,00000750 – 0,00002066)	0,00001270 (0,00000537 – 0,00002295)	0,916	0,03
IL-6	(n = 13)	(n = 7)		
	376,0 (329,3 – 551,4)	384,0 (341,6 – 727,7)	0,782	0,06
IL-1β	(n = 11)	(n = 8)		
	312,6 (151,1 – 581,0)	136,4 (62,7 – 384,0)	0,186	0,30
TNF-α	(n = 10)	(n = 6)		
	1.190,0 (542,5 – 1.830,0)	710,0 (262,5 – 1.897,5)	0,515	0,16

DATABASE: 29 patients overall

NOTE: **p** $\rightarrow$ Mann-Whitney test significance probability (**Z** $\rightarrow$ Test statistic).

r $\rightarrow$ Effect size for non-parametric test.

*Median, first quartile (Q1), third quartile (Q3).

- The difference between the total number of patients and the total number of patients presented in table (n) for each variable refers to the number of cases without information.

DISCUSSION

We performed a pioneering quantitative analysis of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6, and the count of CD68 macrophages and CD66b neutrophils in pulmonary artery tissue from LTx. It is believed that the measurement of these inflammatory biomarkers in pulmonary artery tissue better reflects the inflammatory process in the vessel than the analysis performed in the plasma of surgical patients, which is known to be very high (9).

Several recipient factors are associated with prognosis after HT. The severity of the disease before transplantation is usually a predictor of adverse outcomes. Such severity is largely determined by patient factors and the ability of centers to successfully treat critically ill patients with therapies that include inotropes and temporary mechanical circulatory support devices until transplantation can occur (1). In a study that included patients listed for

emergency HT in the Spanish National Heart Transplant Registry database, recipients who met INTERMACS registry profile 1 criteria (critical cardiogenic shock) and profile 2 criteria (progressive clinical decline despite inotropic treatment) had the highest risk of primary graft failure, need for dialysis, and in-hospital mortality after heart transplantation (10). VS after cardiovascular surgery accounts for less than 5% of all circulatory shocks (11). Despite this, between 5 and 50% of patients undergoing cardiac surgery may present with vasoplegic syndrome with high rates of morbidity and mortality in these patients (12). When comparing the prognostic parameters (recipients in the priority queue or not, with VS or not, with INTERMACS ≤ 3 or > 3) regarding the variables several CD66b and CD68 cells per square micrometer and concentration of the cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6, there was no significant difference between the levels of these parameters and the levels of the inflammatory markers (Table 2).

The first descriptions relating HF and inflammation in the modern era date back to 1956, when a positive correlation was found between C-reactive protein levels and the severity of HF (13). More recently, a positive correlation was described between TNF- α and the severity of HF (14). Since then, a series of inflammatory cytokines have been described in this clinical context, including IL-1 β and IL-6 (15).

It is known that TNF- α is produced in cardiomyocytes (16). It appears that both TNF- α and some related molecules cause apoptosis of myocardial cells via cell death mechanisms (16). IL-6 is a cytokine with pro-inflammatory effects (17). Its elevation in serum has prognostic significance for the development of HF (15). IL-1 β is a potent pro-inflammatory cytokine (18). In studies of pulmonary arterial hypertension in patients with HF, elevated serum levels of IL-1 β correlate with a worse prognosis (19). Furthermore, in a study using animal models, treatment with an IL-1 receptor antagonist reduced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy (20).

Regarding neutrophils, they are the most abundant type of white blood cells in human circulation (7). In contrast to monocytes and macrophages, they are traditionally considered bystanders of cardiovascular disease, but studies in recent years have demonstrated important functional roles of neutrophils in inflammation and cardiovascular repair (21). In the case of inflammation, neutrophils are rapidly recruited from the bloodstream into tissues (21). CD66b is a marker of neutrophil activation (21). In the data reported by the Prausmuller study, neutrophil CD64 expression was higher in HF with reduced ejection fraction compared with controls (7). Neutrophil CD11b and CD66b correlated inversely with HF severity as reflected by B-type natriuretic peptide hormone levels and NYHA functional class (7).

Furthermore, neutrophil CD11b and CD66b showed a significant direct correlation with neutrophil CD10 (neprilysin) expression, while higher CD10 levels have previously been associated with better outcomes (22). CD68 macrophages are prominent in advanced obliterating plexiform lesions observed in experimental and clinical studies of pulmonary arterial hypertension (PAH), and depletion or inactivation of macrophages prevents PAH in several experimental study models (23). M1-type macrophages amplify inflammation by secreting pro-inflammatory factors, whereas M2-type macrophages promote inflammation and tissue repair, playing an important role in pulmonary vascular remodeling (24).

