

CECÍLIA BEATRIZ BITTENCOURT VIANA CRUZ

**Avaliação de rejeição aguda em pacientes
transplantados cardíacos pela técnica de
*speckle tracking***

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

Programa de Cardiologia

Orientadora: Profa. Dra. Jeane Mike Tsutsui

**SÃO PAULO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cruz, Cecília Beatriz Bittencourt Viana
Avaliação de rejeição aguda em pacientes
transplantados cardíacos pela técnica de speckle
tracking / Cecília Beatriz Bittencourt Viana Cruz. --
São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientadora: Jeane Mike Tsutsui.

Descritores: 1.Transplante cardíaco 2.Rejeição de
enxerto 3.Ecocardiografia 4.Função ventricular
esquerda 5.Função ventricular direita 6.Dinâmica
ventricular 7.Ecocardiografia com speckle tracking

USP/FM/DBD-456/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Conheça todas as teorias, domine
todas as técnicas, mas ao tocar
uma alma humana seja apenas
outra alma humana.*

Carl G. Jung

Dedico este trabalho àqueles a quem amo incondicionalmente:

Ao meu pai, espelho de minha vida acadêmica, que me mostrou não existir obstáculo na realização de um sonho, estendendo sempre sua mão amiga nos momentos em que tive medo de falhar. Sua colaboração foi imprescindível na realização desse trabalho.

À minha mãe, minha estrela guia, demonstração incansável de perseverança, fé e coragem. Exemplo de vida, motivo constante de orgulho e admiração.

À minha irmã, por vibrar comigo a cada conquista.

À minha sobrinha Juliana, pelas coisas simples, mas imprescindíveis que tornam a vida bela.

À minha tia Joana Angélica, que me acolheu com tanto carinho, por estar sempre ao meu lado nos bons e nos maus momentos.

AGRADECIMENTOS

Sempre achei esta a pior parte da tese para escrever, talvez porque a vida não se coloca em análise de regressão e não é pelo valor de “p” que descobrimos a significância das pessoas nessa trajetória.

Agradeço:

A Deus, por me guiar, por me iluminar e por dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos.

À minha orientadora Profa. Dra. Jeane Mike Tsutsui, pelo exemplo de pesquisadora e profissional, por depositar em mim sua confiança e por ter me ensinado muito mais do que as páginas dessa tese podem demonstrar.

À Profa. Dra. Ludhmila Abrahão Hajjar, por sua disponibilidade sem limites, perspicazes comentários e sugestões em todas as fases da pesquisa. Professora no sentido mais pleno da palavra.

Ao Prof. Dr. Fernando Bacal, pelo incentivo e confiança na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Wilson Mathias Jr., pelo apoio, confiança e por me incentivar sempre.

À Júlia Fukushima, pelo apoio e brilhante trabalho estatístico.

Ao Dr. João Sbano, pela paciência, companheirismo e amizade.

Ao Dr. Altamiro Osório, pela parceria, motivação, conselhos e perseverança.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vieira, pelos ensinamentos e companheirismo.

Aos Drs. Márcio Lima (meu conterrâneo) e Marco Lofrano-Alves, por acreditarem e participarem deste projeto desde o começo. Obrigada por estarem juntos me apoiando e ajudando sempre.

À Dra. Maria Cristina Abud, pelos valiosos ensinamentos na técnica *speckle tracking*.

Às Dras. Maria Carolina Soeiro e Thaisa Katz, que me ajudaram a carregar o fardo quando o peso era difícil para um ombro só.

Aos amigos e colegas do Serviço de Ecocardiografia do InCor, pelos momentos agradáveis de convívio: Dra. Glaucia M. P. Tavares, Dra. Marta Lima, Dra. Mirian M. Pardi, Dra. Suzana P. Salum, Dr. Danilo Moleta, Dra. Claudia R. P. de Castro, Dra. Renata de Sá Cassar, Dra. Renata N. Rossi, Dra. Renata P. B. Mendes, Dra. Aline C. S. Appezzato.

À equipe administrativa do Serviço de Ecocardiografia do InCor, Telma C. B. de Souza, Adriana C. Xavier, Cristiane de C. Lima, Camila Manduca, pela gentileza, simpatia e disponibilidade em ajudar sempre.

À equipe de enfermagem do Serviço de Ecocardiografia do InCor, pela paciência e apoio.

Aos residentes do Serviço de Ecocardiografia do InCor, pelo carinho e aprendizado constante.

Aos amigos médicos assistentes da Unidade de Transplante Cardíaco, pela ajuda na seleção dos pacientes.

Aos colegas da pós-graduação Dr. Bruno Tavares, Dr. Miguel Osman, Dr. Marcio M. Brito, Dr. Fernando Carvalho e Dr. Anderson Duque, pelo companheirismo e amizade

Aos amigos e colegas do Serviço de Ecocardiografia do Grupo Fleury, Hospital Sírio Libanês e ICESP.

Às Dras. Tatiana Rocha, Fabiana Camelier, Daniela Rassi, Viviane Hotta e Marcela Lima por me oferecerem segurança e amizade nos momentos difíceis.

Às Dras. Kity Nobre e Ana Lúcia Arruda, pelos conselhos e por me fazerem sorrir nos momentos adversos.

Às amigas do ICESP, Dra. Isabela Bispo, Dra. Silvia Molin, Dra. Cristina Bittar, Dra. Carolina Maria Pinto, Dra. Bruna Leal e Dra. Juliana Sobral, pela parceria, convivência e apoio

Aos membros participantes da minha banca de qualificação Dr. Vitor Issa e Dra. Ana Clara Tude, pelas sugestões valiosas que contribuíram para finalização dessa tese.

À Comissão de Pós-graduação, Neusa Dini, Juliana L. Sobrinho e Valdecira.

Ao meu tio José Antônio, pelo companheirismo constante.

Aos meus avós paternos (*in memoriam*), José Bittencourt Cruz e Beatriz L. Cruz e aos meus avós maternos (*in memoriam*), José Viana e Cecília B. Viana, que no plano espiritual vibram comigo pela realização desse sonho. Saudades eternas!

Ao meu cunhado João, figura ímpar.

À minha grande família Bittencourt Viana Cruz, por me incentivar de perto ou de longe e vibrar com cada novo aprendizado e conquista.

A todos os pacientes, que participaram espontaneamente desse trabalho. Por causa deles, é que foi possível a concretização desse projeto. Vocês merecem o meu muito obrigada.

Finalmente, gostaria de agradecer ao InCor, por abrir as portas para que eu pudesse realizar este sonho. Proporcionou-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma lição de vida.

