

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RICARDO WANG

TERAPIA DE INDUÇÃO COM BASILIXIMAB E A PROGRESSÃO DA  
VASCULOPATIA DO ENXERTO EM PACIENTES SUBMETIDOS A  
TRANSPLANTE CARDÍACO.

CURITIBA  
2013

**RICARDO WANG**

**TERAPIA DE INDUÇÃO COM BASILIXIMAB E CRESCIMENTO DA  
VASCULOPATIA DO ENXERTO EM PACIENTES SUBMETIDOS A  
TRANSPLANTE CARDÍACO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. José Rocha Faria Neto

Curitiba  
2013

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central

W246t	Wang, Ricardo
2013	Terapia de indução com Basiliximab e crescimento da vasculopatia do enxerto em pacientes submetidos a transplante cardíaco / Ricardo Wang; orientador, José Rocha Faria Neto. – 2013. 55 f. : il. ; 30 cm
	Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2013 Bibliografia: f. 48-53 Texto em português e inglês
	1. Vasos sanguíneos - Doenças. 2. Transplante de coração - Pacientes. 3. Rejeição de enxertos. I. Faria Neto, José Rocha. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.
	CDD 20. ed. – 616.13



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - *Stricto Sensu*

**PUCPR**  
GRUPO MARISTA

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos trinta dias do mês de julho de 2013, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação "TERAPIA DE INDUÇÃO COM BASILIXIMAB E A PROGRESSÃO DA VASCULOPATIA DO ENXERTO EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE CARDÍACO" apresentada por RICARDO WANG para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. José Rocha Faria Neto PUCPR – Presidente	
Prof. Dr. Emilton Lima Junior PUCPR	
Profª. Drª. Sílvia Moreira Ayub Ferreira INCOR	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. José Rocha Faria Neto

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Emilton Lima Junior

Conceito: Aprovado

Profª. Drª. Sílvia Moreira Ayub Ferreira

Conceito: APROVADO

Conceito Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. José Rocha Faria Neto  
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho  
Coordenador do PPGCS PUCPR

*Dedicatória:*

Dedico aos meus pais, Wang e Mardiana, que estiveram e estão comigo, graças a sua dedicação e a insistência, em que eu faça os trabalhos escolares, estou aqui, sem eles todo este trabalho não seria possível.

A Arlete que graças ao seu amor e sua paciência comigo, me permite tranquilidade para realizar os meus projetos, além do seu apoio nos momentos difíceis na minha caminhada.

Por fim não posso deixar de mencionar Lara e William, que também foram frutos durante o mestrado, por darem novo sentido para a vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço toda a equipe do transplante cardíaco da Santa Casa de Curitiba, as secretarias Josi e Mara, Equipe da Cirurgia Cardíaca do Dr. Francisco Costa, Dr. Sérgio Veiga. Não poderia deixar de mencionar nossa colega e amiga de vários momentos difíceis e chefe da parte clínica do Transplante Cardíaco Dra. Lídia Zytynski Moura.

Dr. José Rocha Faria, mais um grande mestre na minha formação, que me ajudou com seu brilhantismo, a entender um esta coisa chamada ciência, não tenho como agradecer o seu convívio nestes tempos de altos e baixos no mestrado, na vida pessoal e profissional.

Não poderia deixar de mencionar os pacientes que colaboraram para este trabalho, que no final é para eles que estes resultados interessam.

## RESUMO

**Introdução:** A doença vascular do enxerto (DVE) é um grande limitante da evolução a longo prazo do transplante cardíaco (TxC). O processo inflamatório é um dos responsáveis pelo aparecimento da DVE, e vários esquemas de imunossupressão estão associados com sua redução. Neste estudo avaliamos a relação entre terapia de indução com basiliximab e o crescimento intimal no primeiro ano após o transplante cardíaco avaliado por ultrassom intracoronário.

**Métodos:** Foram avaliados retrospectivamente pacientes submetidos a TxC em um único centro, de 2007 a 2009. Os pacientes foram submetidos a avaliações com ultrassom intracoronário (IVUS) nos primeiros 30 dias (basal) e 1 ano pós TxC. O volume do vaso (delimitado pela lâmina elástica externa), da camada íntima e o lúmen foram medidos e comparados entres dois grupos: pacientes que receberam terapia de indução com basiliximab e pacientes com tratamento convencional (grupo controle). **Resultados:** Foram incluídos 13 pacientes, 7 no grupo basiliximab e 6 controles. Na avaliação ao IVUS, o grupo controle apresentou maior crescimento volumétrico do vaso (131,32 para 127,77mm<sup>3</sup> grupo 1, 120 para 185,43mm<sup>3</sup> grupo 2, p=0,051). O crescimento da camada íntima (DVE) também foi maior no grupo controle: 20,23 para 26,69mm<sup>3</sup> ( $\Delta$  33%) no grupo basiliximab e 27,30 para 49,15mm<sup>3</sup> ( $\Delta$  80%) no grupo controle; p=0,015. Na regressão univariada o volume da placa prévia (aterosclerose do doador) não teve relação com o crescimento da íntima (r=0,15, p=0,96), já o remodelamento positivo do vaso foi diretamente proporcional ao crescimento volumétrico da íntima (r=0,85, p<0,001). **Conclusão:** O uso rotineiro da terapia de indução com basiliximab esteve associado com redução do crescimento da camada íntima no primeiro ano pós transplante cardíaco.

## Abstract

**Introduction:** Cardiac allograft vasculopathy (CAV) is a major limitation of long-term survival of patients undergoing cardiac transplantation (HT). Some immunosuppressants reduce the appearance of CAV. This study evaluated the impact of induction therapy with Basiliximab on the onset of CAV

**Objectives:** The primary objective was to evaluate the variation of the volumetric growth of the intimal layer measured by intracoronary ultrasound (IVUS) after one year; the group that received basiliximab was compared to a control group. The secondary objective was to evaluate the remodeling of the vessel lumen volume.

**Methods:** Patients were included from 2007 through 2009, retrospectively in a single center. Evaluations were performed with IVUS, measuring the volume of a coronary segment within the first 30 days and 1 year after HT. The volume measurement was calculated via the following parameters: vessel volume (bounded by external elastic lamina), intimal and lumen. Vasculopathy was characterized by the volume of the intima of the vessel. **Results:** 13 patients were included (7 in group basiliximab and 6 in control). With IVUS assessment, the control group was found to have greater vessel volume (131.32 to 127.77 mm<sup>3</sup> x 120 to 185.43 mm<sup>3</sup>;  $P = 0.051$ ). The growth of the intimal layer (graft vascular disease) was also higher in control group (Basiliximab: 20.23 to 26.69 mm<sup>3</sup> ( $\Delta$  33%) Control: 27.30 to 49.15 mm<sup>3</sup> ( $\Delta$  80%);  $P = 0.015$ ). With univariate regression, plaque volume, prior atherosclerosis of the donor was not related to the growth of the intima ( $r = 0.15$ ;  $P = 0.96$ ), whereas the positive remodeling was directly proportional to volumetric growth of the intima ( $r = 0.85$ ;  $P < 0.001$ ). **Conclusion:** Routine Induction therapy with basiliximab was associated with reduced growth of the intima of the vessel the first year after cardiac transplantation.

## **ABREVIATÓES**

APC – células apresentadoras de antígeno  
CDCV – Centro de Diagnose Cardiovascular  
CEPH – comitê de ética em pesquisa com humanos  
CMV - citomegalovírus  
DVE – doença vascular do enxerto  
EEM – membrana elástica externa  
ICC – insuficiência cardíaca congestiva  
IL-2 – interleucina 2  
INF $\gamma$  - interferon- $\gamma$   
IVUS – ultrassom intracoronário  
HAS – hipertensão arterial sistêmica  
HLA – antígeno leucocitário humano  
LT – linfócito T  
LTC – linfócito T citotóxico  
MHC – complexo de histocompatibilidade maior  
OKT3 - Muronab  
TC – transplante cardíaco

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3. SUPLEMENTO.....	26
3.1. Artigo.....	26
3.2. Abstract.....	26
3.3. Introduction.....	28
3.4. Methods.....	28
3.5. Results.....	31
3.6. Discussion.....	35
3.7. Conclusion.....	37
3.8. Reference.....	37
3.9. Metodologia suplemento.....	41
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
5. CONCLUSÃO.....	48
6. REFERÊNCIAS.....	49
7. Anexo 1: PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome caracterizada pelo fornecimento inadequado de suprimento sanguíneo para atender as necessidades metabólicas, e é considerada a via final de várias doenças que acometem o músculo cardíaco[1]. Dentre as principais etiologias, destacamos a doença isquêmica do miocárdio como responsável pela maioria dos pacientes com ICC nos Estados Unidos (EUA). Devido à dieta inadequada rica em lípidos, associada aos hábitos de vida sedentários, ao aumento alarmante da incidência de diabetes mellitus, além de fatores ambientais, como exemplo a poluição, a prevalência da doença isquêmica miocárdica tende a aumentar exponencialmente, com aumento da incidência de IC para as próximas décadas[2].

Estima-se que no mundo cerca de 23 milhões de pessoas são portadoras de IC [3]. Nos EUA a prevalência é de em torno de 4,7 milhões e a cada ano são acrescidos em torno de 550.000 novos casos de ICC. Na faixa etária acima dos 65 anos é a principal causa de internação hospitalar[4]. A magnitude do problema tende a aumentar, já que a população vem envelhecendo em todo o mundo. Dados brasileiros mostram que a IC é a principal causa de internação cardiovascular, sendo responsável por aproximadamente 3% de todas as internações no ano de 2007, e responsável por 6% de todos os óbitos registrados no Brasil[1].

Nos pacientes com insuficiência cardíaca avançada o melhor tratamento ainda constitui na substituição do órgão, por um heteroenxerto (transplante cardíaco). Inicialmente o paciente experimenta uma expressiva melhora sintomática da IC. No entanto, existem as complicações inerentes ao Tx, tais como rejeição ao enxerto, problemas relacionados com a imunossupressão: infecção, alterações metabólicas, neoplasia. Dentre estas complicações a vasculopatia constitui causa importante de morbidade e mortalidade tardia, e é umas dos motivos de necessidade de retransplante. Medidas que reduzam ou retardem o seu aparecimento podem se traduzir em aumento de sobrevida após o Tx.

O basiliximab é atualmente a droga mais utilizada para terapia de indução no Tx, com a finalidade de reduzir complicações tais como: rejeição aguda que é

mais comum no primeiros meses pós Tx, e ajudar na prevenção da injúria renal, por propiciar um retardo na introdução dos inibidores de calcineurina (droga nefrotóxica). Este estudo tem como objetivo avaliar se esta terapia de indução teria impacto no crescimento da intima do vaso que é responsável pela vasculopatia do enxerto.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 HISTÓRIA NATURAL DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA**

A IC como via final de várias doenças que acometem o músculo cardíaco, dentre as causas, as mais que se destacam: aterosclerose com doença miocárdica isquêmica, doença valvar cardíaca, doença de chagas, miocardites. Como consequência da lesão dos miócitos, há substituição das fibras musculares por tecido fibrótico, conseqüente redução da massa contrátil do ventrículo esquerdo. Na fase inicial, os mecanismos compensatórios mantêm a homeostase e o débito cardíaco adequados. Com a progressão da doença, estes mecanismos não conseguem manter adequadamente o funcionamento do sistema cardiovascular, e a partir desse momento os sintomas da ICC se manifestam.

Os sintomas são principalmente relacionados à congestão ou a débito cardíaco inadequado. O primeiro é manifestado principalmente com sinais de hipervolemia, edema, anasarca e congestão pulmonar. E o segundo se manifesta principalmente por fadiga e baixa capacidade física. O tratamento da IC visa principalmente o alívio dos sintomas com uso de diuréticos, e medicamentos que aumentam a sobrevida e melhorar o remodelamento ventricular tais como: beta-bloqueadores[5, 6], inibidores da enzima conversora de angiotensina[7, 8] e bloqueadores de aldosterona[1, 9].

Como a IC é doença progressiva, 1-5% dos portadores de ICC apresentam quadro de ICC refratária[4]. Este grupo apresenta maiores taxas de reinternações e maior mortalidade. O transplante cardíaco é o tratamento de eleição para pacientes nesta fase da doença[1].

## 2.2 TRANSPLANTE CARDÍACO

O transplante cardíaco (TC) é a medida extrema para o tratamento da ICC, reservado somente para ICC refratária. Após o TC, os pacientes experimentam melhora importante na qualidade de vida[10], além do aumento da sobrevida[11].