Chronic HF is known to activate the immune system and inflammatory responses characterized by elevated levels of circulating pro-inflammatory cytokines (17). Inflammation and immune cells participate in both acute myocyte injury and chronic HF (25). Inflammatory factors, such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6, are increased in patients with HF (25). Models of myocarditis and pressure overload in small animals suggest immune activation during HF (15). Such arguments may justify the similar levels of inflammatory markers in HT recipients despite the prognostic parameters evaluated.

CONCLUSION

We observed that HT patients, with or without worse prognostic factors, presented similar inflammatory markers in the pulmonary arteries. This fact suggests that the poor prognosis in HT is more correlated with clinical parameters per se than with the inflammatory response secondary to associated cardiomyopathy.

REFERENCES

1. Bacal F, Marcondes-Braga FG, Rohde LEP, Xavier Júnior JL, Brito F de S, Moura LAZ, et al. 3rd Brazilian Heart Transplant Guideline. *Arq Bras Cardiol.* 2018 Aug 1;111(2):230–89.
2. Stevenson LW, Pagani FD, Young JB, Jessup M, Miller L, Kormos RL, et al. INTERMACS Profiles of Advanced Heart Failure: The Current Picture. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2009 Jun;28(6):535–41.
3. Barge-Caballero E, Segovia-Cubero J, Almenar-Bonet L, Gonzalez-Vilchez F, Villa-Arranz A, Delgado-Jimenez J, et al. Preoperative INTERMACS Profiles Determine Postoperative Outcomes in Critically Ill Patients Undergoing Emergency Heart Transplantation. *Circ Heart Fail.* 2013 Jul;6(4):763–72.
4. Busse LW, Barker N, Petersen C. Vasoplegic syndrome following cardiothoracic surgery—review of pathophysiology and update of treatment options. *Crit Care.* 2020 Dec 4;24(1):36.
5. Shaefi S, Mittel A, Klick J, Evans A, Ivascu NS, Gutsche J, et al. Vasoplegia After Cardiovascular Procedures—Pathophysiology and Targeted Therapy. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2018 Apr;32(2):1013–22.

6. Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, Januzzi JL. Inflammation in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Mar;75(11):1324–40.
7. Prausmüller S, Spinka G, Stasek S, Arfsten H, Bartko PE, Goliasch G, et al. Neutrophil Activation/Maturation Markers in Chronic Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. *Diagnostics*. 2022 Feb 9;12(2):444.
8. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*. 1993 Mar 15;81(6):1607–13.
9. Wan S, Marchant A, DeSmet JM, Antoine M, Zhang H, Vachieri JL, et al. Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996 Feb;111(2):469–77.
10. Barge-Caballero E, Segovia-Cubero J, Almenar-Bonet L, Gonzalez-Vilchez F, Villa-Arranz A, Delgado-Jimenez J, et al. Preoperative INTERMACS Profiles Determine Postoperative Outcomes in Critically Ill Patients Undergoing Emergency Heart Transplantation. *Circ Heart Fail*. 2013 Jul;6(4):763–72.
11. Vincent JL, De Backer D. Circulatory Shock. *New England Journal of Medicine*. 2013 Oct 31;369(18):1726–34.
12. Weis F, Kilger E, Beiras-Fernandez A, Nassau K, Reuter D, Goetz A, et al. Association between vasopressor dependence and early outcome in patients after cardiac surgery. *Anesthesia*. 2006 Oct 11;61(10):938–42.
13. Elster SK, Braunwald E, Wood HF. A study of C-reactive protein in the serum of patients with congestive heart failure. *Am Heart J*. 1956 Apr;51(4):533–41.
14. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated Circulating Levels of Tumor Necrosis Factor in Severe Chronic Heart Failure. *New England Journal of Medicine*. 1990 Jul 26;323(4):236–41.
15. Carrillo-Salinas FJ, Ngwenyama N, Anastasiou M, Kaur K, Alcaide P. Heart Inflammation. *Am J Pathol*. 2019 Aug;189(8):1482–94.
16. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and Cytokine Receptors in Advanced Heart Failure. *Circulation*. 2001 Apr 24;103(16):2055–9.
17. Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL. Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2020 May 15;17(5):269–85.
18. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, et al. Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest*. 2012 Jan;141(1):210–21.
19. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, et al. Elevated Levels of Inflammatory Cytokines Predict Survival in Idiopathic and Familial Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2010 Aug 31;122(9):920–7.
20. Voelkel NF, Tudor RM, Bridges J, Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 Dec;11(6):664–75.
21. Silvestre-Roig C, Braster Q, Ortega-Gomez A, Soehnlein O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol*. 2020 Jun 29;17(6):327–40.
22. Prausmüller S, Spinka G, Arfsten H, Stasek S, Retzl R, Bartko PE, et al. Relevance of Neutrophil Neprilysin in Heart Failure. *Cells*. 2021 Oct 28;10(11):2922.