Muitas pessoas foram direta ou indiretamente importantes na elaboração desta tese, impossível citar todos, difícil selecionar os principais, afinal todos foram muito importantes, por isso muito obrigada a todas as pessoas que estiveram presentes nesta fase tão importante para o meu crescimento pessoal e científico.

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Lista de abreviaturas e siglas | |
| Lista de figuras | |
| Lista de quadros | |
| Lista de tabelas | |
| Lista de gráficos | |
| Resumo | |
| Abstract | |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Rejeição Cardíaca | 3 |
| 1.1.1 Diagnóstico de rejeição cardíaca | 5 |
| 1.1.2 Papel da ecocardiografia na avaliação de rejeição cardíaca | 7 |
| 1.2 Ecocardiografia com <i>Speckle Tracking</i> | 9 |
| 1.3 Aplicações Clínicas da Técnica de <i>Speckle Tracking</i> | 11 |
| 1.4 Peptídeos Natriuréticos e Rejeição Cardíaca | 13 |
| 1.5 Troponina e Rejeição Cardíaca | 14 |
| 1.6 Hipóteses | 17 |
| 2 OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 Objetivos Primários | 19 |
| 2.2 Objetivo Secundário | 19 |
| 3 MÉTODOS | 20 |
| 3.1 População de Estudo | 21 |
| 3.2 Critérios de Inclusão..... | 22 |
| 3.3 Critérios de Exclusão..... | 22 |
| 3.4 Aspectos Éticos | 23 |
| 3.5 Protocolo de Estudo | 23 |
| 3.5.1 Ecocardiograma convencional | 25 |
| 3.5.2 Ecocardiograma com técnica de <i>speckle tracking</i> | 27 |
| 3.5.3 Quantificação da dinâmica ventricular pelo <i>speckle tracking</i> | 28 |
| 3.5.4 Análise do peptídeo natriurético cerebral | 33 |
| 3.5.5 Dosagem da troponina - método troponina ultrasensível | 33 |
| 3.6 Análise Estatística | 34 |
| 4 RESULTADOS..... | 36 |
| 4.1 Características Clínicas..... | 37 |
| 4.2 Ecocardiograma Convencional..... | 40 |
| 4.3 Análise da Mecânica de Contração - Eixo Longitudinal..... | 43 |
| 4.3.1 <i>Strain e strain rate</i> longitudinal..... | 43 |
| 4.3.2 Análise de reprodutibilidade | 45 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.4 | Análise da Mecânica Global de Contração - Eixo Transverso..... | 45 |
| 4.4.1 | <i>Strain e strain rate</i> circunferencial e radial | 45 |
| 4.4.2 | <i>Twist</i> do ventrículo esquerdo | 46 |
| 4.4.3 | Troponina I e BNP..... | 47 |
| 4.5 | Preditores de Rejeição Celular Aguda Significativa..... | 47 |
| 5 | DISCUSSÃO | 51 |
| 5.1 | Limitações do Estudo | 58 |
| 6 | CONCLUSÕES | 60 |
| 7 | ANEXOS | 62 |
| 8 | REFERÊNCIAS..... | 73 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| AE | - Átrio esquerdo |
| ANP | - Peptídeo natriurético atrial (<i>atrial natriuretic peptide</i>) |
| AUC | - Área embaixo da curva |
| BEVD | - Biópsia endomiocárdica de ventrículo direito |
| BNP | - Peptídeo natriurético cerebral (<i>brain natriuretic peptide</i>) |
| CAPPesq | - Comitê de Ética em Pesquisa |
| DCRTC | - Disfunção cardíaca relacionada à terapia do câncer |
| DM | - Diabetes melitus |
| FAC | - Variação fracional da área |
| FEVE | - Fração de ejeção do ventrículo esquerdo |
| HAS | - Hipertensão arterial sistêmica |
| IC | - Intervalo de confiança |
| IMC | - Índice de massa corpórea |
| IMVE | - Índice de massa do ventrículo esquerdo |
| NT-proBNP | - Fragmento N-terminal do peptídeo natriurético tipo B |
| RCA | - Rejeição celular aguda significativa |
| SC | - Superfície corpórea |
| SCG | - <i>Strain</i> circunferencial global |
| SLG | - <i>Strain</i> longitudinal global |
| SLPL-VD | - <i>Strain</i> longitudinal da parede livre do VD |
| SRCG | - <i>Strain rate</i> circunferencial global |
| SRG | - <i>Strain</i> radial global |
| SRLG | - <i>Strain rate</i> longitudinal global |
| SRRG | - <i>Strain rate</i> radial global |
| TAPSE | - Excursão sistólica do plano anular tricúspide |
| TC | - Transplante cardíaco |
| TCLE | - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TDE | - Tempo de desaceleração da onda E |
| VD | - Ventrículo direito |
| VE | - Ventrículo esquerdo |
| Vel | - Velocidade |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Fluxograma do estudo | 24 |
| Figura 2 - Cálculo do <i>twist</i> do ventrículo esquerdo: diferença absoluta entre os valores de rotação apical e basal | 31 |
| Figura 3 - Exemplo de análise de <i>strain</i> longitudinal de ventrículo direito e radial | 32 |
| Figura 4 - Representação esquemática da população de estudo | 38 |
| Figura 5 - <i>Strain</i> longitudinal de parede livre do ventrículo direito (SLPL-VD) e biópsia endomiocárdica do ventrículo direito em pacientes transplantados cardíacos | 50 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Segmentação dos ventrículos esquerdo e direito realizada pelo programa EchoPAC para quantificação pelo método de <i>speckle tracking</i> | 29 |
| Quadro 2 - Análises realizadas nos eixos longitudinal e transversal do ventrículo esquerdo e no eixo longitudinal do ventrículo direito..... | 30 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes transplantados..... | 39 |
| Tabela 2 - Características demográficas, antropométricas e clínicas dos grupos | 40 |
| Tabela 3 - Variáveis ecocardiográficas convencionais | 42 |
| Tabela 4 - Parâmetros da mecânica dos ventrículos esquerdo e direito obtidos no eixo longitudinal pela ecocardiografia com <i>speckle tracking</i> | 44 |
| Tabela 5 - <i>Strain</i> e <i>strain rate</i> circunferencial e radial do ventrículo esquerdo obtidos no eixo transverso pela ecocardiografia com <i>speckle tracking</i> | 46 |
| Tabela 6 - Preditores de rejeição celular aguda significativa nos pacientes transplantados cardíacos obtidos pela análise multivariada..... | 48 |

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Valores de *strain* longitudinal de parede livre de ventrículo direito no grupo controle e nos grupos dos transplantados cardíacos com e sem rejeição celular aguda significativa (RCA)44
- Gráfico 2 - Curva de probabilidade de rejeição celular aguda de acordo com os valores de *strain* longitudinal da parede livre do ventrículo direito. O valor de corte foi estabelecido em 17,57%.....48
- Gráfico 3 - Valor do *strain* longitudinal da parede livre do ventrículo direito para o diagnóstico de rejeição celular aguda significativa em pacientes transplantados cardíacos49

RESUMO

Cruz CBBV. *Avaliação de rejeição aguda em pacientes transplantados cardíacos pela técnica de speckle tracking* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2018.