O primeiro transplante cardíaco foi realizado na Cidade do Cabo, África do Sul, em 3 de dezembro de 1967, cirurgia conduzida pelo Dr. Christiaan Barnard [12]. Apesar do paciente ter sobrevivido apenas 12 dias pós transplante, este procedimento teve grande repercussão não somente na comunidade médica, assim como na mídia popular. Dr. Barnard demonstrou ser factível a realização do procedimento cirúrgico, e rapidamente vários centros começaram a realizar seus programas de transplante cardíaco. Devido aos resultados iniciais ruins, no início da década de 70 poucos centros realizavam tal procedimento. Houve ressurgimento do transplante cardíaco no início da década de 80 devido ao advento da ciclosporina e uso de biopsias endomiocárdicas para detecção de rejeição, possibilitando expectativa de sobrevida maior de 60% após um ano[12].

Apesar do aumento da sobrevida, o procedimento está longe de ser o ideal. Paralelamente à melhora clínica os pacientes, estes estão expostos a possíveis complicações precoces tais como rejeição aguda e infecção por microrganismos oportunistas, esta em virtude da imunossupressão. A longo prazo, a neoplasia e a doença vascular do enxerto (DVE) são as principais complicações. Este última, motivo desta tese, é uma das principais complicações tardias, apesar de ser extensamente estudada, ainda sabemos muito pouco tanto no que concerne a sua gênese, desenvolvimento assim como sua prevenção e tratamento, deste modo a DVE ainda é responsável por grande parte dos óbitos após o primeiro ano de transplante[11, 13].

### 2.2.1 Imunologia do transplante

Os resultados frustrantes dos primeiros transplantes foram devidos ao pouco ou nenhum conhecimento dos aspectos imunológicos envolvidos [12]. Somente após experimentos com transplante de pele em camundongos os mecanismos de rejeição ao enxerto começaram a ser entendidos, em especial o sistema imunológico adaptativo[14]. A partir do conhecimento e desenvolvimento de medicamentos que bloqueiam o sistema imune com maior eficácia, houve aumento de sobrevivência do enxerto e do hospedeiro, dando novo impulso ao transplante. Discutiremos brevemente os mecanismos envolvidos na rejeição do enxerto, e no tópico DVE serão discutidos aspectos específicos relacionados à gênese da vasculopatia.

#### 2.2.1.1 Antígeno Leucocitário Humano

Antígeno Leucocitário Humano (HLA) ou também denominado de Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) são glicoproteínas de superfície celular polimórficas, divididos em classe I e II. O primeiro se subdivide em HLA-A, B e C e o segundo em HLA-DP, DQ e DR. São considerados estruturas chaves no reconhecimento do aloenxerto pelos linfócitos T [15].

As moléculas MHC são proteínas de membrana que contém uma fenda onde se ligam proteínas a serem apresentadas aos linfócitos[16]. Estruturalmente as moléculas classe I são compostas por uma cadeia  $\alpha$  ligada de maneira não covalente a uma proteína chamada  $\beta_2$ -microglobulina. Entre os domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  se localiza a fenda, e o assoalho desta se liga ao peptídeo, apresentando-a ao linfócito, enquanto as laterais e a porção superior da fenda se ligam a receptor linfocitário (CD8). As variações polimórficas (que determinam a individualidade) localizam-se nos domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ .

A molécula da classe II é composta de duas cadeias,  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  e contém também resíduos polimórficos e formam uma fenda maior. O domínio  $\beta_2$  não polimórfico, contém o ponte de ligação ao receptor CD4 da célula T[16].

A expressão dos genes para MHC são codominantes, e a maioria dos humanos expressa seis diferentes moléculas de cada classe[15, 16]. Os genes

são altamente polimórficos, e é de tal magnitude, que dois indivíduos na população em geral não apresentam o mesmo conjunto de genes e moléculas do MHC. Este polimorfismo, apesar de complicador para a compatibilidade doador-receptor, é importante na preservação da espécie, pois não permite que somente um patógeno sucumba toda a população[15].

As moléculas MHC classe I podem ser expressas por todas as células do organismo, fato que não ocorre com as moléculas classe II. Estas estão restritas a células que processam os antígenos, tais como macrófagos/monócitos, células dendríticas e células B. A expressão das duas classes podem ser influenciadas por citocinas, neste caso, granulócitos, fibroblastos, e células T também podem expressar MHC classe II [17].

A MHC classe I está associada à apresentação de peptídeos oriundos da degradação de proteínas produzidas no citosol. Este mecanismo permite identificar proteínas virais e células tumorais pelo sistema imunológico (via endógena) [18].

Na MHC classe II, as proteínas apresentadas são originárias de fora da célula. Estas são fagocitadas por células apresentadoras de antígeno (APC), internalizadas em forma de vesículas, onde sofrem processo de degradação em peptídeos de 13 a 18 aminoácidos. Enquanto isso, no retículo endoplasmático ocorre a síntese do MHC classe II, através de várias etapas que envolvem a degradação da cadeia invariante, e com o auxílio do HLA-DM, ocorre o acoplamento do peptídeo exógeno com MHC e, posteriormente, este conjunto é transportado para a superfície para ser apresentado aos linfócitos (via exógena). Esta é a principal via de processamento e apresentação de aloantígenos no transplante cardíaco[17].

#### 2.2.1.2 Apresentação dos epítopes no transplante cardíaco

Existem duas formas de processamento de antígenos: a via direta e a via indireta.

#### Via direta

Nesta forma a célula T do receptor interage diretamente com o receptor MHC das APC do doador. O polimorfismo dos receptores MHC de um modo geral não altera sua estrutura tridimensional[17], não impedindo que o MHC do doador interaja com receptor do doador, sendo exemplo de ligação cruzada [16]. Na via direta o aloreconhecimento pode ser tanto pelos linfócitos CD4+ assim como CD8+, já que os epítopes podem ser apresentados tanto pela classe I, como classe II, levando a ativação subsequente da fase efetora da rejeição.

#### Via indireta

Nesta via as moléculas MHC são apresentadas pelas células APC do recipiente para a célula T (via exógena). Os epítopes são apresentados por moléculas classe II, com consequente ativação das células CD4+ [17].

#### 2.2.1.3 Coestimuladores

Para o reconhecimento dos linfócitos, além da sinalização através do complexo MHC, é necessário também a participação de coestimuladores, como exemplo moléculas B7.1 e B7.2 nas células APC ligando à molécula CD28 do linfócito. A ausência destes coestimuladores está associada com redução ou até mesmo ausência da resposta imune. No coração transplantado apresenta maior expressão destes coestimuladores, mesmo na ausência de patógenos, provavelmente secundário ao processo de isquemia e reperfusão [14, 19].

#### 2.2.1.4 Linfócito T

Após o reconhecimento do aloenxerto, inicia-se a ativação dos linfócitos. A resposta dos linfócitos T e B são similares a resposta convencional a antígenos proteicos. Os epítopes reconhecidos são levados ao tecido linfóide mais próximo, onde são apresentados aos linfócitos imaturos, que iniciam processo de

proliferação clonal e diferenciação em células efetoras (processo de sensibilização).

As moléculas MHC classe I e II estimulam linfócitos CD8 e CD4 respectivamente. As células T CD8 aloreativas se diferenciam em linfócitos T citotóxicas (LTC), na qual matam células nucleadas do enxerto que expressam moléculas MHC classe I alogênica, enquanto as células CD4 T helper diferenciam em células efetoras produtoras de citocinas que causam dano ao enxerto mediado por inflamação mediado por citocinas, similar a reação de hipersensibilidade do tipo tardio[14]. Desta forma, a via de apresentação direta permite principalmente a resposta celular via LTC, enquanto a via indireta (via células T helper) pode gerar resposta tanto celular assim como via humoral.

### **2.2.2. Vasculopatia do enxerto**

O primeiro TC realizado por Christiaan Barnard foi no Sr. Louis Washkasky, que sobreviver por somente 18 dias devido a rejeição aguda. O segundo transplante foi realizado no Sr. Philip Blaiberg em 02 de janeiro de 1968, sobreviveu por dezenove meses e quinze dias, vindo a falecer em 17 de agosto de 1969. Na necropsia realizada por Thompson, este descreveu lesão ateromatosa uniforme, difusa e amarela, sendo o primeiro caso descrito de DVE no transplante cardíaco. Thompson comentou que nenhum ateroma tinha tanta intensidade e distribuição tão difusa que ele tenha visto nos seus 40 anos de patologista. Pouco tempo depois, na Universidade Stanford, foi descrito primeiro caso de infarto agudo do miocárdio pós transplante cardíaco secundário a DVE [20].

A DVE recebe várias outras demoninações, como arteriopatia do aloenxerto, arteriosclerose acelerada, rejeição crônica e arteriosclerose associada ao transplante. DVE é caracterizada por processo difuso de obliteração da lúmen do vaso, proliferação de células musculares lisas, associado com infiltrado de macrófagos com lípidos intra e extracelular, colágeno e glicosaminoglicano [11, 13, 21]. Estima-se que em 5 anos 40 a 50% dos pacientes tenham DVE em estágio mais avançado. Este processo de obliteração do vaso acarreta

comprometimento do suprimento de sangue para as fibras miocárdicas. Devido à denervação do coração transplantado, em geral os pacientes são pouco sintomáticos, ou assintomáticos, e a morte súbita pode ser a primeira manifestação clínica[11].

O diagnóstico precoce permite ajuste no tratamento visando não somente na prevenção como desacelerar a progressão da DVE. Dentre as medicações com comprovada eficácia estão uso de estatinas[22, 23] e inibidores da enzima conversora de angiotensina[13, 24]. A mudança de imunossuppressores para micofenolato de mofetil e inibidores da mammalian target of rapamicyn (mTOR) (Sirolimus/Everolimus) também demonstraram redução na obstrução coronariana[13, 25-28].

#### 2.2.2.1 Patologia

A aterosclerose e a DVE guardam algumas semelhanças: são patologias que acarretam isquemia miocárdica e apresentam algumas semelhanças em sua fisiopatologia. Assim como no modelo de aterosclerose, a DVE provavelmente pode ser resposta a uma injúria inicial, que pode ser de natureza imunológica ou não. Neste modelo, uma injúria endotelial ou perivascular de baixo grau induz uma resposta tipo hipersensibilidade tardia ineficaz, com dano vascular permanente [20, 29]. Devido ao aspecto imunológico do aloenxerto, a resposta imunológica é mais intensa e difusa do que na aterosclerose. Os achados patológicos corroboram com essa teoria, a infiltração inflamatória é composta principalmente de linfócitos T e B, células natural killer e macrófagos [29].

Os achados da DVE consistem de espessamento intimal concêntrico que acomete as coronárias difusamente, tanto no trajeto epicárdico assim como intramural e microcirculação, sem acometimento da camada média. A lesão é proliferativa, e constituída principalmente por células musculares lisas, macrófagos, colágeno, glicosaminoglicanos e colesterol. Necrose, calcificação e colesterol não são proeminentes nas fases iniciais da doença, no entanto com a evolução ela pode adquirir características que lembram placa ateromatosa [21].

Além da proliferação intimal a oclusão também pode ser ocasionada pela trombose da placa[20].

A lesão miocárdica inclui miocitose, vacuolização subendocárdica, indicando lesão subletal e necrose coagulativa e fibrose. Microinfartos são característicos de DVE, e são devidos ao acometimento da microcirculação [21]. Microinfartos que podem ser responsáveis por disfunção do enxerto, mesmo com coronariografia normal.

O acometimento do sistema venoso é característico da DVE, em geral observa-se modesto espessamento intimal, que é também observado nas veias intramiocárdicas[20].

#### 2.2.2.2 Fatores de risco

##### 2.2.2.2.1 Mecanismo não imunológicos

Fatores não imunológicos (FNI) foram associados a DVE dentre elas: sexo feminino, idade > 40 anos do doador, doença aterosclerótica previa do enxerto, hipertensão, diabetes mellitus, infecção por citomegalovírus, injúria de isquemia e reperfusão do coração. FNI não apresentam a mesma importância na gênese da DVE, como exercem na doença aterosclerótica (Figura 1 e 2).

Fatores de risco clássicos para doença arterial coronariana são também para DVE, apesar da associação não ser tão evidente como na população geral, fato que pode ser explicado devido ao tratamento agressivo no pós transplante mascarando a associação [30].

A hipertensão arterial (HAS) é comum em pacientes pré e pós-transplante, podendo ser agravada pelos imunossupressores, como a ciclosporina e corticoide, e também devido à denervação dos receptores de volume cardíaco [30]. Radovancevic e colaboradores realizaram análise retrospectiva em 210 pós transplantados, e encontraram maior incidência de HAS no grupo que apresentou DVE [31], resultados que contrastam com os achados de Kobashigawa e Caforio

[32, 33]. Porém independentemente dos achados conflitantes, não se questiona a validade de tratar agressivamente a pressão arterial no pós transplantado.