23. Vergadi E, Chang MS, Lee C, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A, et al. Early Macrophage Recruitment and Alternative Activation Are Critical for the Later Development of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation*. 2011 May 10;123(18):1986–95.
24. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*. 2018 Jun 8;154(2):186–95.
25. Van Linthout S, Tschöpe C. Inflammation – Cause or Consequence of Heart Failure or Both

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Trata-se de um estudo com amostra reduzida, apesar de ter utilizado grupo controle e incluído diferentes etiologias de cardiomiopatias.

O estudo ocorreu no período da pandemia do COVID-19, momento de queda tanto nas taxas de doação quanto de transplantes cardíacos.

O grupo controle constituído por doadores de transplante cardíaco foi considerado sem hipertensão arterial pulmonar ou cardiopatia estrutural, porém algumas considerações são importantes.

A avaliação realizada pela equipe de TxC no momento da captação do órgão, visando afastar comprometimento anatômico e funcional do coração, leva em consideração dados clínicos, hemodinâmicos, antecedentes significativos, eletrocardiograma, radiografia de tórax, exames laboratoriais e ecocardiograma de todos os doadores. Entretanto, não se utiliza o cateterismo direito na aferição da pressão da artéria pulmonar. Sabe-se que a tempestade adrenérgica que ocorre no doador de órgãos leva a grande resposta inflamatória com liberação de interleucinas. Porém, a despeito de uma análise objetiva do doador, há alterações teciduais e histológicas e imunológicas que não são avaliadas atualmente no momento do transplante. Pode-se inferir que essas alterações do ambiente tecidual poderiam comprometer o resultado do transplante de órgãos e por isso devem ser de alguma forma levadas em consideração.

8. CONCLUSÃO

Os autores sugerem a presença de um perfil pró-inflamatório no tecido de artérias pulmonares dos receptores de TxC, e da mesma forma, em seus doadores, independente dos níveis aferidos de pressão na artéria pulmonar. Além disso, foram observadas correlações negativas entre as variáveis índice cardíaco e TNF- α , e entre os níveis de gradiente transpulmonar e TNF- α , correlação positiva entre os níveis de pressão no átrio direito e a IL-6. O estudo sugere também a presença de diferença estatisticamente significativa entre os pacientes que foram a óbito em 30 dias e o maior número de células CD68 por micrômetro quadrado no vaso do paciente doador e receptor. O estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes receptores chagásicos e os receptores não-chagásicos no que diz respeito às variáveis clínicas, ecocardiográficas, manométricas e aos marcadores inflamatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fang JC, Ewald GA, Allen LA, Butler J, Westlake Canary CA, Colvin-Adams M, et al. Advanced (stage D) heart failure: A statement from the heart failure society of america guidelines committee. *J Card Fail*. 2015 Jun 1;21(6):519–34.
2. Rohde LEP, Montera MW, Bocchi EA, Clausell NO, de Albuquerque DC, Rassi S, et al. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. *Arq Bras Cardiol*. 2018 Sep 1;111(3):436–539.
3. Bacal F, Marcondes-Braga FG, Rohde LEP, Xavier Júnior JL, Brito F de S, Moura LAZ, et al. 3ª Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. *Arq Bras Cardiol*. 2018 Aug 1;111(2):230–89.
4. Pêgo-Fernandes PM, Pestana JOM, Garcia VD. Transplants in Brazil: Where are we? *Clinics*. 2019;74:1–2.
5. Moreira LFP. Os arquivos e a publicação de seu primeiro fator de impacto. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(1):1–2.
6. Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, Harhay MO, Hayes D, Hsich E, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult heart transplantation report — 2019; focus theme: Donor and recipient size match. *Journal of Heart and Lung Transplantation* [Internet]. 2019;38(10):1056–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.08.004>
7. Transplantes RB De. Ano XXVIII Nº 3. 2022;
8. Transplantes RB De. Ano XXVIII Nº 1. 2022;
9. Araújo E, Silva DA. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS ESCOLA DE ENFERMAGEM Mestrado em Enfermagem TRANSPLANTE CARDÍACO: COMORBIDADES E COMPLICAÇÕES APRESENTADAS POR PACIENTES EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BELO HORIZONTE. 2011.
10. Mogollón M V., Lage Gallé E, Hinojosa Pérez R, Herruzo Avilés A, Sobrino Márquez JM, Romero Rodríguez N, et al. Prognosis After Heart Transplant in Patients With Pulmonary Hypertension Secondary to Cardiopathy. *Transplant Proc*. 2008 Nov;40(9):3031–3.
11. Gelape CL, Nunes M do CP, Bráulio R, Nogueira PH, Andrade SA de, Machado PAB, et al. Pressão pulmonar aferida pela ecocardiografia em pacientes chagásicos indicados para transplante cardíaco TT - Pulmonary pressure by echocardiophy in chagasic patients on heart transplant waiting list. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2011;