A rejeição é uma das principais complicações após transplante cardíaco (TC). A biópsia endomiocárdica do ventrículo direito (BEVD) continua a ser o padrão-ouro para seu diagnóstico. Há uma necessidade de alternativas não invasivas que permitam um diagnóstico seguro e precoce de rejeição cardíaca, antes do início dos sintomas clínicos. A ecocardiografia com *speckle tracking* (EST) permite a análise da dinâmica de contração ventricular, possibilitando a detecção precoce de disfunção miocárdica. Os objetivos deste estudo foram comparar os parâmetros da dinâmica ventricular obtidos com a EST em pacientes transplantados e indivíduos não transplantados cardíacos e avaliar o valor da EST e da dosagem sérica de troponina I e peptídeo cerebral natriurético (BNP), como ferramentas não invasivas para a detecção precoce de rejeição celular aguda significativa (RCA) após o TC. Entre janeiro de 2014 e novembro de 2017, foram estudados, prospectivamente, 49 pacientes transplantados cardíacos com função sistólica normal, tanto do ventrículo esquerdo (VE) como do direito (VD) submetidos à BEVD para vigilância ou por suspeita clínica de rejeição. A RCA foi definida como $\geq 2R$ pelos critérios da Sociedade Internacional para Transplante de Coração e Pulmão. Quarenta e nove indivíduos saudáveis pareados por idade e sexo constituíram o grupo controle. Todos os pacientes foram submetidos à ecocardiografia convencional e à EST. Os pacientes transplantados foram submetidos, horas antes da BEVD, à dosagem de troponina I e BNP séricos. Parâmetros ecocardiográficos clássicos, *strain* e *strain rate* longitudinal global, radial e circunferencial do VE, além de *strain* longitudinal da parede livre do VD (SLPL-VD) foram analisados. Os 49 pacientes transplantados cardíacos (média etária $45,2 \pm 11,5$ anos, 28 homens) foram submetidos a 66 biópsias entre 6-12 meses após o TC. A RCA foi detectada em 17 (26%) e ausência de RCA em 49 (74%) biópsias. *Strain* e *strain rate* longitudinal, circunferencial e radial globais do VE e SL-PLVD foram significativamente menores, em valores absolutos, nos grupos dos transplantados cardíacos do que no grupo controle. O SL-PLVD apresentou valor absoluto menor no grupo com RCA

do que no sem RCA ($-18,28 \pm 4,8\%$ versus $-22,11 \pm 2,9\%$; $p < 0,001$). Um valor de SL-PLVD $< 17,57\%$ (valor absoluto) teve sensibilidade de 71%, especificidade de 90%, valor preditivo positivo de 75%, acurácia de 84% e valor preditivo negativo de 88% para detecção de RCA. A dosagem da troponina I foi significativamente mais alta em pacientes com RCA ($p < 0,01$). A mediana para este grupo foi 0,19 [intervalo interquartil 0,09-1,31 ng/mL], versus 0,05 [intervalo interquartil, 0,01-0,18ng/mL] para o grupo sem RCA. Na análise multivariada, o SL-PLVD foi o único preditor independente de RCA com razão de chance de 1,70 (intervalo de confiança de 95% = 1,17-2,48); $p = 0,006$. Concluiu-se que o SL-PLVD derivado da EST foi marcador sensível e específico de RCA. Estes dados sugerem que esta técnica é adequada para detectar alterações na deformação ventricular direita durante um episódio de RCA.

Descritores: transplante cardíaco; rejeição de enxerto; ecocardiograma; função ventricular esquerda; função ventricular direita; dinâmica ventricular; ecocardiografia com *speckle tracking*.

ABSTRACT

Cruz CBBV. *Evaluation of acute cellular rejection in heart transplanted patients by speckle tracking echocardiography* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Rejection is a major complication after heart transplantation (HT). Right ventricular endomyocardial biopsy (EMB) remains the gold standard for diagnosis of rejection. There is a need for non-invasive alternatives that allow for a safe and early diagnosis of cardiac rejection prior to the onset of clinical symptoms. Speckle tracking echocardiography (STE) enables the analysis of left and right ventricular contraction dynamics, thus allowing for the early detection of myocardial dysfunction. The aims of the present study were to compare ventricular dynamics parameters obtained by STE in heart transplanted patients and control individuals. We also aimed to assess the value of STE, troponin I, and brain natriuretic peptide (BNP) serum levels as noninvasive tools for the early detection of significant acute cellular rejection (ACR) after HT. From January 2014 to November 2017, we prospectively studied 49 transplanted patients with normal left and right ventricular systolic function, who had undergone EMB for either surveillance or clinical suspicion of rejection. ACR was defined as $\geq 2R$ graded according to the revised International Society for Heart and Lung Transplantation by EMB. A total of 49 age- and sex-matched healthy individuals formed the control group. All studied patients underwent conventional echocardiography with the analysis of STE. The transplanted group also had their serum troponin I and BNP levels measured hours before undergoing EMB. Classic echocardiographic parameters left ventricular global longitudinal strain (LV-GLS), radial and circumferential strain and strain rate, and right ventricular free wall longitudinal strain (RV-FWLS) were analyzed. The 49 heart transplanted patients (mean age 45.2 ± 11.5 years, 28 men) underwent 66 biopsies, 6-12 months after HT. ACR was detected in 17 (26%) and no ACR in 49 (74%) of biopsies. LV-GLS, circumferential and radial strain and strain rate and RV-FWLS values were significantly lower in heart transplant group than in control group. RV-FWLS was lower (absolute value) in the group with ACR than in the group without ACR ($-18.28 \pm 4.8\%$ versus $-22.11 \pm 2.9\%$; $p < 0.001$). A RV-FWLS $< 17.57\%$ had 71% sensitivity, 90% specificity, 75% positive predictive value, 84% accuracy, and 88% negative predictive value for detection of

ACR. The troponin I level was significantly higher in patients with ACR ($p < 0.01$). The median value for this group was 0.19 [interquartile interval 0.09-1.31 ng/mL] vs. 0.05 [interquartile interval 0.01-0.18 ng/mL] for the group without ACR. In the multivariate analysis, RV-FWLS was the only independent predictor of ACR, with odds ratio of 1.70 (CI 95% = 1.17-2.48); $p = 0.006$. We concluded that STE-derived RV-FWLS was a sensitive and specific marker of ACR. Our data suggest that this is a suitable technique for noninvasive detection of changes in the right ventricular deformation during an episode of ACR.