O papel da dislipidemia tem sido motivo de controvérsias. Análises epidemiológicas são conflitantes quanto o seu impacto no desenvolvimento da aterosclerose no paciente transplantado[31, 34]. Vale ressaltar o estudo conduzido por Kobashigawa e colaboradores, no qual randomizou pacientes pós transplantados para tratamento com pravastatina ou placebo logo após o transplante, que demonstrou que além de diminuir a incidência de vasculopatia (6,3% na pravastatina versus 20% no controle), aumentava a sobrevida e diminuía a incidência de rejeição com comprometimento hemodinâmico [35]. Interessante neste estudo foi que análise comparando os níveis de colesterol com a intensidade da vasculopatia não apresentou correlação, e o autor sugere que provavelmente o papel anti-inflamatório da estatina tenha sido o responsável pelos resultados, e não a redução dos nível de colesterol.

Em decorrência da imunossupressão, a infecção por citomegalovírus (CMV) é uma patologia que preocupa no paciente submetido a transplante de órgãos sólidos. A incidência e mortalidade vêm declinando com a profilaxia e uso de ganciclovir[20]. Koskinen e colaboradores demonstraram que pacientes com maior lesão intimal, avaliado através de coronariografia seriada e biópsia, apresentaram infecções por CMV [36]. Este vírus tem característica de infectar células endoteliais e macrófagos, e ativar o sistema inflamatório com indução de aumento de produção de citocinas. A infecção por CMV *per si* parece não ser capaz de induzir DVE, e sim potencializar a resposta inflamatória que resultaria na proliferação da íntima, como demonstrado em modelo animal, na qual isoenxerto não apresentam DVE após infecção por CMV [37].

A alta incidência de diabetes mellitus, em torno de 15 a 20%, pós-transplante é multifatorial, e apresenta forte relação com o esquema de imunossupressão, em particular os inibidores de calcineurina e corticoides [30]. Tanto a hiperglicemia, quanto a concentração de insulina, demonstraram em um estudo que acompanhou 66 pacientes por 05 a 08 anos e com realização de IVUS seriado, a associação com pior sobrevida ( $60 \pm 12\%$  x  $92 \pm 5\%$  para glicemia

<9mmol/L e > 8.9mmol/L respectivamente,  $p<0,005$ ) e maior proliferação intimal ( $0,38\pm 0,05$  versus  $0,22\pm 0,22$ mm  $p<0,05$ ) [38]. A diabetes além das alterações glicêmicas, altera também o perfil lipídico, aumentando os triglicérides e VLDL, e diminuindo o HDL que, conforme discutido anteriormente, também estão associados com desenvolvimento de DVE.

Na avaliação com ultrassom intracoronário (IVUS), observam-se dois picos de proliferação intimal [39]: a primeiro com aproximadamente 01 ano, placa mais fibrótica, e a segunda, mais tardia, placa com aspecto parecido com aterosclerose coronariana, com conteúdo núcleo necrótico de colesterol [40]. Schmid e colaboradores demonstraram em modelos de retransplante cardíaco em camundongos singênicos, que mecanismo imunológicos iniciais são importantes para o início da DVE, apesar da eliminação do fator imunológico após o retransplante, a DVE continuava progredindo, demonstrando que fatores não imunológicos são importantes na perpetuação da proliferação intimal.

#### 2.2.2.2.1.2. Isquemia e injúria de reperfusão

A isquemia miocárdica não se refere somente ao tempo de isquemia, que começa com a retirada do órgão até o seu implante no doador, mas também deve-se levar em conta o status hemodinâmico do doador pretransplante, o uso de inotrópicos no doador, a qualidade de preservação do órgão e finalmente a injúria que pode ocorrer durante a reperfusão do órgão [41].

Gaudin e colaboradores realizaram análise retrospectiva de 50 pacientes, a presença de isquemia de reperfusão, avaliado através de biopsia endomiocárdica, esteve associada na análise multivariada com desenvolvimento de vasculopatia a longo prazo (risco relativo (RR) de 2,6, intervalo de confiança de 1.2 a 5.8,  $p=0,02$ ) [42]. O seu mecanismo ainda persiste controverso, e a isquemia per se poderia explicar o desenvolvimento de DVE em modelos singênicos [43].

Shoskes e colaboradores demonstraram em modelo renal em camundongos, que o clampe unilateral da artéria renal acarretava aumento da expressão de HLA no órgão isquêmico, na classe I e classe II: de 3 a 6 e 1,5 a 3

vezes na expressão respectivamente[44]. Além disso, após isquemia observam-se aumento da liberação de citocinas inflamatórias [45] que levariam a aumento da rejeição humoral e celular [41], e também associado a longo prazo com desenvolvimento da DVE [46]

### 2.2.2.3. Fatores imunológicos

O comprometimento da Aorta do doador pela DVE até o nível da sutura, sem comprometimento da Aorta do receptor, sugere que o desenvolvimento da DVE está fortemente ligado ao aspecto imunológico[20]. O provável mecanismo fisiopatológico se assemelha ao modelo de aterosclerose [29].

A infiltração dos linfócitos T em estágios iniciais sugere que estas células interagem com células endoteliais danificadas e mantem o processo inflamatório crônico[47, 48]. Além disso estudos em animais demonstram que camundongos com deficiência de linfócito T não apresentam DVE[49-51]. Os LT CD4, interleucina 2, interferon  $\gamma$  desempenham papel fundamental na fisiopatologia da DVE [51, 52].

A primeira etapa é reconhecimento do aloenxerto via MHC classe II. Os antígenos são processados nas APC (ex: macrófagos, células dendríticas) para o linfócito T, inicia a ativação do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), MAP e via calcineurina no citoplasma, promovendo a transcrição gênica, com produção de interleucina 2 (IL-2) e de moléculas que promovem inflamação[47]. A IL-2 começa a ser secretada pelos linfócitos a partir de 1 hora após estímulo inicial. Os linfócitos ativados também aumentam a capacidade de ligação a IL-2, com a produção da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2, tornando-a ativa (R IL-2A). A IL-2 produzida liga-se preferencialmente à mesma célula T que a produziu e atua sobre ela. A principal ação da IL-2 é estimular a proliferação clonal de células específicas para um determinado antígeno. Após a expansão clonal ocorre diferenciação e conversão destas células virgens em células efetoras[53].

A IL-2 constitui etapa importante na ativação da resposta imune, e a sua ação pode ser medido indiretamente pelo nível sérico do receptor de IL-2. Esses

receptores foram estudados intensamente na década de 90, no intuito de ser um marcador precoce e menos invasivo (comparado com a biópsia endomiocárdica) de rejeição celular [54-56], no entanto esses estudos falharam em correlacionar a ativação dos receptores de IL-2 com o grau de rejeição vista na biópsia. O que se observou nestes estudos, foi que o aumento dos receptores de IL-2 correlacionou com aparecimento da doença vascular do enxerto[55-57], e este aumento ocorre já precocemente no pós transplante cardíaco[56].

Após a proliferação, os linfócitos diferenciam-se em Th1 e inicia-se a produção de Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Esta molécula também tem papel importante no desenvolvimento da DVE [51, 58]. O INF- $\gamma$  é um potente ativador das células NK e macrófagos. Este por sua vez estimula os LT CD4 e CD8, formando um feedback positivo na produção de INF- $\gamma$ . Além disso, o INF- $\gamma$  estimula a produção de quimiocinas que atraem mais células inflamatórias, expressão de moléculas de adesão, aumenta a expressão MHC classe I e II, induz a produção de matriz extracelular e a proliferação de células musculares lisas[51]. Estas duas últimas são responsáveis pelo aumento da íntima e obliteração lúmen arterial observada na DVE.

### 2.2.3 Basiliximab

Basiliximab é anticorpo monoclonal quimérico murinho/humano específico para o receptor de Interleucina 2 subunidade alfa (IL2-R $\alpha$ ) também conhecido como antígeno Cluster of Differentiation 25 (CD25)[59]. Este receptor somente é expresso em linfócitos ativados, o Basiliximab se liga de forma competitiva ao CD25.

Basiliximab é de uso intravenoso. A injeção de 20mg o pico ocorre em 30 min, com concentração sérica de  $7,1 \pm 5,1$  mg/L, e volume de distribuição de  $8,6 \pm 4,1$ L. A meia vida é de  $7,2 \pm 3,2$  dias, com clearance de  $41 \pm 10$ ml/h, idade, gênero e peso não interferem no seu clearance. O nível sérico necessário para o efetivo bloqueio dos IL2-R $\alpha$  deve estar acima de  $0,2\mu\text{g/ml}$ , a atividade dos

receptores retorna ao basal em aproximadamente 1-2 semanas. A droga não tem interação com outras medicações[59, 60].

Linfocitopenia e a síndrome de liberação de citocinas são complicações observadas em outros tratamentos com anticorpo monoclonal (principalmente muromonab CD3), no entanto, tais complicações ainda não foram observados nos estudos pré clínicos e clínicos da droga. Único caso de indução de reação de hipersensibilidade descrito foi prurido[60].

A terapia de indução com Basiliximab não aumentou a taxa de infecção pós transplante, Kahan e colaboradores [61] observaram que a taxa de infecção entre o grupo tratado com Basiliximab e placebo são similares (73% e 75% respectivamente) no seguimento de um ano, e a incidência de infecção viral também parecidos, com taxa de infecção por citomegalovírus ligeiramente superior no grupo tratado (16 (9,2%) x 12 (6,9%) pacientes), vale salientar que a amostra foi pequena para avaliar este tipo de desfecho.

De acordo com a diretriz Americana de Transplante Cardíaco[62], define-se terapia de indução o uso de anticorpos mono ou policlonais imediatamente antes do transplante cardíaco com a finalidade de diminuir a probabilidade de rejeição hiperaguda e aguda em pacientes de alto risco. O Basiliximab atualmente é o agente mais utilizado na terapia de indução[63].

Como foi dito acima a inibição é de forma competitiva, e há retorno da função dos receptores com aproximadamente 1-2 semanas[64], o que permite o retardo do início dos imunossupressores por aproximadamente 1 semana. O que é interessante considerando que o uso precoce dos inibidores de calcineurina (que são nefrotóxicos), poderia agravar a função renal dos pacientes submetidos a transplante cardíaco. A diretriz brasileira de transplante recomenda que os pacientes com idade avançada, taxa de filtração glomerular  $< 40 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , diabetes, hipertensão, e disfunção renal prévia seriam o grupo de pacientes que se beneficiariam deste retardo[11].

O Basiliximab reduz o número circulante de linfócitos T que expressa o receptor IL-2 ativado, sem redução dos níveis totais de linfócitos. O bloqueio dos do RIL-2A evita a proliferação clonal destas células, sem interferir na proliferação

mononuclear[64]. Estudos demonstram que esta especificidade esta relacionada com menor incidência de doença linfoproliferativa a longo prazo[62].

Apesar de bloquear somente uma via da ativação linfocitária, estudos demonstram que não há prejuízo na indução da imunossupressão, com bons resultados clínicos[60, 64]. No estudo clínico SIMCOR, Basiliximab foi comparado com OKT3 e apresentou número de rejeições comprovadas por biópsia semelhantes nos dois grupos ( $p=0,91$ ) no seguimento de um ano, em contrapartida os paciente que tomaram OKT3 tiveram mais complicações relacionadas a droga: 1. Evento diretamente relacionado com a medicação (edema pulmonar, síndrome de liberação de citocinas) (82% x 10,4%,  $p<0,0001$ ); 2. Maiores taxas de infecção (76,5% x 56,3%,  $p=0,007$ ); 3. Morte (18% x 6%;  $p=0,15$ ). A conclusão dos autores é que o Basiliximab era mais segura e melhor tolerada que o OKT3, sem prejuízo da eficácia.[65]

Aguero e colaboradores compararam vários esquemas de indução em único centro, também demonstraram que o esquema com inibidores da IL2 eram seguros e eficazes e com menos efeitos adversos, neste estudo ao contrário do SIMCOR, a infecção além de ser maior nos grupos que receberam OKT3, tiveram impacto significativo na mortalidade após 1 ano de acompanhamento (82% x 95%,  $p=0,011$ )[66].