12. Hoeper MM, Barberà JA, Channick RN, Hassoun PM, Lang IM, Manes A, et al. Diagnosis, Assessment, and Treatment of Non-Pulmonary Arterial Hypertension Pulmonary Hypertension. Vol. 54, Journal of the American College of Cardiology. 2009.
13. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. In: Journal of the American College of Cardiology. 2013.
14. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. In: European Respiratory Journal. European Respiratory Society; 2019.
15. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. Eur Heart J. 2016 Jan 1;37(1):67–119.
16. Maron BA, Hess E, Maddox TM, Opatowsky AR, Tedford RJ, Lahm T, et al. Association of borderline pulmonary hypertension with mortality and hospitalization in a large patient cohort: Insights from the Veterans Affairs clinical assessment, reporting, and tracking program. Circulation. 2016 Mar 29;133(13):1240–8.
17. Fernandes CJ, Calderaro D, Assad APL, Salibe-Filho W, Kato-Morinaga LT, Hoette S, et al. Update on the treatment of pulmonary arterial hypertension. Arq Bras Cardiol. 2021;117(4):750–64.
18. Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brida M, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. Eur Heart J. 2022 Oct 11;43(38):3618–731.
19. Maron BA, Brittan EL, Hess E, Waldo SW, Barón AE, Huang S, et al. Pulmonary vascular resistance and clinical outcomes in patients with pulmonary hypertension: a retrospective cohort study. Lancet Respir Med. 2020 Sep 1;8(9):873–84.
20. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. Chest. 2012;141(1):210–21.
21. Selimovic N, Bergh CH, Andersson B, Sakiniene E, Carlsten H, Rundqvist B. Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. European Respiratory Journal. 2009;34(3):662–8.
22. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, et al. Increased Interleukin-1 and Interleukin-6 Serum Concentrations in Severe Primary Pulmonary Hypertension. Vol. 151, J Respir Crit Care Med. 1995.
23. Jäättelä M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor- α /cachectin. Lab Invest. 1991 Jun;64(6):724–42.

24. Dinarello CA. Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism.
25. Kovacs EJ. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today*. 1991 Jan;12(1):17–23.
26. Libby P, Warner SJ, Friedman GB. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *J Clin Invest*. 1988 Feb;81(2):487–98.
27. Bevilacqua MP, Poher JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun;83(12):4533–7.
28. Bevilacqua MP, Poher JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med*. 1984 Aug 1;160(2):618–23.
29. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR. Inflammation and Immunity in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res*. 2014 Jun 20;115(1):165–75.
30. Kim YM, Haghighat L, Spiekerkoetter E, Sawada H, Alvira CM, Wang L, et al. Neutrophil elastase is produced by pulmonary artery smooth muscle cells and is linked to neointimal lesions. *Am J Pathol*. 2011 Sep;179(3):1560–72.
31. Zaidi SHE, You XM, Ciura S, Husain M, Rabinovitch M. Overexpression of the serine elastase inhibitor elafin protects transgenic mice from hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation*. 2002 Jan 29;105(4):516–21.
32. Rose F, Hattar K, Gakisch S, Grimminger F, Olschewski H, Seeger W, et al. Increased neutrophil mediator release in patients with pulmonary hypertension – suppression by inhaled iloprost. *Thromb Haemost*. 2003 Dec 5;90(12):1141–9.
33. Prausmüller S, Spinka G, Stasek S, Arfsten H, Bartko PE, Goliasch G, et al. Neutrophil Activation/Maturation Markers in Chronic Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. *Diagnostics*. 2022 Feb 9;12(2):444.
34. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018 Dec 18;18(12):733–44.
35. Silvestre-Roig C, Braster Q, Ortega-Gomez A, Soehnlein O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol*. 2020 Jun 29;17(6):327–40.
36. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N, et al. Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance. *Cell*. 2013 May;153(5):1025–35.

37. Lok LSC, Dennison TW, Mahbubani KM, Saeb-Parsy K, Chilvers ER, Clatworthy MR. Phenotypically distinct neutrophils patrol uninfected human and mouse lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019 Sep 17;116(38):19083–9.
38. Maas SL, Soehnlein O, Viola JR. Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta. *Front Immunol*. 2018 Nov 27;9.
39. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*. 1999 Apr;9(2):67–81.
40. Torsteinsdottir I, Arvidson NG, Hallgren R, Hakansson L. Enhanced Expression of Integrins and CD66b on Peripheral Blood Neutrophils and Eosinophils in Patients with Rheumatoid Arthritis, and the Effect of Glucocorticoids. *Scand J Immunol*. 1999 Oct;50(4):433–9.
41. Moriyama H, Endo J, Kataoka M, Shimanaka Y, Kono N, Sugiura Y, et al. Omega-3 fatty acid epoxides produced by PAF-AH2 in mast cells regulate pulmonary vascular remodeling. *Nat Commun*. 2022 May 31;13(1):3013.
42. Zhang MQ, Wang CC, Pang XB, Shi JZ, Li HR, Xie XM, et al. Role of macrophages in pulmonary arterial hypertension. *Front Immunol*. 2023 Apr 19;14.
43. Hu Y, Chi L, Kuebler WM, Goldenberg NM. Perivascular Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Cells*. 2020 Oct 22;9(11):2338.
44. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*. 2018 Jun;154(2):186–95.
45. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR. Inflammation and Immunity in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res*. 2014 Jun 20;115(1):165–75.
46. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*. 1993 Mar 15;81(6):1607–13.
47. Savai R, Pullamsetti SS, Kolbe J, Bieniek E, Voswinckel R, Fink L, et al. Immune and Inflammatory Cell Involvement in the Pathology of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Nov 1;186(9):897–908.
48. Pugliese SC, Poth JM, Fini MA, Olschewski A, El Kasmi KC, Stenmark KR. The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015 Feb 1;308(3):L229–52.