Descriptors: cardiac transplantation; graft rejection; echocardiography; ventricular function, left; ventricular function, right; ventricular dynamics; speckle tracking echocardiography.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o transplante cardíaco (TC) é reconhecido como o melhor tratamento para pacientes com insuficiência cardíaca refratária. Quando uma criteriosa seleção é utilizada para a escolha do doador e receptor, há um aumento significativo na sobrevida, capacidade de exercício, retorno ao trabalho e qualidade de vida dos pacientes¹.

Uma das complicações que interfere no sucesso do TC, a despeito dos avanços na terapia imunossupressora, é a rejeição cardíaca. Esta aumenta a morbidade e a mortalidade, diminuindo a sobrevida do paciente transplantado se não for tratada adequadamente. Isso se dá, sobretudo, no primeiro ano após o TC. Sua ocorrência apresenta taxas que variam entre 36% e 50%, dependendo do protocolo de indução de tolerância².

A rejeição cardíaca pode ser mediada por células ou anticorpos e define-se por manifestações clínicas e/ou histopatológicas que se desenvolvem em surtos denominados episódios de rejeição. Com base no tempo após o TC e no mecanismo envolvido em sua ocorrência, pode ser classificada em vários tipos³. A rejeição aguda pode ser do tipo celular, humoral (mediada por anticorpos) ou mista. É descrita, ainda, a rejeição hiperaguda, que ocorre imediatamente ou nas primeiras horas após o TC.

1.1 Rejeição Cardíaca

A rejeição hiperaguda é mediada por anticorpos pré-formados, geralmente dirigidos contra o sistema ABO ou sistema antígeno leucocitário humano. É precoce, ocorrendo imediatamente ou poucas horas após o TC. O quadro histopatológico é semelhante ao da rejeição aguda humoral grave, com trombos fibrinosos na microcirculação, degeneração ou necrose da parede vascular, infiltrado inflamatório neutrofílico perivascular, acentuado edema e hemorragia intersticial⁴.

A rejeição aguda humoral (mediada por anticorpos), recentemente reconhecida como entidade clínica, tende a ocorrer em pacientes previamente alossensibilizados e está associada à pior evolução clínica e ao desenvolvimento da doença vascular do enxerto⁵. Entretanto, muitas dúvidas permanecem quanto aos critérios diagnósticos, à avaliação evolutiva e ao tratamento desse tipo de rejeição.

Atualmente, o principal marcador para o diagnóstico imunopatológico da rejeição humoral é a fração do complemento CD4 no capilar⁶. Devem ser consideradas positivas para rejeição humoral as alterações difusas ou multifocais, de intensidade fraca ou forte, quer seja por imunofluorescência ou imuno-histoquímica⁷. Com base neste racional, a nomenclatura mais recente para o diagnóstico de rejeição humoral, conforme a Sociedade Internacional de Transplante Cardíaco e Pulmonar^{7,8}, leva em consideração os achados anatomopatológicos, incluindo informações histológicas e imunopatológicas. A rejeição humoral é dividida em quatro graus:

- Grau 0: negativa para rejeição humoral (estudos histológicos e imunopatológicos negativos).

- Grau 1 (H+): rejeição humoral apenas histológica (ausência de achados imunopatológicos e presença de achados histológicos).
- Grau 1 (I+): rejeição humoral apenas pela imunopatologia (ausência de achados histológicos e presença de achados pela imunopatologia - CD4/CD3 e/ou CD68 positivos).
- Grau 2: definida pela presença de achados histológicos e imunopatológicos para rejeição humoral.
- Grau 3: rejeição humoral grave caracterizada pela presença de hemorragia, fragmentação capilar, inflamação polimórfica, edema intersticial e marcadores de imunopatologia.

Ainda existem limitações técnicas e dúvidas pertinentes em relação à melhor estratégia para o diagnóstico de rejeição humoral.

A rejeição celular aguda é a forma mais comum de rejeição. Pode ocorrer em qualquer tempo após o TC, mas é mais comum no primeiro ano. Este tipo de rejeição caracteriza-se, histologicamente, por vários níveis de infiltração linfocitária e agressão às fibras cardíacas⁴. Por vários anos, foi classificada em seis graus distintos, e, atualmente, é classificada em apenas três graus⁹.

- Grau 1R (rejeição leve, baixo grau), correspondente aos antigos graus 1A, 1B e 2: é caracterizado por infiltrado inflamatório linfocitário perivascular ou intersticial, pouco exuberante, sem agressão dos cardiomiócitos ou com apenas um foco de agressão.
- Grau 2R (rejeição moderada, grau intermediário), correspondente ao antigo grau 3A: é caracterizado pela presença de dois ou mais focos de agressão dos cardiomiócitos pelo infiltrado inflamatório, que é tipicamente multifocal, podendo conter alguns eosinófilos.

- Grau 3R (rejeição intensa, alto grau), equivalente aos antigos graus 3B e 4: é caracterizado pelo acometimento inflamatório dos vários fragmentos da biópsia, com padrão difuso em, ao menos, um deles, associado a múltiplas áreas de agressão celular.

Em adultos, na presença de grau maior ou igual a 2R, deve-se ajustar o esquema de imunossupressão empregado³. Com frequência, os pacientes são assintomáticos, mas, eventualmente, podem apresentar sintomas leves.

1.1.1 Diagnóstico de rejeição cardíaca

A monitoração da rejeição cardíaca deve ser contínua, em razão do risco de sua ocorrência em qualquer momento após o TC¹⁰. A biópsia endomiocárdica de ventrículo direito (BEVD) é considerada padrão-ouro para seu diagnóstico. Deve ser fixada em solução de formol tamponada a 10%, em temperatura ambiente e manuseada com cuidado. A BEVD deve conter, ao menos, três fragmentos distintos (preferencialmente, quatro ou mais), cada um deles constituído, ao menos, em 50% por miocárdio. Cortes histológicos sequenciais (ao menos, três níveis) devem ser corados pela hematoxilina-eosina, sendo aconselhável que níveis intermediários sejam guardados para eventuais colorações específicas ou imunohistoquímica. A coleta de fragmentos congelados para imunofluorescência, utilizando material a fresco, é facultativa a depender da experiência do serviço^{9,11}.