Vale ressaltar que além de induzir a imunossupressão, os pacientes que apresentam quadro de rejeição aguda, no grupo tratado com Basiliximab a resistência ao curso de corticoide foi menor (10% x 23%,  $p<0,001$ ) nos primeiros 12 meses [67]. Este benefício não se mantém no seguimento a longo prazo[68]. No entanto, no seguimento de 10 anos, Koch e colaboradores não observaram aumento da incidência da taxa de neoplasia [68], efeito que pode ocorrer com as outras formas de terapia de indução, em especial OKT3 e anticorpo policlonal[65].

### 3. SUPLEMENTO

#### 3.1. ARTIGO

#### **Reduced Progression of Graft Vasculopathy with Routine Use of Induction Therapy with Basiliximab**

**Introduction:** Cardiac allograft vasculopathy (CAV) is a major limitation of long-term survival of patients undergoing cardiac transplantation (HT). Some immunosuppressants reduce the appearance of CAV. This study evaluated the impact of induction therapy with Basiliximab on the onset of CAV.

**Objectives:** The primary objective was to evaluate the variation of the volumetric growth of the intimal layer measured by intracoronary ultrasound (IVUS) after one year; the group that received basiliximab was compared to a control group. The secondary objective was to evaluate the remodeling of the vessel lumen volume.

**Methods:** The patients were included from 2007 through 2009 retrospectively in a single center. Evaluations were performed with IVUS, measuring the volume of a coronary segment within the first 30 days and 1 year after HT. The volume measurement was calculated via the following parameters: vessel volume (bounded by external elastic lamina), intimal and lumen. Vasculopathy was characterized by the volume of the intima of the vessel.

**Results:** 13 patients were included (7 in group basiliximab and 6 in control). With IVUS assessment, the control group was found to have greater vessel volume (131.32 to 127.77 mm<sup>3</sup> x 120 to 185.43 mm<sup>3</sup>;  $P = 0.051$ ). The growth of the intimal layer (graft vascular disease) was also higher in control group (Basiliximab: 20.23 to 26.69 mm<sup>3</sup> ( $\Delta$  33%) Control: 27.30 to 49.15 mm<sup>3</sup> ( $\Delta$  80%);  $P = 0.015$ ). With univariate regression, plaque volume, prior atherosclerosis of the donor was not related to the growth of the intima ( $r = 0.15$ ;  $P = 0.96$ ), whereas the positive

remodeling was directly proportional to volumetric growth of the intima ( $r = 0.85$ ;  $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** In our study, routine induction therapy with basiliximab was associated with reduced growth of the intima of the vessel the first year after cardiac transplantation.

## **INTRODUCTION**

With the increased survival in heart transplantation (HT), mainly due to improved immunosuppression, late complications, including cardiac allograft vasculopathy (CAV) [1], became more incident. CAV is characterized by progressive obliteration of vessels due to intimal proliferation and is considered a major cause of graft dysfunction after the first year of HT and the second most common cause of long-term death [2].

Lymphocytes play an important role in both acute and chronic graft rejection. The immunological and non-immunological factors implicated in the pathogenesis of CAV, converge by activating T lymphocytes (TL) [3, 4]. In animal models in which these cells were blocked did not develop vasculopathy [5, 6]. So, blocking of T lymphocytes has been the subject of other therapies for the prevention of CAV [7].

Basiliximab is a chimeric antibody receptor antagonist of interleukin 2 (IL2), and is indicated in induction therapy for patients at high risk of rejection after organ transplantation [8]. IL2 is a potent immunomodulator, playing an important role in the activation, maintenance of the immune response and lymphocyte proliferation [9]; furthermore, it is a key step in the development of acute rejection [10]. The blockage of TL proliferation and reduced acute rejection can delay the onset of CAV [11]. The aim of this study was to determine whether the blockage of IL2 (basiliximab), early in transplantation, was superior to control group in decreasing the growth of the vessel intima during the one year of follow-up.

## **METHODS**

We conducted a retrospective analysis of the database from a single center, including patients who were submitted to HT from September 2007 through March 2010. The patients were separated in two groups according to the induction therapy: basiliximab (Simulect®; Novartis, New Jersey, USA)- Group 1 or no induction therapy – Group 2. In our institution the use of basiliximab became routine in July 2008; therefore, a comparison was made to a series of cases before

and after this period. In this prior period, there was no difference regarding the surgical technique, preservation, or other adjuvant medications. We included only patients who had clinical and ultrasound follow-up for at least one year. We excluded from analysis patients who did not comply with IVUS follow-up or whose images in the database were inadequate to allow such analysis.

### **Endpoints**

The primary objective was to compare the two groups in regard to volumetric growth of the intimal layer measured by IVUS after one year. The secondary objective was to evaluate the remodeling of the vessel and lumen volume and donor atherosclerosis.

### **Immunosuppression protocol**

Immunosuppression was performed in Group 1 with basiliximab at a dose of 20 mg IV, together with methylprednisolone 500 mg in 3 daily doses and mycophenolate sodium (MS) 150 mg in two doses on the day of transplantation; on the fifth day, another dose of basiliximab 20 mg IV was administered; on that day, therapy with cyclosporine was begun. In Group 2, immunosuppression was conducted with methylprednisolone and MS at the same dosage; in addition, cyclosporin was started on the third day after transplantation at the same dosage.

### **Evaluation of vasculopathy**

As part of the HT protocol, patients are routinely evaluated with angiography and intracoronary ultrasound (IVUS) – this is performed only at left anterior descending (LAD). This evaluation is performed 30 days after heart transplantation and then repeated annually.

Coronary angiography and intracoronary ultrasound were performed concurrently with an endomyocardial biopsy. To perform the procedure, a 6F introducer was introduced into the femoral artery, followed by catheterization of the left coronary artery. Unfractionated heparin (100 IU/kg) was instilled intravenously together with an intracoronary dose of isosorbide mononitrate (10mg). The

ultrasound examination was performed with an Atlantis® catheter (Boston Scientific Scimed Inc., Maple Grove, Minn.) and a 4.3 Fr catheter with a 40 MHz transducer. The IVUS catheter was positioned in the distal LAD; automatic pullback was performed with a velocity of 1mm/seg and an acquisition rate of 30 frames/sec. The images were stored on a compact disk and analyzed using ILab® software (Boston Scientific Scimed Inc.).

### **IVUS Analysis**

To provide monitoring of the same segment, a 10 mm segment was selected just after the output of the first diagonal (Figure 1). Segment analysis was methodologically validated in a similar manner as previously described [12, 13]. Analysis was performed on the first CT slice after the departure of the diagonal branch, marking the beginning of the segment; then an image is evaluated every 30 cuts (1 mm interval between analyses), until 10 segment images (10mm) are completed. The analysis consists of a manual outlining of the lumen and external elastic membrane (EEM), calculating the lumen area, and calculating the EEM area; measurements were performed as standardized by the American College of Cardiology / European Society of Cardiology [14]. The intimal area was calculated by subtracting the area of the luminal minus EEM. To calculate the volume of the vessel lumen and intima was carried out using the method as described by Simpson[12]. The volume percent was calculated according the following formula:  $\{\sum (EEM \text{ area} - \text{lumen area}) / \sum EEm \text{ area} \times 100$ .

### **Statistical Analysis**

Continuous data were expressed as median plus the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles. Categorical data were expressed as absolute numbers. For evaluation of differences of continuous data, we used the Mann-Whitney test and logistic regression models. For categorical data the differences were evaluated using Fisher's exact test.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. Analysis were performed with SPSS 12.0 software.

## Results

We evaluated 13 patients, where 7 received basiliximab (Group 1) and 6 did not (Group 2). Demographic data are listed in Table 1. The patients were predominantly male ( $n = 10$ ); the median age was 55 years for Group 1, and 47.5 years for Group 2. Three patients in the control group developed acute renal failure in the postoperative period, characterized by a serum creatinine  $> 1.5$  mg / dL; no patients in the group treated with basiliximab developed this complication. The levels of total cholesterol, triglycerides, and angiotensin receptors were similar ( $P = NS$ ); creatinine levels were somewhat higher in the control group. The use of inhibitors and statins was also higher in Group 1. Only one patient in Group 1 and two in Group 2 received everolimus / sirolimus during follow-up. However, all patients received mycophenolate sodium. No patient had a diagnosis of cytomegalovirus confirmed by serology. The number of rejection episodes was similar in both groups. Two patients in Group 1 and three in Group 2 underwent a biopsy with 2R; they required hospitalization and underwent pulse therapy with intravenous corticosteroids.

Coronary angiography performed during the first year following heart transplantation did not detect the presence of significant vascular disease (CAV), based on the new classification of IHLST [15]. The data measured by IVUS are presented in Table 1. In Group 2, vessel volume (delimited by MES) exhibited positive remodeling (increase in volume growth of  $49.39$  mm<sup>3</sup>); In Group 1 the effect was reversed (negative remodeling:  $- 4.17$  mm<sup>3</sup>), with a trend toward statistical significance ( $P = 0.051$ ). The findings were similar in regard to luminal volume ( $-11.53$  x  $17.3$  mm<sup>3</sup>;  $P = 0.051$ ). Regarding the intimal layer (plate), a higher rate of growth occurred in Group 2 (baseline value:  $27.3$  mm<sup>3</sup>; Group 2:  $49.15$  mm<sup>3</sup>; Group 1:  $20.23$  to  $26.69$  mm<sup>3</sup>;  $P = 0.015$  (Figure 2).

In logistic regression analysis assessment (graphic 2), previous donor atherosclerosis was not associated with increase growth of the intima ( $r = 0.15$ ;  $P = 0.96$ ). A positive remodeling (increase in EEM) was associated with a greater increase in intimal volume ( $r = 0.85$ ;  $P < 0.001$ ).

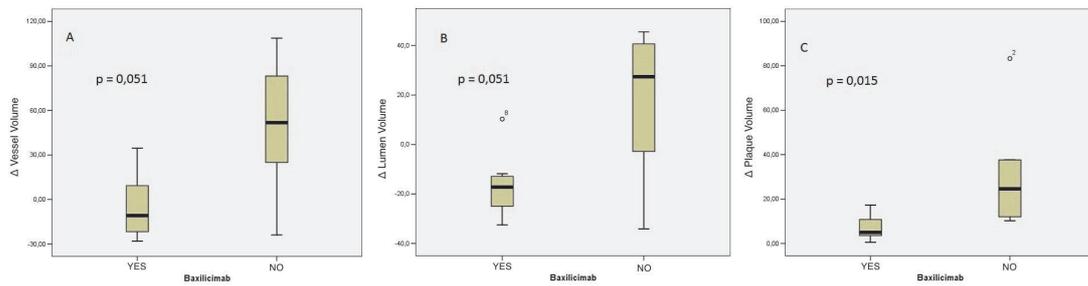
**Table 1.** Demographics

	Group 1 (n = 7)	Group 2 (n = 6)	P value
Male sex (n)	4	6	N.S.
Age	55 [40-65]	47.5 [40-59]	N.S.
Diabetes mellitus	3	2	N.S.
Renal failure after transplantation	0	3	N.S.
Rejection	6	6	N.S.
Biopsy (during first year after transplantation)			
0R	2	1	N.S.
1R	3	2	N.S.
2R	2	3	N.S.
Coronary angiography*			
ISHLT CAV <sub>0</sub>	7	6	N.S.
Total cholesterol (mg/dL)	229 [179-243]	180[152-249]	N.S.
Triglycerides (mg/dL)	223 [176-450]	150 [129.2-232]	N.S.
HDL (md/dL)	48 [36-52]	38 [28-44]	N.S.
Glucose	85 [83-98]	93 [82-105]	N.S.
Creatinin	1.2 [1.2-1,4]	1.6 [1.4;-1.6]	N.S.
Imunosupressor			N.S.
Prednisone	6	5	N.S.
Micophenolate sodium	7	6	N.S.
Cyclosporin	6	5	N.S.
Everolimus/rapamicin	1	2	N.S.
Other medications			
Statin	4	1	N.S.
Angiotensin converting enzyme inhibitor	6	4	N.S.
Insulin	0	1	N.S.