49. Zawia A, Arnold ND, West L, Pickworth JA, Turton H, Iremonger J, et al. Altered Macrophage Polarization Induces Experimental Pulmonary Hypertension and Is Observed in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021 Jan;41(1):430–45.
50. Barbosa PH, Carneiro F, Martelli A, Trigo EL. Via de sinalização do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), síntese e liberação no exercício físico. *ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION.* 2018 Apr 10;7(3).
51. Weissenbach J, Chernajovsky Y, Zeevi M, Shulman L, Soreq H, Nir U, et al. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and *Escherichia coli* cloning studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1980 Dec;77(12):7152–6.
52. Ng DPK, Nurbaya S, Ye SHJ, Krolewski AS. An IL-6 haplotype on human chromosome 7p21 confers risk for impaired renal function in type 2 diabetic patients. *Kidney Int.* 2008 Aug;74(4):521–7.
53. Souza JRM, Oliveira RT, Blotta MHSL, Coelho OR. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. *Arq Bras Cardiol.* 2008 Feb;90(2):94–9.
54. Tonet AC, Karnikowski M, Moraes CF, Gomes L, Karnikowski MGO, Córdova C, et al. Association between the -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and cardiovascular disease risk factors in Brazilian older women. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2007 Dec 17;41(1):47–53.
55. Xu WJ, Wu Q, He WN, Wang S, Zhao YL, Huang JX, et al. Interleukin-6 and pulmonary hypertension: from pathophysiology to therapy. *Front Immunol.* 2023 Jun 28;14.
56. Jafri S, Ormiston ML. Immune regulation of systemic hypertension, pulmonary arterial hypertension, and preeclampsia: shared disease mechanisms and translational opportunities. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2017 Dec 1;313(6):R693–705.
57. Dinarello C, Arend W, Sims J, Smith D, Blumberg H, O'Neill L, et al. IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol.* 2010 Nov 19;11(11):973–973.
58. Melton E, Qiu H. Interleukin-1 β in Multifactorial Hypertension: Inflammation, Vascular Smooth Muscle Cell and Extracellular Matrix Remodeling, and Non-Coding RNA Regulation. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 11;22(16):8639.
59. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2010 Feb 18;10(2):89–102.

60. Dalekos GN, Elisaf M, Bairaktari E, Tsolas O, Siamopoulos KC. Increased serum levels of interleukin-1 β in the systemic circulation of patients with essential hypertension: Additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1997 Mar;129(3):300–8.
61. Postlethwaite A, Raghov R, Stricklin G, Poppleton H, Seyer J, Kang A. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol*. 1988 Feb 1;106(2):311–8.
62. Vitale RF, Ribeiro F de AQ. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2007 Feb;73(1):123–7.
63. Crosswhite P, Chen K, Sun Z. AAV Delivery of Tumor Necrosis Factor- α Short Hairpin RNA Attenuates Cold-Induced Pulmonary Hypertension and Pulmonary Arterial Remodeling. *Hypertension*. 2014 Nov;64(5):1141–50.
64. Zhu T, Zhang W, Yin Y, Liu Y, Song P, Xu J, et al. MicroRNA-140-5p targeting tumor necrosis factor- α prevents pulmonary arterial hypertension. *J Cell Physiol*. 2019 Jun 26;234(6):9535–50.
65. Gao X, Zhang H, Belmadani S, Wu J, Xu X, Elford H, et al. Role of TNF- α -induced reactive oxygen species in endothelial dysfunction during reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008 Dec;295(6):H2242–9.
66. McLaughlin V V., Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, et al. ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association Developed in Collaboration With the American College o. *J Am Coll Cardiol [Internet]*. 2009;53(17):1573–619. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.01.004>
67. Ciências D, Paulo S. da vasculatura pulmonar em pacientes com hipertensão pulmonar hemodinâmicas Tese apresentada à Faculdade de Orientadora : 2017;
68. Fiorelli AI, De J, Oliveira L, Stolf NAG. Transplante cardíaco Cardiac transplantation. Vol. 88, *Rev Med*. 2009.
69. Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R, Russell S, Uber PA, Parameshwar J, et al. Listing Criteria for Heart Transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for the Care of Cardiac Transplant Candidates-2006. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2006 Sep;25(9):1024–42.