O grande problema desse procedimento é ser invasivo e associado a complicações que variam entre 0,2% e 5,5%, incluindo perfuração miocárdica, tamponamento cardíaco, lesão da valva tricúspide causando

regurgitação significativa e complicações relacionadas ao acesso venoso¹²⁻¹⁹. Outra limitação da BEVD é que a análise patológica é subjetiva e existe uma significativa variabilidade interobservador, o que compromete sua confiabilidade e reprodutibilidade²⁰⁻²². Além disso, é um procedimento caro, que está propenso a erros de amostragem, pela natureza irregular da rejeição e, mais importante, que gera desconforto a muitos pacientes.

Na maioria dos serviços, há um protocolo para realização das BEVDs em intervalos regulares nos primeiros meses após o TC, independente dos sintomas. A BEVD também é feita na presença de sinais ou sintomas sugestivos de rejeição, quando há alguma suspeita por outros exames não invasivos e para avaliar a resposta a seu tratamento.

Com o declínio observado ultimamente nas taxas e na menor gravidade dos episódios de rejeição, um grande número de BEVDs não apresenta rejeição clinicamente significativa, e sua realização sistemática vem sendo questionada²³. Entretanto, observa-se que outros marcadores não invasivos de rejeição cardíaca ainda apresentam menor sensibilidade. Desse modo, até os dias atuais, nenhum método não invasivo conseguiu substituir com segurança a necessidade de realização de BEVD²⁴. Nesse contexto, permanece a necessidade de busca por um método mais simples e eficiente para detecção de rejeição em pacientes submetidos a TC.

1.1.2 Papel da ecocardiografia na avaliação de rejeição cardíaca

O ecocardiograma é um exame fundamental no manuseio do paciente transplantado cardíaco. Trata-se de exame de baixo custo, grande disponibilidade, que pode ser realizado à beira leito e sem riscos ao paciente. Por meio desse método, monitoram-se a função cardíaca global e regional, dados hemodinâmicos, função diastólica de ambos os ventrículos, além de fornecer informações em relação ao grau de hipertensão arterial pulmonar e diagnóstico de alterações valvares e pericárdicas com grande acurácia.

As alterações histológicas decorrentes da rejeição cardíaca modificam, sobretudo, as propriedades de relaxamento e complacência do miocárdio, levando à dificuldade de enchimento ventricular. As alterações da função sistólica com comprometimento da função contrátil do ventrículo esquerdo (VE) são fenômenos mais tardios e, hoje, pouco identificados por meio dos métodos convencionais disponíveis^{25,26}.

O primeiro sinal ecocardiográfico descrito relacionado com a presença de rejeição foi o aumento da espessura de parede resultante do edema intersticial. Entretanto, a variação da espessura de parede pode ser sutil na maioria dos casos, com baixa sensibilidade e especificidade²⁷.

A presença de derrame pericárdico é comum no pós-operatório de TC. Porém, a piora do derrame, assim como o aparecimento de um novo derrame, podem estar relacionados com a ocorrência e gravidade da rejeição²⁸. A presença de alterações na função valvar, precocemente detectadas ao Doppler, também pode estar relacionada com rejeição

cardíaca²⁹. Quando se detecta rejeição leve ou em fase inicial, as alterações ao ecocardiograma bidimensional são sutis e não são específicas ou reprodutíveis o suficiente para permitir o ajuste dos medicamentos imunossupressores. As abordagens propostas para o diagnóstico precoce de rejeição vêm enfatizando medidas de disfunção diastólica, mais especificamente as medidas do relaxamento diastólico inicial. Muitos estudos utilizaram índices de função diastólica derivados da avaliação com o Doppler pulsado do fluxo transmitral para seu diagnóstico precoce, com análise do pico de velocidade de enchimento precoce (onda E), pico de velocidade de contração atrial (onda A), relação E/A, tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de desaceleração da onda E (TDE). Entretanto, estes parâmetros possuem limitações, sobretudo por sua dependência da frequência cardíaca (geralmente elevada em pacientes transplantados, com fusão das ondas E e A) e das condições de carga. Estudo com parâmetros derivados do fluxo de veias pulmonares e velocidade de propagação do fluxo intraventricular também apresentou resultados conflitantes³⁰. Por outro lado, demonstrou-se que parâmetros derivados do Doppler tecidual possuem um desempenho melhor, principalmente pela menor dependência da frequência cardíaca e das condições de carga. No entanto, esses parâmetros são sensíveis, mas não são específicos para detecção de rejeição.

1.2 Ecocardiografia com *Speckle Tracking*

Mais recentemente, uma nova metodologia foi desenvolvida para análise da deformação miocárdica por seguimento automático da movimentação de padrões pontilhados (*speckles*) inerentes à interface ultrassom-miocárdio. *Speckles* são pontilhados característicos do miocárdio, advindos da interface construtiva e destrutiva da onda de ultrassom, pela interação desta com pequenas partículas inferiores ao comprimento de onda. Estes padrões pontilhados, únicos como uma impressão digital no miocárdio, são identificados e seguidos ao longo do ciclo cardíaco. Pela técnica de ecocardiografia com *speckle tracking*, são gerados vetores representativos de movimentação multidirecional, com respectivos valores, e suas curvas são plotadas em função do tempo para múltiplos parâmetros: deslocamento, velocidade de deslocamento, *strain* e *strain rate*, além da rotação dos níveis transversos ventriculares. Todas estas análises integradas compõem a chamada dinâmica de contração ventricular, uma forma muito mais completa e sensível para caracterizar a função sistólica^{31,32}.

Strain corresponde à medida de deformação da parede ventricular, expressa como uma fração ou porcentagem da mudança de sua dimensão original³³. Pode ser descrita matematicamente por $\epsilon = L - L_0 / L_0$, onde ϵ corresponde ao *strain*, L comprimento final e L_0 ao comprimento inicial³⁴. Por outro lado, *strain rate* refere-se à velocidade com a qual essa deformação ocorre³³; representada pela equação $\epsilon(t) = L(t) - L(t_0) / L(t_0)$, sendo L(t) o comprimento do objeto no instante “t” e L(t₀) semelhante a L_0 (comprimento

inicial). Por sua vez, esta deformação, pode ocorrer no sentido longitudinal (estreitamento-alongamento), radial (espessamento-encurtamento) e circunferencial (rotação horária e anti-horária)³⁴. O termo rotação, avaliado no plano longitudinal, eixo curto, traduz a movimentação, em graus, dos pontos no sentido circunferencial. O termo torção deve ser usado para definir, da base ao ápice, o gradiente no ângulo de rotação do VE no eixo longitudinal, sendo expressa em graus/cm. A diferença absoluta entre as rotações da base e do ápice do VE equivale ao *twist*³³.