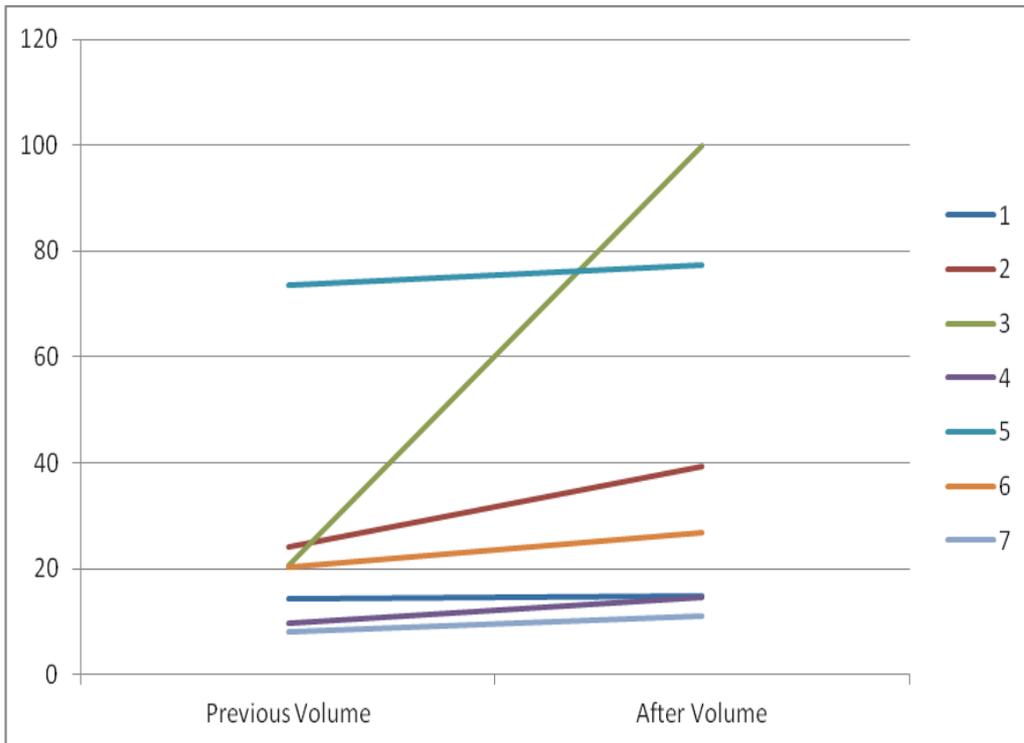
**Table 2.** Analysis of Volumes Obtained with Intracoronary Ultrasound

	Vessel Previous	Vessel after	Lumen previous	Lumen after	Intima previous	Intima after
Basiliximab	131.32 [101.69;202,06]	127.77 [110.39;174,05]	113.22 [82.67;144,70]	99.23 [87.86;123,36]	20.23 [9.65;29,11]	26.69 [14.65;39,24]
Control	120.77 [111.92;191,57]	185.43 [142.23;229,76]	103.31 [86.52;149,16]	134.96 [105.50;158,79]	27.30 [13.65;42,41]	49.15 [39.76;82,89]

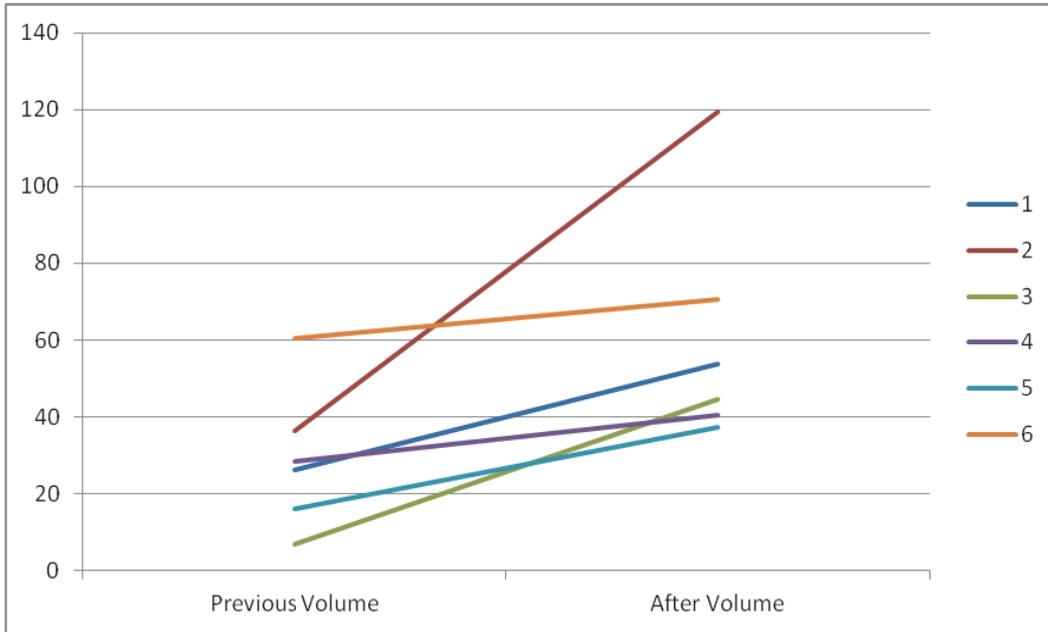
**Figure 1.** Analysis of the volume change after a year of transplant. A: Variation of the vessel. B: Variation of the lumen. C: Variations of the intima.Δ



**Figure 2.** Growth of plaque volume in patients undergoing induction therapy basiliximab.

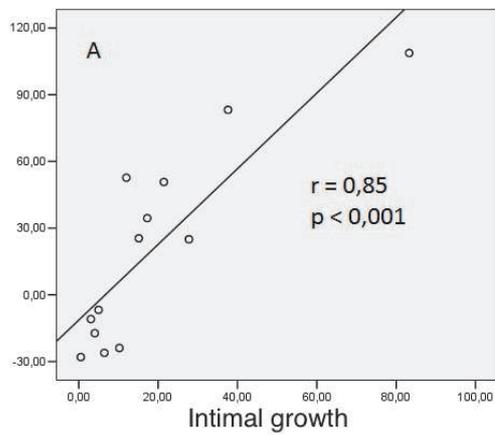


**Figure 3.** Plaque volume in patients with no induction therapy.

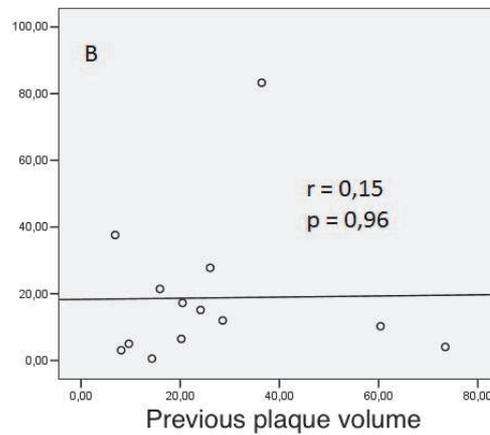


**Figure 4.** A. Vessel growth according to intimal growth. B. Impact of previous plaque atherosclerosis in CAV growth.

**Vessel growth**



**Plaque growth**



## Discussion

This study revealed the following findings: (1) The use of induction therapy with basiliximab was associated with less intimal tissue growth in the first year after heart transplantation; (2) In the control group, we observed a greater positive remodeling, which was probably related to increased intimal growth observed in this group; (3) With logistic regression analysis, vessel growth was proportional to the increase of the plaque regardless of induction therapy; (4) Atherosclerosis of the donor was not associated with higher growth of the intima.

Graft vascular disease begins with endothelial injury, followed by a repair process, cell proliferation, and accumulation of an extracellular matrix [3, 7,16,17]. The degree of organ preservation, ischemia / reperfusion injury, and acute rejection, viral infection (particularly cytomegalovirus) are cited as the main non-immunological factors that affect the endothelium in the first year. In response to injury, endothelial cells express cell adhesion molecules (VCAM, ICAM, and selectins); furthermore, there is recruitment of inflammatory cells and release of proinflammatory cytokines. This results in a vicious circle with chronic inflammation, culminating in the obliteration of the lumen [18-21].

The growth inhibition by basiliximab, which exhibits its action four to six weeks after infusion [10], reinforces the relationship of early recruitment of LT to the appearance of CAV [7]. Tori [22] and Young [23] observed that the infiltration and activation of LT in the first days after HT are already sufficient for the appearance of CAV. The specific activation pathway of MHC II and proliferation of Th1 lymphocytes are considered to be the primary route of CAV formation [16]. Blocking various parts of this pathway has been proven effective in reducing the appearance of CAV4 [24]. IL-2 also plays a major role in the activation pathway of lymphocytes Th1 [25]; this could explain the benefit of the use of basiliximab in the first weeks after heart transplant to interrupt the cycle of injury and repair; thus, preventing the chronic inflammatory process.

The reduction of intimal growth induction therapy is not a new finding [26,27]. Zhang et al. [26] observed that induction therapy with antithymocyte antibody (ATG) delays the onset of CAV; however, the effect did not translate into

increased long-term survival. In addition, a higher incidence of cancer is observed in the group treated with ATG; this may explain the higher late mortality rate in this group. Long-term follow-up is indicated to determine the benefit and/or clinical harm of this therapy. As basiliximab is not associated with increased infection or neoplasia [10,28], we expect a clinical benefit.

In the global registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation, the use of basiliximab for induction therapy had a neutral effect on CAV (RR: 1.16; CI: 0.99 to 1.37); however, CAV increased with OKT3 incidence (RR: 1.17;  $P = 0.038$ ) [2]. This effect is probably due to selection bias. Patients with a higher risk of acute rejection in post-transplant and those who have higher levels of a reactor panel of antibodies (PRA) are at greatest risk of developing CAV [29,30]. Another example of selection bias occurs with induction therapy, correlates with IL-2 receptor antagonists and a risk of renal dysfunction, this medication is indicated for patients at high risk for renal failure after transplantation [31].

As in atherosclerosis [32], we observed positive remodeling to accommodate the increase of the intima; thus, avoiding involvement of the arterial lumen. In previous studies, most intimal tissue growth and positive remodeling occurred during the first year post heart transplantation [33,36]. From the second year onward, despite a lower growth of the intima, there is greater involvement of the arterial lumen due to negative vessel remodeling [33]. We found a variation of the natural history of the process in the group treated with basiliximab. We also found a slight decrease in vessel remodeling and luminal volume reduction; however, to date, we do not know how it will progress following the second year.

In our institution, induction therapy with basiliximab is routinely performed, with the goal of delaying the onset of calcineurin inhibitors and minimizing the nephrotoxic effects of cyclosporin [31,37]. Candidates for heart transplantation have a high prevalence of renal dysfunction; furthermore, after cardiac transplantation, renal function may deteriorate, particularly because of the use of nephrotoxic drugs, low cardiac output, and impaired cardiopulmonary bypass. Moreover, acute renal failure is associated with a poor outcome [2].

Due to low sensitivity of coronary angiography in detecting early CAV, IVUS use in our institution is used for CAV research because its high sensitivity and specificity provides an earlier diagnosis of CAV [15,38]. Clinically, IVUS has a good correlation with angiography; thus, it is a good prognostic tool [39]. Some evidence exists that early diagnosis of CAV, together with the adjustment of immunosuppressive therapy is associated with growth control; furthermore, some studies have reported of regression of CAV [24,40,41]. The volumetric measurement of the plate by IVUS has been previously validated by experimental [12] and clinical [10] studies. This methodology has a strong correlation with histomorphometry; it is a robust method and requires a smaller sample to demonstrate the effectiveness of strategies that have an impact in reducing the intima [12].

The major limitation of this study is its small sample size and retrospective nature. Thus, a prospective, multicenter, randomized study with a larger sample size, which extends clinical follow-up to assess the long-term benefit, is indicated. Furthermore, our control group had greater plaque volume, probably due to atherosclerosis of the donor; this may have affected the outcome, as suggested by a recent study by Yamasaki et al. [42]. However, in our study, plaque volume did not correlate with higher growth of the intima ( $r = 0.24$ ;  $P = 0.94$ ); this finding was consistent with previous studies [43,44].

## **Conclusion**

In this retrospective analysis, induction therapy with basiliximab was associated with less volumetric growth of intimal tissue (graft vasculopathy) in the first year after heart transplantation.

## **Reference:**

1. Houser S, Muniappan A, Allan J, Sachs D, Madsen J. Cardiac allograft vasculopathy: real or a normal morphologic variant? J Heart Lung Transplant 2007;26:167-73.

2. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report--2010. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:1089-103.
3. Benza RL, Tallaj J. Cardiac Allograft Vasculopathy (Chronic Rejection). In: Kirklin JK, Young JB, McGiffin DC, eds. *Heart Transplantation*. Thirst ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002:615-65.
4. Nagano H, Libby P, Taylor MK, et al. Coronary arteriosclerosis after T-cell-mediated injury in transplanted mouse hearts: role of interferon-gamma. *Am J Pathol* 1998;152:1187-97.
5. Uehara S, Chase CM, Colvin RB, Madsen JC, Russell PS. T-cell depletion eliminates the development of cardiac allograft vasculopathy in mice rendered tolerant by the induction of mixed chimerism. *Transplant Proc* 2006;38:3169-71.
6. Isobe M, Kosuge H, Suzuki J. T cell costimulation in the development of cardiac allograft vasculopathy: potential targets for therapeutic interventions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1447-56.
7. Valentine HA. Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant "atheroma". *Transplantation* 2003;76:891-9.
8. [II Brazilian Guidelines for Cardiac Transplantation]. *Arq Bras Cardiol* 2010;94:e16-76.
9. Church AC. Clinical advances in therapies targeting the interleukin-2 receptor. *QJM* 2003;96:91-102.
10. Onrust SV, Wiseman LR. Basiliximab. *Drugs* 1999;57:207-13; discussion 14.
11. Young JB, Lloyd KS, Windsor NT, et al. Elevated soluble interleukin-2 receptor levels early after heart transplantation and long-term survival and development of coronary arteriopathy. *J Heart Lung Transplant* 1991;10:243-50.
12. Mehran R, Mintz GS, Hong MK, et al. Validation of the in vivo intravascular ultrasound measurement of in-stent neointimal hyperplasia volumes. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:794-9.
13. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of Very High-Intensity Statin Therapy on Regression of Coronary Atherosclerosis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2006;295:1556-65.
14. Mintz GS, Nissen SE, Anderson WD, et al. American College of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Standards for Acquisition, Measurement and Reporting of Intravascular Ultrasound Studies (IVUS). A report of the American College of Cardiology Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1478-92.
15. Mehra MR, Crespo-Leiro MG, Dipchand A, et al. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:717-27.
16. Mitchell RN. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. *Annu Rev Pathol* 2009;4:19-47.
17. Libby P, Salomon RN, Payne DD, Schoen FJ, Pober JS. Functions of vascular wall cells related to development of transplantation-associated coronary arteriosclerosis. *Transplant Proc* 1989;21:3677-84.

18. Yamani MH, Haji SA, Starling RC, et al. Myocardial ischemic-fibrotic injury after human heart transplantation is associated with increased progression of vasculopathy, decreased cellular rejection and poor long-term outcome. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:970-7.
19. Land W, Messmer K, Events E. The Impact of Ischemia/Reperfusion Injury on Specific and Non-Specific, Early and Late Chronic Events After Organ Transplantation. *Transplantation Reviews* 1996;10:108-27.
20. Day JD, Rayburn BK, Gaudin PB, et al. Cardiac allograft vasculopathy: the central pathogenetic role of ischemia-induced endothelial cell injury. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:S142-9.
21. Furukawa Y, Libby P, Stinn JL, Becker G, Mitchell RN. Cold ischemia induces isograft arteriopathy, but does not augment allograft arteriopathy in non-immunosuppressed hosts. *Am J Pathol* 2002;160:1077-87.
22. Tori M, Kitagawa-Sakakida S, Li Z, et al. Initial T-cell activation required for transplant vasculopathy in retransplanted rat cardiac allografts. *Transplantation* 2000;70:737-46.
23. Young JB, Windsor NT, Kleiman NS, Lowry R, Cocanougher B, Lawrence EC. The relationship of soluble interleukin-2 receptor levels to allograft arteriopathy after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:S79-82.
24. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, et al. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 2003;349:847-58.
25. Abbas AK, Lichtman AH. *Basic Immunology Function and Disorders of the Immune System*. Second ed: Saunders; 2007.
26. Zhang R, Haverich A, Strüber M, Simon A, Bara C. Delayed Onset of Cardiac Allograft Vasculopathy by Induction Therapy Using Anti-thymocyte Globulin. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2008;27:603-9.
27. Zuckermann A, Ploner M, Czerny M, et al. Low incidence of graft arteriosclerosis after cardiac transplantation - risk factor analysis for patients with induction therapy. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2001;20:196.
28. Chapman TM, Keating GM. Basiliximab: a review of its use as induction therapy in renal transplantation. *Drugs* 2003;63:2803-35.
29. Kobashigawa JA, Patel JK, Kittleson MM, et al. The long-term outcome of treated sensitized patients who undergo heart transplantation. *Clin Transplant* 2011;25:E61-7.
30. Feingold B, Bowman P, Zeevi A, et al. Survival in allosensitized children after listing for cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2007;26:565-71.
31. Delgado DH, Miriuka SG, Cusimano RJ, Feindel C, Rao V, Ross HJ. Use of basiliximab and cyclosporine in heart transplant patients with pre-operative renal dysfunction. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:166-9.
32. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory Enlargement of Human Atherosclerotic Coronary Arteries. *New England Journal of Medicine* 1987;316:1371-5.

33. Tsutsui H, Ziada KM, Schoenhagen P, et al. Lumen loss in transplant coronary artery disease is a biphasic process involving early intimal thickening and late constrictive remodeling: results from a 5-year serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001;104:653-7.
34. Kobashigawa J, Wener L, Johnson J, et al. Longitudinal study of vascular remodeling in coronary arteries after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:546-50.
35. Rickenbacher PR, Pinto FJ, Chenzbraun A, et al. Incidence and severity of transplant coronary artery disease early and up to 15 years after transplantation as detected by intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:171-7.
36. Yeung AC, Davis SF, Hauptman PJ, et al. Incidence and progression of transplant coronary artery disease over 1 year: results of a multicenter trial with use of intravascular ultrasound. Multicenter Intravascular Ultrasound Transplant Study Group. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:S215-20.
37. Anselm A, Cantarovich M, Davies R, Grenon J, Haddad H. Prolonged Basiliximab Use as an Alternative to Calcineurin Inhibition to Allow Renal Recovery Late After Heart Transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2008;27:1043-5.
38. Cai Q, Rangasetty UC, Barbagelata A, Fujise K, Koerner MM. Cardiac allograft vasculopathy: advances in diagnosis. *Cardiol Rev* 2011;19:30-5.
39. Rickenbacher PR, Pinto FJ, Lewis NP, et al. Prognostic importance of intimal thickness as measured by intracoronary ultrasound after cardiac transplantation. *Circulation* 1995;92:3445-52.
40. Lamich R, Ballester M, Marti V, et al. Efficacy of augmented immunosuppressive therapy for early vasculopathy in heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:413-9.
41. Dambrin C, Klupp J, Birsan T, et al. Sirolimus (rapamycin) monotherapy prevents graft vascular disease in nonhuman primate recipients of orthotopic aortic allografts. *Circulation* 2003;107:2369-74.
42. Yamasaki M, Sakurai R, Hirohata A, et al. Impact of donor-transmitted atherosclerosis on early cardiac allograft vasculopathy: new findings by three-dimensional intravascular ultrasound analysis. *Transplantation* 2011;91:1406-11.
43. Botas J, Pinto FJ, Chenzbraun A, et al. Influence of preexistent donor coronary artery disease on the progression of transplant vasculopathy. An intravascular ultrasound study. *Circulation* 1995;92:1126-32.
44. Kapadia SR, Nissen SE, Ziada KM, et al. Development of transplantation vasculopathy and progression of donor-transmitted atherosclerosis: comparison by serial intravascular ultrasound imaging. *Circulation* 1998;98:2672-8.

## 3.2 Material suplementar

### 1. MÉTODO

Para a realização deste estudo, seguir-se-á a Declaração de Helsinki, que dá recomendações à pesquisa biomédica que envolve humanos como objetos de estudo. Este trabalho foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos (CEPH) da PUC-PR.

#### Delineamento da pesquisa

Será realizado estudo coorte retrospectivo com pacientes submetidos a transplante cardíaco no estabelecimento de saúde Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba no período de 2007 a 2011. Estes pacientes são normalmente submetidos por protocolo de acompanhamento e rastreamento de vasculopatia do enxerto com exames de ultrassom intracoronário. Para realização do estudo, os pacientes serão separados em dois grupos. Grupo 1: Pacientes que receberam indução com Basiliximab, Grupo 2: controle, estes não receberam nenhuma terapia de indução. O Basiliximab foi introduzido na instituição em abril de 2008, e é usado desde então como rotina para todos os pacientes. O estudo será uma comparação de uma série de casos antes de abril de 2008 versus após esse período. Com exceção do Basiliximab, não houve nenhuma mudança no protocolo do transplante cardíaco.

O ultrassom intracoronário (IVUS) foi realizado no pós-operatório de transplante cardíaco no período de 7 a 30 dias (para detectar doença do doador e diferenciar aterosclerose que tem curso mais benigno no transplante) [69]; posteriormente o IVUS é realizado anualmente. O atual projeto tem como finalidade comparar as imagens do IVUS no momento imediato ao transplante com imagens de 1 ano após o transplante cardíaco, avaliando a história natural da progressão da vasculopatia, e o impacto do bloqueio destes receptores nesse crescimento.

Devido a gravidade da doença, rotineiramente no pós transplante cardíaco a DVE é investigada. No serviço da Santa Casa de Curitiba os pacientes são

investigados com realização de ultrassonografia coronariana (IVUS), método com alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico da DVE[70] este método já foi extensamente validado com valor diagnóstico e prognóstico[70-74].



#### Critérios de inclusão

- Todos os paciente submetidos a transplante cardíaco, que foram submetidos a avaliação com IVUS, no pós transplante cardíaco imediato e que tenham realizado controle anual com IVUS;
- Paciente com acompanhamento clínico de pelo menos 01 anos pós transplante cardíaco;

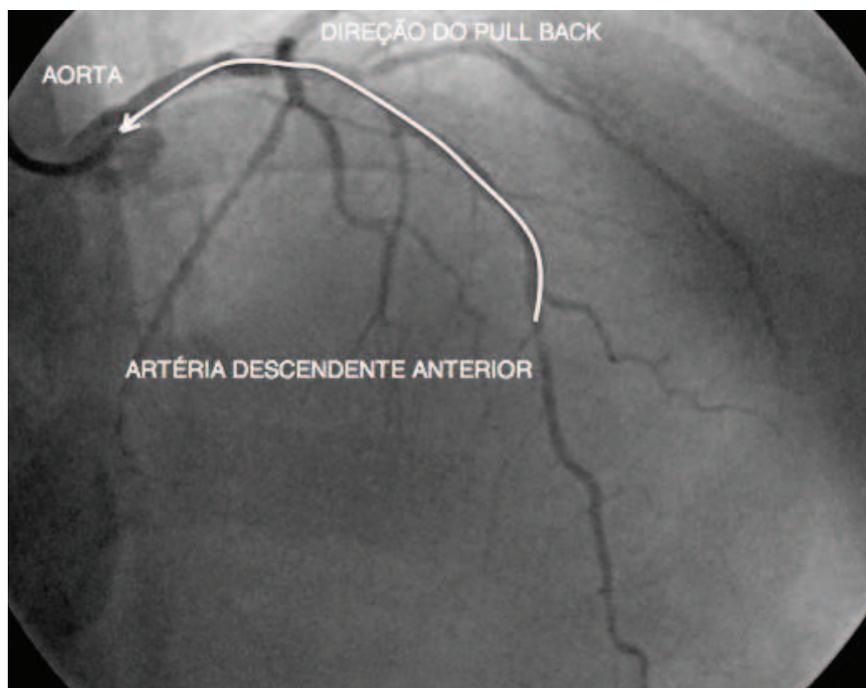
#### Critérios de exclusão

- Imagens do ultrassom inadequados para avaliação;

## **2. IVUS**

Para o estudo ultrassonográfico foi utilizado o cateter de ultra-som Atlantis® (Boston Scientific) com as seguintes características: emissor de ultra-som de 40MHZ, 3,5 French de diâmetro. Para o procedimento foi administrado 200 µg de nitroglicerina na coronária a ser estudada. Com auxílio de fio guia 0,014 polegadas de espessura foi posicionado o cateter de ultra-som a 50mm do óstio da coronária (Figura 1). Após o posicionamento do cateter, este foi conectado no sistema de recuo automático com velocidade de 1mm/seg com aquisição de imagem a 30 quadros/seg, com essa técnica permiti calcular o volume e a extensão da vasculopatia, conforme demonstrado por Nissen e colaboradores[75]. O tempo médio de aquisição de imagens é de 3 minutos.

Figura 01. O cateter de IVUS é posicionado no segmento distal, e a captura da imagem se realizará do segmento distal em direção ao óstio da coronária.