70. Gerges C, Gerges M, Lang MB, Zhang Y, Jakowitsch J, Probst P, et al. Diastolic pulmonary vascular pressure gradient: A predictor of prognosis in “out-of-proportion” pulmonary hypertension. *Chest*. 2013;143(3):758–66.
71. Pérez-Molina JA, Molina I. Seminar Chagas disease. *The Lancet* [Internet]. 2018;391:82–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>
72. America L. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d’hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*. 2015;90(6):33–43.
73. Cohen JE, Gürtler RE. Modeling household transmission of American trypanosomiasis. *Science* (1979). 2001;293(5530):694–8.
74. Bocchi EA, Fiorelli A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. First Guidelines Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of Cardiology. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2001;71(6):1833–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426756>
75. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: Pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(SUPPL. 1):152–8.
76. Fernanda L, Dinardi L, Palazzo JF, Vicente T, Coelho AQ, Rossener R, et al. Transplante cardíaco na doença de Chagas Heart transplantation in Chagas’ disease. 2012;91(4):229–40.
77. Pereira Nunes MDC, De Melo Barbosa M, Andrade Brum VA, Da Costa Rocha MO. Morphofunctional characteristics of the right ventricle in Chagas’ dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2004 Mar;94(1):79–85.
78. Cesar J, Sbrana N, Tsutsui JM, Terra-Filho M, Junior WM. A Ar rt ti ig go o d de e R Re ev vi is sã ã o o Papel da ecodopplercardiografia na avaliação da hipertensão arterial pulmonar* Evaluation of pulmonary hypertension with dopper echodopplercardiography.
79. Capítulo 2. 2005;31(Supl 2):31–4.
80. Chambers DC, Goldfarb S, Jr DH, Ms AYK, Rn BJL, Meiser B. US CR. *Journal of Heart and Lung Transplantation* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.healun.2018.07.022>
81. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2003 Aug;22(2):358–63.

82. Quarck R, Nawrot T, Meyns B, Delcroix M. C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Apr 7;53(14):1211–8.
83. Montani D, Perros F, Gambaryan N, Girerd B, Dorfmüller P, Price LC, et al. C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jul 1;184(1):116–23.
84. Tudor RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol*. 1994 Feb;144(2):275–85.
85. Mangini S, Alves BR, Silvestre OM, Pires PV, eira, Pires LJ, osé T, Curiati MN, ovaes C, et al. Heart transplantation: review. Vol. 13, Einstein (São Paulo, Brazil). 2015. p. 310–8.
86. Tonelli AR, Alnuaimat H, Mubarak K. Pulmonary vasodilator testing and use of calcium channel blockers in pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2010 Apr;104(4):481–96.
87. Zimpfer D, Zrunek P, Roethy W, Czerny M, Schima H, Huber L, et al. Left ventricular assist devices decrease fixed pulmonary hypertension in cardiac transplant candidates. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007 Mar;133(3):689–95.
88. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2005 Dec;18(12):1440–63.
89. Tei C, Dujardin KS, Hodge DO, Bailey KR, McGoon MD, Tajik AJ, et al. Doppler echocardiographic index for assessment of global right ventricular function. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 1996 Nov;9(6):838–47.
90. Currie PJ, Seward JB, Chan KL, Fyfe DA, Hagler DJ, Mair DD, et al. Continuous wave doppler determination of right ventricular pressure: A simultaneous Doppler-catheterization study in 127 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1985 Oct;6(4):750–6.
91. McQuillan BM, Picard MH, Leavitt M, Weyman AE. Clinical correlates and reference intervals for pulmonary artery systolic pressure among echocardiographically normal subjects. *Circulation*. 2001 Dec 4;104(23):2797–802.
92. Mogollón M V., Lage Gallé E, Hinojosa Pérez R, Herruzo Avilés A, Sobrino Márquez JM, Romero Rodríguez N, et al. Prognosis After Heart Transplant in Patients With