Algumas vantagens desta nova ferramenta ecocardiográfica são claramente identificadas em relação ao Doppler tecidual. A principal delas é a de não depender do ângulo de incidência do feixe de ultrassom. Além disso, as análises advindas do *speckle tracking* não estão sujeitas à interferência de tracionamento segmentar ou do movimento translacional do coração. A avaliação da região apical do VE, muito problemática com o Doppler tecidual, é mais facilmente realizada com essa nova técnica³³. Ainda, por motivo de incidência paralela do feixe de ultrassom, a avaliação da deformação radial das paredes inferior e anterior, não factível por Doppler tecidual, torna-se possível por *speckle tracking*. O mesmo problema também é contornado para avaliação de deslocamento e deformação na orientação circunferencial das paredes septal e inferolateral, quando, aqui, a incidência do feixe deveria ser paralela, e pelo Doppler tecidual tende a ser perpendicular. Como o *speckle tracking* avalia a movimentação dos padrões pontilhados existentes no miocárdio, independentemente de ângulo de incidência de feixe, não tem esta limitação³².

1.3 Aplicações Clínicas da Técnica de *Speckle Tracking*

A concepção da arquitetura muscular miocárdica mais aceita pela comunidade científica foi proposta por Torrent-Guasp *et al.*³⁵, que descreve o miocárdico como uma faixa muscular dobrada em dupla hélice, com fibras musculares endocárdicas longitudinais, circunferenciais no terço médio e oblíquas no epicárdio. Em termos de gasto energético, essa arquitetura leva a uma forma mais eficiente de contração, comparando-se com a simples contração no sentido radial. Hoje, sabe-se que a base do VE contrai em rotação no sentido horário, em oposição à rotação anti-horária apical. Esta oposição de rotações é chamada de *twist*, quando normalizada pelo comprimento do VE, de torção, nomenclatura mais atual. A fisiologia de contração torcional, antes só avaliada por ressonância magnética cardíaca e sonomicrometria (em modelos experimentais), atualmente, também pode ser avaliada de forma não invasiva por *speckle tracking*^{35,36}. O uso da técnica de *speckle tracking* para estas avaliações foi testado e validado por estes métodos padrão-ouro, mostrando excelente correlação^{37,38}.

Considerando-se o potencial desta nova técnica, é fundamental conhecer sua real capacidade de diagnosticar a rejeição de forma não invasiva, para que sejam considerados a redução do número de BEVDs e o ajuste precoce dos medicamentos imunossupressores.

Até o momento, a maioria das publicações com o uso de ecocardiografia com *speckle tracking* é voltada para sua validação em diversas áreas de interesse (função sistólica e diastólica, avaliação de dissincronia, detecção de isquemia e áreas infartadas, entre outras)³⁹⁻⁴⁴. Sua aplicação em uma população de pacientes transplantados ainda é controversa, mas vem

recebendo atenção nos últimos anos. Em um primeiro estudo, realizado com ratos submetidos ao TC, os valores do *strain* radial mostraram-se bastante diferentes no grupo com rejeição comparado ao grupo sem rejeição cardíaca⁴⁵.

Mais recentemente, Ambardekar *et al.*⁴⁶ estudaram, retrospectivamente, um grupo com 30 pacientes transplantados que apresentaram alguma BEVD com rejeição e um grupo-controle composto por 14 pacientes transplantados que não apresentavam nenhuma BEVD com rejeição. Não foram encontradas diferenças significativas nas variáveis *strain* longitudinal global do VE e *strain* circunferencial entre ecocardiogramas basais, os ecocardiogramas realizados no período da rejeição e o exame feito após sua resolução nos pacientes que cursaram com rejeição. Não houve diferenças entre os grupos com e sem rejeição quanto às variáveis estudadas.

Em outro estudo com 34 pacientes, Mingo-Santos *et al.*⁴⁷ concluíram que a combinação do *strain* longitudinal global do VE e o *strain* longitudinal da parede livre do VD (SLPL-VD) podem ajudar a identificar um grupo de transplantados que, provavelmente, não apresentará rejeição.

Na literatura, há, ainda, controvérsias sobre os índices de deformação em corações transplantados em comparação aos corações não transplantados, assim como sobre o comportamento desses índices com o passar do tempo. Baixos índices podem estar associados com incidências maiores de morte e eventos cardíacos adversos^{48,49}.

Todos os relatos concluem que mais estudos são necessários para uma definição mais segura do papel do ecocardiograma com *speckle tracking* no paciente transplantado.

1.4 Peptídeos Natriuréticos e Rejeição Cardíaca

O peptídeo natriurético cerebral (*brain natriuretic peptide* [BNP]) é o hormônio homólogo ao peptídeo natriurético atrial (*Atrial natriuretic peptide* [ANP]), sendo a porção fisiologicamente ativa constituída de 32 aminoácidos⁵⁰.

Inicialmente, o BNP foi identificado no cérebro e, posteriormente, no coração, sobretudo em miócitos do ventrículo. Apresenta baixas concentrações plasmáticas em condições fisiológicas, com aumento significativo em situações patológicas, como hipertrofia ventricular e insuficiência cardíaca⁵⁰.

O BNP tem sua secreção regulada pela tensão na parede miocárdica. Apresenta níveis plasmáticos elevados na insuficiência cardíaca sistólica e/ou diastólica, assim como em casos com sobrecarga de volume, revelando ser preditor no desenvolvimento de insuficiência cardíaca e de mortalidade cardiovascular⁵¹⁻⁵³.

O BNP também vem sendo estudado como método no diagnóstico de rejeição em pacientes adultos submetidos a TC. Seu nível sanguíneo vem se mostrando elevado durante episódios de rejeição após o TC, independente das alterações hemodinâmicas ou da função ventricular. Em estudos experimentais, este aumento tem sido relacionado à interação do BNP com o sistema imunológico^{54,55}. Estudos com imunohistoquímica mostram que o BNP é produzido, além dos cardiomiócitos, por células T, macrófagos e células endoteliais, com sua liberação estimulada por citocinas como interleucinas e fator de necrose tumoral, presentes na fase aguda do processo inflamatório⁵⁵.

Na população adulta, estudos mostram que os níveis sanguíneos de BNP mantêm-se elevados nos primeiros 2 meses após o transplante, impossibilitando o diagnóstico de rejeição. Seus níveis são reduzidos de forma progressiva em um período de 6 meses, quando, então, se pode observar correlação com os achados histológicos da rejeição^{56,57}.