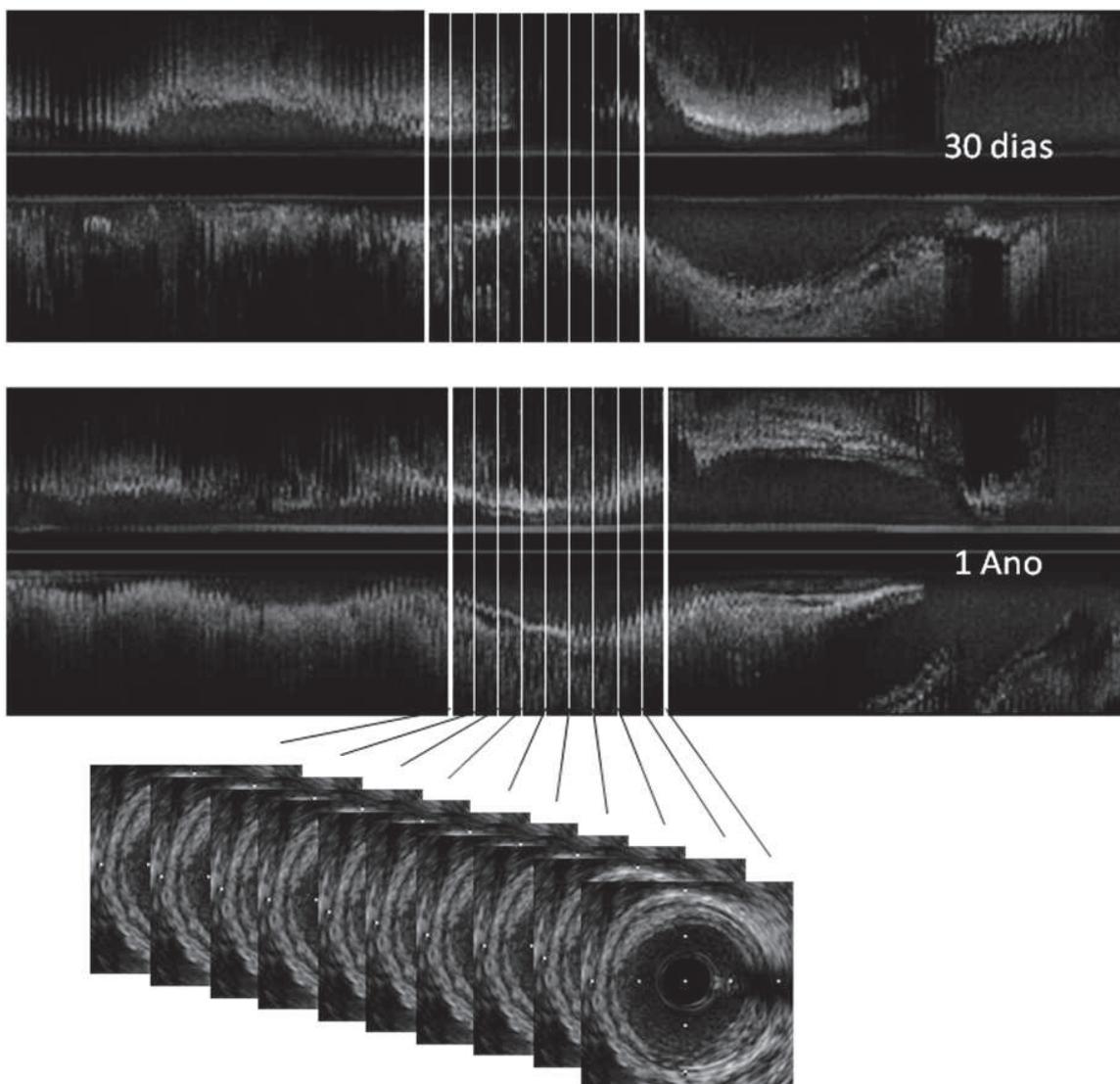


Os filmes resultantes dos exames IVUS foram armazenados em disco de CD® em formato DICOM® e arquivados no serviço de hemodinâmica CDCV da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba.

### **3. SEGMENTO A SER ANALISADO**

Para se obter o acompanhamento do mesmo local, será escolhido o segmento de 10mm logo após a saída da primeira diagonal (como demonstrado na figura 3). Para análise do segmento será empregada a metodologia validada em estudos prévios[76, 77]. O primeiro corte tomográfico após a saída do ramo diagonal marca o início do segmento. Posteriormente é feita análise a cada 30 cortes (espaço de 1mm entre as análises) até ter completado 10 imagens do segmento (10mm).

Figura 2. Segmento a ser analisado no IVUS. Acima imagem da artéria descendente anterior no período de 30 dias pós transplante cardíaco, abaixo controle de 01 ano pós transplante cardíaco.



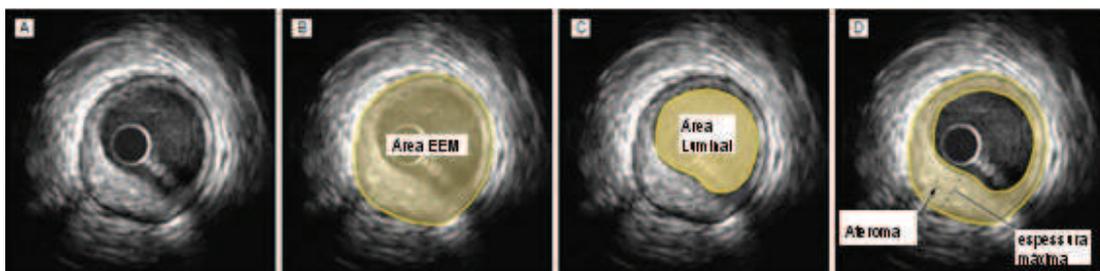
#### 4. ANÁLISE DAS IMAGENS DO IVUS

As imagens serão submetidas à medição da área do vaso realizado a partir do delineamento da lâmina elástica externa (área da EEM), área luminal a partir do delineamento do lúmen (Figura 03). O cálculo da área será realizado por planimetria. A partir da medição destas áreas são realizados os seguintes cálculos:

Área da hiperplasia: área da EEM – área luminal;

$$A \text{ porcentagem da obstrução: } \% = \frac{\text{área da EEM} - \text{área luminal}}{\text{Área da EEM}} \times 100$$

Figura 03. A. Imagem da placa vista ao IVUS. B. Delineamento da membrana elástica externa com a medida de sua área. C. Delineamento do lúmen com sua respectiva área. D. Área do ateroma que consiste na diferença da área da EEM menos a área luminal.



Após a realização do cálculo de cada corte tomográfico realizado pelo ultrassom, é realizado o cálculo do volume da placa aterosclerótica baseado nas seguintes formulas, baseado no método de Simpson:

$$\text{Volume da placa aterosclerótica: } \Sigma (\text{área EEM} - \text{área luminal})$$

$$\% \text{ Volume da placa aterosclerótica: } \frac{\Sigma (\text{área EEM} - \text{área luminal})}{\Sigma \text{ área EEM}} \times 100$$

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para dados contínuos serão realizados: a média e o desvio padrão com intervalo de confiança. O teste t de student será utilizado para comparação das médias de variáveis contínuas com distribuição normal. Quando a variável não obedecer à distribuição Gaussiana, testes não paramétricos serão aplicados. Para comparação entre as proporções, aplicar-se-á o teste do qui-quadrado. A correlação entre as variáveis contínuas será determinada pelo teste T de student

pareado (ou Wilcoxon quando a distribuição não for normal). Determinar-se-á como estatisticamente significativo os valores de  $p < 0,05$ .

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A grande limitação deste estudo foi o pequeno número de pacientes, além de ser uma análise retrospectiva de uma série de pacientes. Fato que poderia ser corrigido somente com a realização de estudo prospectivo e multicêntrico, já que não são muitos os pacientes disponíveis para realização deste tipo de estudo.

A perspectiva deste estudo, primeiramente, é de estimular a realização de estudo posteriores com os medicamentos utilizados na terapia de indução. O uso rotineiro de Basiliximab no transoperatório para evitar complicações imunológicas e possivelmente renais (agudas), pode prevenir complicações tardias que limitam a sobrevida do paciente transplantado.

## **5. CONCLUSÕES**

Nesta análise retrospectiva, o uso rotineiro de Basiliximab associou com redução do crescimento da íntima, no acompanhamento com ultrassom intracoronário no primeiro ano pós transplante cardíaco.

Observamos que a presença de aterosclerose prévia não foi associada com maior risco de desenvolvimento de doença vascular do enxerto no período acompanhado.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Bocchi, E.A., et al., *III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2009. 93: p. 3-70.
2. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2002. 106(24): p. 3068-72.
3. Cleland, J.G.F., A. Khand, and A. Clark, *The heart failure epidemic: exactly how big is it?* European Heart Journal, 2001. 22(8): p. 623-626.
4. Kannel, W.B. and S.V. Ramachandran, *Epidemiology of Heart Failure*, in *Heart Failure - A companion to Braunwald's Heart Disease*, D.L. Mann, Editor 2004, Saunders: Philadelphia. p. 339-350.
5. Packer, M., et al., *The Effect of Carvedilol on Morbidity and Mortality in Patients with Chronic Heart Failure*. New England Journal of Medicine, 1996. 334(21): p. 1349-1355.
6. *The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial*. The Lancet, 1999. 353(9146): p. 9-13.
7. *Effects of Enalapril on Mortality in Severe Congestive Heart Failure*. New England Journal of Medicine, 1987. 316(23): p. 1429-1435.
8. *Effect of Enalapril on Mortality and the Development of Heart Failure in Asymptomatic Patients with Reduced Left Ventricular Ejection Fractions*. New England Journal of Medicine, 1992. 327(10): p. 685-691.
9. Pitt, B., et al., *The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure*. New England Journal of Medicine, 1999. 341(10): p. 709-717.
10. Aguiar, M.I.F.d., et al., *Qualidade de vida de pacientes submetidos ao transplante cardíaco: aplicação da escala Whoqol-Bref*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2010: p. 0-0.
11. Bacal, F., et al., *II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2009. 94(1 supl.1): p. e16-e73.
12. George, J.F., *History of Cardiac Transplantation*, in *Heart Transplantation*, J.K. Kirklin, J.B. Young, and D.C. McGiffin, Editors. 2002, Churchill Livingstone: Philadelphia. p. 3-13.
13. Behrendt, D., P. Ganz, and J.C. Fang, *Cardiac allograft vasculopathy*. Curr Opin Cardiol, 2000. 15(6): p. 422-9.
14. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. Seventh ed2012, Philadelphia: Elsevier.

15. Krensky, A.M., et al., *T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection*. N Engl J Med, 1990. 322(8): p. 510-7.
16. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed 2012, Philadelphia: Saunders.
17. George, J.F., *Immunology in Relation to Cardiac Transplantation*, in *Heart Transplantation*, J.K. Kirklin, J.B. Young, and D.C. McGiffin, Editors. 2002, Churchill Livingstone: Philadelphia. p. 14-56.
18. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. 357(9270): p. 1777-89.
19. Yamani, M.H., et al., *Myocardial ischemic injury after heart transplantation is associated with upregulation of vitronectin receptor (alpha(v)beta3), activation of the matrix metalloproteinase induction system, and subsequent development of coronary vasculopathy*. Circulation, 2002. 105(16): p. 1955-61.
20. Benza, R.L. and J. Tallaj, *Cardiac Allograft Vasculopathy (Chronic Rejection)*, in *Heart Transplantation*, J.K. Kirklin, J.B. Young, and D.C. McGiffin, Editors. 2002, Churchill Livingstone: Philadelphia. p. 615-665.
21. Winters, G.L. and F.J. Schoen, *Pathology of Cardiac Transplantation*, in *Cardiovascular Pathology*, M.D. Silver, A.I. Gotlieb, and F.J. Schoen, Editors. 2001, Churchill Livingstone: Philadelphia. p. 725-762.
22. Grigioni, F., et al., *Long-term safety and effectiveness of statins for heart transplant recipients in routine clinical practice*. Transplant Proc, 2006. 38(5): p. 1507-10.
23. Pinney, S.P. and D. Mancini, *Cardiac allograft vasculopathy: advances in understanding its pathophysiology, prevention, and treatment*. Curr Opin Cardiol, 2004. 19(2): p. 170-6.
24. Bae, J.H., et al., *Association of angiotensin-converting enzyme inhibitors and serum lipids with plaque regression in cardiac allograft vasculopathy*. Transplantation, 2006. 82(8): p. 1108-11.
25. Lehmkuhl, H. and R. Hetzer, *Clinical experience with Certican (everolimus) in de novo heart transplant patients at the Deutsches Herzzentrum Berlin*. J Heart Lung Transplant, 2005. 24(4 Suppl): p. S201-5; discussion S210-1.
26. Zuckermann, A., *Clinical experience with Certican (everolimus) in maintenance heart transplant patients at the Medical University of Vienna*. J Heart Lung Transplant, 2005. 24(4 Suppl): p. S206-9; discussion S210-1.
27. Eisen, H.J., et al., *Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients*. N Engl J Med, 2003. 349(9): p. 847-58.
28. Sinha, S.S., et al., *Effect of rapamycin therapy on coronary artery physiology early after cardiac transplantation*. Am Heart J, 2008. 155(5): p. 889 e1-6.