- Pulmonary Hypertension Secondary to Cardiopathy. *Transplant Proc.* 2008;40(9):3031–3.
93. Wan S, Marchant A, DeSmet JM, Antoine M, Zhang H, Vachieri JL, et al. Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Feb;111(2):469–77.
 94. Mangini S. Agentes infecciosos e inflamação em miocárdio de pacientes com miocardiopatia dilatada. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2013.
 95. Berman M, Ali A, Ashley E, Freed D, Clarke K, Tsui S, et al. Is stress cardiomyopathy the underlying cause of ventricular dysfunction associated with brain death? *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2010 Sep;29(9):957–65.
 96. Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL. Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2020 May 15;17(5):269–85.
 97. Marra AM, Arcopinto M, Salzano A, Bobbio E, Milano S, Misiano G, et al. Detectable interleukin-9 plasma levels are associated with impaired cardiopulmonary functional capacity and all-cause mortality in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2016 Apr;209:114–7.
 98. Van Linthout S, Tschöpe C. Inflammation – Cause or Consequence of Heart Failure or Both? *Curr Heart Fail Rep.* 2017 Aug 30;14(4):251–65.
 99. Carrillo-Salinas FJ, Ngwenyama N, Anastasiou M, Kaur K, Alcaide P. Heart Inflammation. *Am J Pathol.* 2019 Aug;189(8):1482–94.
 100. Vieira-Alves I, Alves ARP, Souza NMV, Melo TL de, Coimbra Campos LM de C, Lacerda L de SB, et al. TNF/iNOS/NO pathway mediates host susceptibility to endothelial-dependent circulatory failure and death induced by betacoronavirus infection. *Clin Sci.* 2023 Apr 13;137(7):543–59.
 101. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and Cytokine Receptors in Advanced Heart Failure. *Circulation.* 2001 Apr 24;103(16):2055–9.
 102. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmüller P, Huertas A, Montani D, et al. Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest.* 2012 Jan;141(1):210–21.
 103. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, et al. Elevated Levels of Inflammatory Cytokines Predict Survival in Idiopathic and Familial Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation.* 2010 Aug 31;122(9):920–7.
 104. Voelkel NF, Tuder RM, Bridges J, Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994 Dec;11(6):664–75.

105. Tudor RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol.* 1994 Feb;144(2):275–85.
106. Vergadi E, Chang MS, Lee C, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A, et al. Early Macrophage Recruitment and Alternative Activation Are Critical for the Later Development of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation.* 2011 May 10;123(18):1986–95.
107. Thenappan T, Goel A, Marsboom G, Fang YH, Toth PT, Zhang HJ, et al. A Central Role for CD68(+) Macrophages in Hepatopulmonary Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Apr 15;183(8):1080–91.
108. Tian W, Jiang X, Tamosiuniene R, Sung YK, Qian J, Dhillon G, et al. Blocking Macrophage Leukotriene B₄ Prevents Endothelial Injury and Reverses Pulmonary Hypertension. *Sci Transl Med.* 2013 Aug 28;5(200).
109. Xu J, Wang J, Shao C, Zeng X, Sun L, Kong H, et al. New dynamic viewing of mast cells in pulmonary arterial hypertension (PAH): contributors or outsiders to cardiovascular remodeling. *J Thorac Dis.* 2018 May;10(5):3016–26.
110. Pinto RFA. “Avaliação imunohistoquímica das células inflamatórias presentes na parede de artérias pulmonares periféricas de pacientes com doença vaso-oclusiva pulmonar secundária a defeitos cardíacos congênitos.” [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2004.
111. Baroldi G, Di Pasquale G, Silver MD, Pinelli G, Lusa AM, Fineschi V. Type and extent of myocardial injury related to brain damage and its significance in heart transplantation: a morphometric study. *J Heart Lung Transplant.* 1997 Oct;16(10):994–1000.
112. Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, Tjandra-Maga TB, Borgers M, Plets C, et al. Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circulation.* 1993 Jan;87(1):230–9.
113. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018 Dec 18;18(12):733–44.
114. Silvestre-Roig C, Braster Q, Ortega-Gomez A, Soehnlein O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol.* 2020 Jun 29;17(6):327–40.
115. Maas SL, Soehnlein O, Viola JR. Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta. *Front Immunol.* 2018 Nov 27;9.
116. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology.* 2018 Jun 8;154(2):186–95.

Apêndice:**Tabela 1.** Medicamentos utilizados pelos pacientes receptores (transplantados cardíacos) do HC-UFMG.

Medicamentos	Receptor (n = 25)
BRA	3
IECA	7
Entresto	6
Betabloqueador	22
Espironolactona	22
Hidroclorotiazida	6
Digoxina	9
Dapagliflozina	6
Anticoagulante	15

ANEXOS:**FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação de biomarcadores inflamatórios e expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias de vasos pulmonares de transplantados cardíacos chagásicos e não chagásicos

Pesquisador: Claudio Léo Gelape

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39274420.0.0000.5149

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.488.855

Apresentação do Projeto:

O transplante cardíaco (TC) é opção terapêutica considerada em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) avançada e refratária ao tratamento otimizado, de acordo com diretrizes nacionais e internacionais. A IC é uma doença progressiva que afeta milhões de pessoas. O paciente com IC avançada frequentemente desenvolve hipertensão arterial pulmonar (HAP) por mecanismo retrógrado. Em relação à HAP, reconhece-se que a inflamação é um aspecto importante e que células T, B, mastócitos, macrófagos e células dendríticas participam do processo. Parece haver um insulto inicial do endotélio que leva à propagação de um processo inflamatório com a produção de citocinas e quimiocinas, levando à produção de fatores de crescimento, culminando em remodelamento vascular. A HAP é fator de alto risco de falência do enxerto no pós-operatório imediato pela dificuldade que o ventrículo direito do enxerto pode apresentar na adaptação frente ao novo território vascular. Acredita-se, baseado em observações práticas, que pacientes cardiopatas chagásicos apresentem menores níveis de pressão pulmonar em comparação com pacientes cardiopatas de outras etiologias. A função do ventrículo direito frequentemente comprometida nos pacientes em classe funcional IV é muito dependente da pós-carga e não apenas da sua própria contratilidade.