Em 2008, Martinez-Doltz *et al.*⁵⁸ avaliaram o BNP em um período entre 9 e 12 meses após TC. Os autores observaram maior número de eventos como morte, rejeição tardia (após o primeiro ano) ou disfunção do enxerto, nos pacientes com aumento maior que 20% dos níveis de BNP. Rossano *et al.*⁵⁹, comparando os níveis sanguíneos de BNP e os achados histológicos da BEVD, mostraram correlação entre a elevação dos níveis de BNP acima de 100 pg/mL e a presença de rejeição cardíaca.

No entanto, na literatura há controvérsias a respeito de valores absolutos ou percentuais dos níveis séricos de BNP que definem a rejeição cardíaca.

1.5 Troponina e Rejeição Cardíaca

As troponinas são proteínas contidas nas células musculares, no aparelho miofibrilar que constituem o sarcômero. São compostas de múltiplas subunidades: troponina I (subunidade inibidora da actina), troponina C (subunidade ligada ao cálcio e reguladora da contração) e troponina T (subunidade ligada à miosina-tropomiosina). A troponina C é idêntica tanto no músculo esquelético como cardíaco, mas os genes codificadores das troponinas I e T, cardíaca e esquelética, são diferentes, o

que permitiu que anticorpos monoclonais de reatividade cruzada extremamente baixa pudessem ser desenvolvidos, facilitando o diagnóstico de injúria miocárdica⁶⁰. Estudos realizados com troponina I não conseguiram encontrá-la fora do coração, em qualquer estágio de desenvolvimento neonatal. Em contraste, a troponina T é expressa, em menor grau, no músculo esquelético^{61,62}.

Dados recentes indicam que alguns pacientes com doença do músculo esquelético podem ter proteínas detectadas pelos anticorpos, na pesquisa laboratorial de troponina T. Isto implica que o músculo esquelético pode, em alguns pacientes, ser a fonte para elevações de troponina T detectadas no sangue⁶³. No entanto, na maioria dos cenários clínicos, sua especificidade deverá ser comparável à da troponina I. Apesar de troponina I e troponina T serem marcadores específicos da lesão miocárdica, há variações na sensibilidade e especificidade dos vários ensaios^{64,65}. Isto está relacionado com a falta de normatização, a presença de modificação troponina I e troponina T no soro, e as variações nas reações cruzadas de anticorpos com as diversas formas detectáveis de troponina resultante de sua degradação^{65,66}.

A detecção de troponina sérica é uma ferramenta padrão na detecção precoce da lesão isquêmica em síndromes coronarianas agudas. A rejeição cardíaca está também associada com necrose de cardiomiócitos, podendo ocorrer, portanto, liberação de troponina cardíaca^{67,68}. Nos últimos anos, vêm surgindo estudos na tentativa de correlacionar níveis séricos de troponina T e alguns poucos de troponina I com episódios de rejeição

cardíaca. Os primeiros estudos mostraram que a troponina T e I não são indicadores úteis de rejeição cardíaca^{69,70}. Outros, mais recentes, mostram que a troponina T parece ser uma adição potencialmente útil para os resultados das biópsias endomiocárdicas⁷⁰⁻⁷².

A baixa sensibilidade dos métodos convencionais para determinar os níveis séricos de troponinas cardíacas limita sua aplicabilidade clínica nesse grupo de pacientes em que a liberação inicial é de muito baixa magnitude⁷². Nos últimos anos, foram desenvolvidos métodos de dosagem com sensibilidade elevada, que podem reduzir significativamente os limites de detecção e podem permitir sua utilização como uma ferramenta clínica para a monitorização da rejeição do enxerto agudo. Um estudo piloto de publicação recente avaliou a associação de níveis de troponina T e fragmento N-terminal do peptídeo natriurético tipo B (NT-proBNP) com rejeição cardíaca em pacientes pediátricos submetidos ao TC. Nesse estudo, foi encontrada elevação marcada de troponina T e NT-proBNP entre as crianças transplantadas com rejeição cardíaca. Utilizou-se um método novo, altamente sensível para a troponina T, que detecta níveis entre 10 e 100 vezes menores do que os ensaios padrões⁷³.

1.6 Hipóteses

As hipóteses do presente estudo foram:

- O coração transplantado pode ter uma dinâmica de contração ventricular própria.
- Os pacientes transplantados com diagnóstico de rejeição celular aguda $\geq 2R$ e função sistólica biventricular preservada podem ter alteração na dinâmica da contração ventricular.
- Os pacientes transplantados com diagnóstico de rejeição celular aguda $\geq 2R$ e função sistólica biventricular preservada podem ter alteração nos níveis séricos de BNP e troponina I.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Primários

Avaliar a dinâmica de contração ventricular do coração transplantado quanto aos parâmetros obtidos pela ecocardiografia com *speckle tracking* e estudar o valor dessa técnica para detecção precoce de rejeição celular aguda $\geq 2R$ em pacientes submetidos a transplante cardíaco.

2.2 Objetivo Secundário

Avaliar a associação de níveis séricos de BNP e troponina I com rejeição celular aguda $\geq 2R$ em pacientes submetidos a transplante cardíaco.

3 MÉTODOS

3.1 População de Estudo

Entre maio de 2014 e novembro de 2017, foram estudados, de forma prospectiva, pacientes transplantados cardíacos, acompanhados no Serviço de Transplante do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo que foram submetidos à BEVD entre os 6º e 10º segundo meses após o TC. As biópsias foram realizadas seguindo o protocolo de acompanhamento de pacientes transplantados cardíacos da instituição, ou quando havia qualquer suspeita clínica de rejeição cardíaca.

Paralelamente, formou-se um grupo controle de indivíduos sem história clínica de doenças que sabidamente interferem na fisiologia de deformação, rotação e torção miocárdicas. Os indivíduos desse grupo não tinham arritmia significativa, fibrilação atrial na monitorização eletrocardiográfica no momento do exame, ou uso de marcapasso. O grupo controle foi pareado com o grupo transplantado cardíaco, de acordo com a idade e sexo.

3.2 Critérios de Inclusão

Foram estudados pacientes que atendiam aos seguintes critérios de inclusão:

- Idade \geq 18 anos com, no mínimo, 6 meses e, no máximo, 12 meses após TC ortotópico, submetidos à BEVD, de acordo com o protocolo do serviço.
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A).

3.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os pacientes que tinham um dos seguintes critérios:

- Janela ecocardiográfica limitada para análise de ecocardiografia com a técnica de *speckle tracking*.
- Fibrilação atrial ou outro ritmo cardíaco irregular no momento do exame ecocardiográfico.
- Rejeição humoral.
- BEVD com evidência de reativação de doença de Chagas.
- BEVD com material insuficiente ou diagnóstico inconclusivo.
- Doença vascular do enxerto.
- Alteração de motilidade segmentar de VE.
- Disfunção sistólica de VE (fração de ejeção \leq 55 %).
- Disfunção sistólica de VD (variação fracional de área \leq 34%).
- Insuficiência renal crônica.