29. Mitchell, R.N., *Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall*. *Annu Rev Pathol*, 2009. 4: p. 19-47.
30. Valantine, H., *Cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: risk factors and management*. *J Heart Lung Transplant*, 2004. 23(5 Suppl): p. S187-93.
31. Radovancevic, B., et al., *Risk factors for development of accelerated coronary artery disease in cardiac transplant recipients*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1990. 4(6): p. 309-12; discussion 313.
32. Kobashigawa, J.A., et al., *Multicenter retrospective analysis of cardiovascular risk factors affecting long-term outcome of de novo cardiac transplant recipients*. *J Heart Lung Transplant*, 2006. 25(9): p. 1063-9.
33. Caforio, A.L., et al., *Immune and nonimmune predictors of cardiac allograft vasculopathy onset and severity: multivariate risk factor analysis and role of immunosuppression*. *Am J Transplant*, 2004. 4(6): p. 962-70.
34. Valantine, H.A., *Role of lipids in allograft vascular disease: a multicenter study of intimal thickening detected by intravascular ultrasound*. *J Heart Lung Transplant*, 1995. 14(6 Pt 2): p. S234-7.
35. Kobashigawa, J.A., et al., *Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation*. *N Engl J Med*, 1995. 333(10): p. 621-7.
36. Koskinen, P.K., et al., *Cytomegalovirus infection and accelerated cardiac allograft vasculopathy in human cardiac allografts*. *J Heart Lung Transplant*, 1993. 12(5): p. 724-9.
37. Snyderman, D.R., et al., *Update and Review: State-of-the-Art Management of Cytomegalovirus Infection and Disease Following Thoracic Organ Transplantation*. *Transplantation proceedings*, 2011. 43(3): p. S1-S17.
38. Valantine, H., et al., *Metabolic Abnormalities Characteristic of Dysmetabolic Syndrome Predict the Development of Transplant Coronary Artery Disease*. *Circulation*, 2001. 103(17): p. 2144-2152.
39. Tsutsui, H., et al., *Lumen Loss in Transplant Coronary Artery Disease Is a Biphasic Process Involving Early Intimal Thickening and Late Constrictive Remodeling*. *Circulation*, 2001. 104(6): p. 653-657.
40. Hernandez, J.M., et al., *Virtual histology intravascular ultrasound assessment of cardiac allograft vasculopathy from 1 to 20 years after heart transplantation*. *J Heart Lung Transplant*, 2009. 28(2): p. 156-62.
41. Day, J.D., et al., *Cardiac allograft vasculopathy: the central pathogenetic role of ischemia-induced endothelial cell injury*. *J Heart Lung Transplant*, 1995. 14(6 Pt 2): p. S142-9.
42. Gaudin, P.B., et al., *Peritransplant Injury to the Myocardium Associated with the Development of Accelerated Arteriosclerosis in Heart Transplant Recipients*. *The American Journal of Surgical Pathology*, 1994. 18(4): p. 338-346.

43. Furukawa, Y., et al., *Cold ischemia induces isograft arteriopathy, but does not augment allograft arteriopathy in non-immunosuppressed hosts*. Am J Pathol, 2002. 160(3): p. 1077-87.
44. SHOSKES, D.A., N.A. PARFREY, and P.F. HALLORAN, *Increased Major Histocompatibility Complex Antigen Expression in Unilateral Ischemic Acute Tubular Necrosis in the Mouse*. Transplantation, 1990. 49(1): p. 201-207.
45. Herskowitz, A., et al., *Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium*. Am J Pathol, 1995. 146(2): p. 419-28.
46. Yun, J.J., et al., *Early and Late Chemokine Production Correlates With Cellular Recruitment in Cardiac Allograft Vasculopathy*. Transplantation, 2000. 69(12): p. 2515-2524.
47. Isobe, M., H. Kosuge, and J. Suzuki, *T cell costimulation in the development of cardiac allograft vasculopathy: potential targets for therapeutic interventions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(7): p. 1447-56.
48. Adams, D.H., L.R. Wyner, and M.J. Karnovsky, *Experimental graft arteriosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of lesion development*. Transplantation, 1993. 56(4): p. 794-9.
49. Russell, P.S., C.M. Chase, and R.B. Colvin, *Alloantibody- and T cell-mediated immunity in the pathogenesis of transplant arteriosclerosis: lack of progression to sclerotic lesions in B cell-deficient mice*. Transplantation, 1997. 64(11): p. 1531-6.
50. Sipahi, I. and R.C. Starling, *Cardiac allograft vasculopathy: an update*. Heart Fail Clin, 2007. 3(1): p. 87-95.
51. Nagano, H., et al., *Coronary arteriosclerosis after T-cell-mediated injury in transplanted mouse hearts: role of interferon-gamma*. Am J Pathol, 1998. 152(5): p. 1187-97.
52. Ramzy, D., et al., *Cardiac allograft vasculopathy: a review*. Can J Surg, 2005. 48(4): p. 319-27.
53. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Basic Immunology Function and Disorders of the Immune System*. Second ed2007: Saunders.
54. Young, J.B., et al., *Inability of isolated soluble interleukin-2 receptor levels to predict biopsy rejection scores after heart transplantation*. Transplantation, 1991. 51(3): p. 636-41.
55. Young, J.B., et al., *The relationship of soluble interleukin-2 receptor levels to allograft arteriopathy after heart transplantation*. J Heart Lung Transplant, 1992. 11(3 Pt 2): p. S79-82.
56. Young, J.B., et al., *Elevated soluble interleukin-2 receptor levels early after heart transplantation and long-term survival and development of coronary arteriopathy*. J Heart Lung Transplant, 1991. 10(2): p. 243-50.

57. Weis, M., et al., *Soluble interleukin-2-receptor levels as a marker of coronary microvascular dysfunction after heart transplantation*. J Heart Lung Transplant, 1998. 17(3): p. 294-8.
58. Tellides, G. and J.S. Pober, *Interferon- $\gamma$  Axis in Graft Arteriosclerosis*. Circulation Research, 2007. 100(5): p. 622-632.
59. George, J.F., *Immunosuppressive Modalities*, in *Heart Transplantation*, J.K. Kirklin, J.B. Young, and D.C. McGiffin, Editors. 2002, Churchill Livingstone: Philadelphia. p. 390-463.
60. Onrust, S.V. and L.R. Wiseman, *Basiliximab*. Drugs, 1999. 57(2): p. 207-13; discussion 214.
61. Kahan, B.D., P.R. Rajagopalan, and M. Hall, *Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody*. United States Simulect Renal Study Group. Transplantation, 1999. 67(2): p. 276-84.
62. Mehra, M.R., et al., *International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010*. J Heart Lung Transplant, 2010. 29(7): p. 717-27.
63. Stehlik, J., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report--2010*. J Heart Lung Transplant, 2010. 29(10): p. 1089-103.
64. Chapman, T.M. and G.M. Keating, *Basiliximab: a review of its use as induction therapy in renal transplantation*. Drugs, 2003. 63(24): p. 2803-35.
65. Segovia, J., et al., *A randomized multicenter comparison of basiliximab and muromonab (OKT3) in heart transplantation: SIMCOR study*. Transplantation, 2006. 81(11): p. 1542-8.
66. Agüero, J., et al., *Influence of immunosuppressive regimens on short-term morbidity and mortality in heart transplantation*. Clin Transplant, 2008. 22(1): p. 98-106.
67. Nashan, B., et al., *Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients*. CHIB 201 International Study Group. Lancet, 1997. 350(9086): p. 1193-8.
68. Koch, M., et al., *Basiliximab induction therapy in kidney transplantation: benefits for long term allograft function after 10 years?* Biologics, 2009. 3: p. 51-6.
69. Botas, J., et al., *Influence of Preexistent Donor Coronary Artery Disease on the Progression of Transplant Vasculopathy : An Intravascular Ultrasound Study*. Circulation, 1995. 92(5): p. 1126-1132.
70. Cale, R., et al., *The value of routine intracoronary ultrasound to assess coronary artery disease in cardiac allograft recipients*. Rev Port Cardiol, 2010. 29(2): p. 231-41.

71. Konig, A., et al., *Assessment of early atherosclerosis in de novo heart transplant recipients: analysis with intravascular ultrasound-derived radiofrequency analysis*. J Heart Lung Transplant, 2008. 27(1): p. 26-30.
72. Cai, Q., et al., *Cardiac allograft vasculopathy: advances in diagnosis*. Cardiol Rev, 2011. 19(1): p. 30-5.
73. Logani, S., et al., *Clinical Utility of Intravascular Ultrasound in the Assessment of Coronary Allograft Vasculopathy: A Review*. J Interv Cardiol, 2010.
74. Kobashigawa, J.A., et al., *Multicenter intravascular ultrasound validation study among heart transplant recipients: outcomes after five years*. J Am Coll Cardiol, 2005. 45(9): p. 1532-7.
75. Nissen, S.E., et al., *Effect of Recombinant ApoA-I Milano on Coronary Atherosclerosis in Patients With Acute Coronary Syndromes: A Randomized Controlled Trial*. JAMA, 2003. 290(17): p. 2292-2300.
76. Mehran, R., et al., *Validation of the in vivo intravascular ultrasound measurement of in-stent neointimal hyperplasia volumes*. J Am Coll Cardiol, 1998. 32(3): p. 794-9.
77. Nissen, S.E., et al., *Effect of Very High-Intensity Statin Therapy on Regression of Coronary Atherosclerosis*. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 2006. 295(13): p. 1556-1565.

## 7. PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
Núcleo de Bioética  
Comitê de Ética em Pesquisa  
*Ciência com Consciência*

### PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0005154/11**

Protocolo CEP Nº **6189**

Título do projeto **Impacto da terapia de indução com Basiliximab no desenvolvimento da vasculopatia do enxerto**

Grupo  
Versão **1**

Protocolo CONEP **1322.0.000.084-11**

Pesquisador responsável **Ricardo Wang**

Instituição **Irmadade Santa Casa de Misericórdia de Curitiba**

#### Objetivos

##### OBJETIVO(S) GERAL(IS)

Avaliar o impacto do crescimento da íntima (doença vascular do enxerto), medido pelo volume da camada intimal pelo ultrassom intracoronário (IVUS), com uso de inibidor do receptor de interleucina 2.

##### OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S)

Correlacionar o uso de Basiliximab com perfil imunológico medido através do painel reator. Correlacionar dados clínicos e demográficos com vasculopatia.

#### Comentários e considerações

Estudo retrospectivo em prontuários de até 12 pacientes que foram submetidos a transplante cardíaco no período de 2007 a 2011. Para realização do estudo, os pacientes serão separados em dois grupos. Pacientes que receberam indução com Basiliximab e o Grupo 2: controle, estão não receberam nenhuma terapia de indução (anterior a 04/2008).

O atual projeto tem como finalidade em comparar as imagens do IVUS no momento imediato ao transplante com imagens de ano após o transplante cardíaco, avaliando a história natural da progressão da vasculopatia, e o impacto do bloqueio destes receptores nesse crescimento.

Será analisado o banco de dados do serviço de transplante cardíaco da Santa Casa de Curitiba, no período compreendido entre janeiro de 2007 a janeiro de 2011.

##### Critérios de inclusão

- Todos os paciente submetidos a transplante cardíaco, que foram submetidos a avaliação com IVUS, no pós transplante cardíaco imediato e que tenham realizado controle anual com IVUS;
- Paciente com acompanhamento clínico de pelo menos 01 anos pós transplante cardíaco;

##### Critérios de exclusão

- Imagens do ultrassom inadequados para avaliação;

#### Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.

O TCLE não se aplica por utilizar banco de dados.

Termo de utilização de banco de dados está em conformidade com a resolução CNS/CONEP.

#### Conclusões

O estudo utiliza apenas prontuários, desta forma, com a documentação anexa, atende aos requisitos de pesquisa com seres humanos da resolução 196/96.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **29/06/2011**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.



Processo Nº 0005154/11

Protocolo CEP Nº 6189

Título do projeto **Impacto da terapia de indução com Basiliximab no desenvolvimento da vasculopatia do enxerto**

Grupo  
Versão 1

Protocolo CONEP 1322.0.000.084-11

Pesquisador responsável **Ricardo Wang**

Instituição **Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Curitiba**

### Situação Aprovado

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 29 de Junho de 2011.



**Prof. MSc. Naim Akel Filho**  
**Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**  
**PUC PR**