Historicamente, somente o cateterismo cardíaco possibilitava a aferição adequada das pressões no interior da artéria pulmonar enquanto, que os métodos não invasivos demonstravam pouca

FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS 
--

Continuação do Parecer: 4.493.055

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1525559.pdf	16/12/2020 11:43:21		Aceito
Declaração de Manipulação de Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMO.pdf	16/12/2020 11:43:02	MARCUS VINICIUS DE PAULA DA SILVA	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_PEDENCIAS.pdf	16/12/2020 11:34:38	MARCUS VINICIUS DE PAULA DA	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	TCUD.pdf	16/10/2020 16:45:30	MARCUS VINICIUS DE PAULA DA	Aceito
Outros	parecergerenciaensinoepesquisa.pdf	08/10/2020 16:44:36	MARCUS VINICIUS DE PAULA DA	Aceito
Outros	parecereconomico.pdf	08/10/2020 16:42:40	MARCUS VINICIUS DE PAULA DA	Aceito
Outros	camaradepartamental.pdf	08/10/2020 16:39:21	MARCUS VINICIUS DE PAULA DA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PLATAFORMA.pdf	08/10/2020 16:38:22	MARCUS VINICIUS DE PAULA DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	08/10/2020 16:37:09	MARCUS VINICIUS DE PAULA DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhoderosto.pdf	08/10/2020 16:33:58	MARCUS VINICIUS DE PAULA DA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 04 de Janeiro de 2021

Assinado por:
Crisleia Caren Palva Fontalnia
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/N 2005 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901 UF: MG Município: BELO HORIZONTE Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DE VASOS PULMONARES DE TRANSPLANTADOS CARDÍACOS CHAGÁSICOS E NÃO CHAGÁSICOS ”**. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano “sobras da cirurgia de transplante cardíaco “. Deixamos claro que o material que utilizaremos é de descarte, ou seja, fragmentos dos átrios direito e esquerdo, dos ventrículos direito e esquerdo e das artérias e veias pulmonares que sobra da cirurgia de transplante cardíaco ao qual você irá se submeter. Desta forma você irá contribuir para este estudo concordando em doar este material para que a pesquisa seja feita. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos estudar a causa de hipertensão pulmonar no paciente cardiopata submetido a transplante cardíaco. Estes vasos podem nos dar uma noção do mecanismo patológico do desenvolvimento da hipertensão pulmonar em pacientes cardiopatas submetidos ao transplante cardíaco. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos:

Durante a cirurgia, após a retirada do coração que será descartado, fragmentos dos átrios direito e esquerdo, dos ventrículos direito e esquerdo e das artérias e veias pulmonares (aproximadamente 2 cm) serão dissecados deste coração e levadas para o laboratório de fisiologia e farmacologia cardiovascular, juntamente com uma amostra de 2 ml de se sangue para estudos bioquímicos que ajudam a entender o seu funcionamento. Após a utilização deste material, as sobras serão armazenadas congeladas para possíveis futuros experimentos ou descartadas seguindo as regras para descarte de material biológico. Este procedimento acarreta o risco de perda da confidencialidade de dados referentes a sua saúde. No entanto, para minimizar este risco, seus dados não serão divulgados e apenas os pesquisadores envolvidos no projeto terão acesso ao material biológico derivado da sua cirurgia. Esta pesquisa não te trará nenhum benefício direto e não influenciará em seu tratamento.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização.

O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no laboratório de fisiologia cardiovascular do Instituto de Ciencias Biológicas da UFMG, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) a 10 (dez) anos na sala 184/ bloco 4 do Instituto de Ciencias Biológicas da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa **“AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DE VASOS PULMONARES DE TRANSPLANTADOS CARDÍACOS CHAGÁSICOS E NÃO CHAGÁSICOS”**. de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante

Data

Assinatura do participante

Nome completo do Pesquisador Responsável: Claudio Léo Gelape

Endereço: Rua Bernardo Guimarães, número 310, apartamento 310. Funcionários .

CEP: 30140080 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 996873071

E-mail: clgelape@uol.com.br

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Nome completo do Pesquisador: Marcus Vinícius de Paula da Silva

Endereço: Rua Afonso Pena, número 210, sala 321. Centro.

CEP: 36400062 / Conselheiro Lafaiete – MG

Telefones: (31) 37212833

E-mail: marcus@cardiol.br

Assinatura do pesquisador (doutorando)

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.