3.4 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração (SDC 3963/13/088) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os participantes incluídos foram informados sobre os procedimentos a serem realizados, concordaram em participar do estudo e assinaram ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que consta no Anexo B.

3.5 Protocolo de Estudo

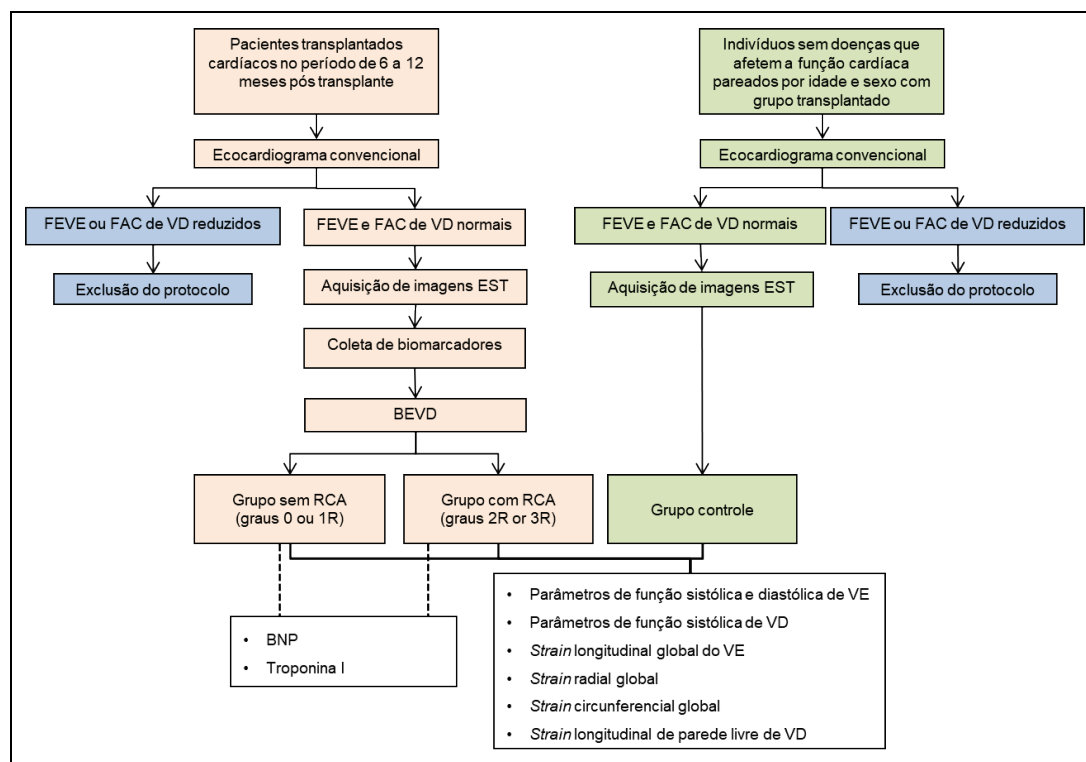
Os pacientes foram submetidos a interrogatório clínico e exame físico completo e as informações referentes à idade, sexo, peso, altura, motivo e tempo do TC, e terapia medicamentosa vigente foram armazenadas em banco de dados.

Todos os pacientes transplantados incluídos no estudo foram submetidos, horas antes à realização da BEVD, ao ecocardiograma convencional com análise completa das funções sistólica e diastólica, assim como aquisição específica de imagens para análise pela técnica de *speckle tracking*. Os pacientes que tinham função sistólica biventricular normal foram submetidos à coleta de amostra sanguínea para dosagem de BNP e troponina I, no momento da preparação para BEVD. Cada paciente poderia realizar mais de um procedimento de BEVD. Os resultados das BEVDs foram divididos de acordo com o resultado anatomopatológico em biópsias sem rejeição celular aguda significativa (RCA) (rejeição grau 0 ou grau 1R) e

biópsias com RCA (rejeição grau 2R ou 3R), ou seja, que necessitavam de tratamento com pulsoterapia.

Os indivíduos do grupo controle também foram submetidos ao ecocardiograma convencional com análise completa das funções sistólica e diastólica, assim como aquisição específica de imagens para análise pela técnica de *speckle tracking*.

Todos os parâmetros obtidos pelo estudo ecocardiográfico foram comparados entre os grupos dos transplantados cardíacos com e sem RCA e grupo controle. Os resultados das dosagens de BNP e troponina I foram comparados entre os grupos dos transplantados cardíacos com e sem RCA. A Figura 1 representa o fluxograma do estudo.



FEVE: fração de ejeção ventrículo esquerdo; FAC: variação fracional da área; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; EST: ecocardiografia com *speckle tracking*; BEVD: biópsia endomiocárdica do ventrículo direito; RCA: rejeição celular aguda significativa.

Figura 1 - Fluxograma do estudo

3.5.1 Ecocardiograma convencional

Os exames de ecocardiografia foram realizados no Centro de Pesquisa em Ecocardiografia e Cardiologia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo, com equipamento ultrassônico digital (Vivid 9, GE Healthcare, Milwaukee, EUA). Inicialmente, todos os pacientes foram submetidos a exame ecocardiográfico transtorácico bidimensional, em posição supina, em decúbito lateral esquerdo, sob rotina padronizada. Análise detalhada das funções sistólica global e segmentar biventricular e da função diastólica do VE foi realizada.

Os diâmetros do VE foram medidos pelo modo bidimensional obtido pela incidência paraesternal eixo longo. Os volumes ventriculares e a fração de ejeção foram calculados pelo método de Simpson, conforme recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e Diretriz Brasileira de Ecocardiografia⁷⁴. A análise da função segmentar foi realizada, avaliando a motilidade dos 17 segmentos do VE⁷⁵. O índice de massa ventrículo esquerdo foi determinado conforme recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e Diretriz Brasileira de Ecocardiografia e indexado pela área de superfície corpórea, utilizando medidas lineares da cavidade e da espessura da parede miocárdica do VE⁷⁶.

Para determinação da função diastólica do VE, foram avaliados o fluxo da valva mitral pelo Doppler convencional, Doppler tecidual no anel mitral e velocidade de propagação do fluxo mitral. O fluxo mitral foi avaliado com o volume amostra do Doppler pulsado de 1 mm a 3 mm, posicionado

adjacente às extremidades das cúspides da valva mitral. Os seguintes parâmetros foram obtidos: velocidade máxima do enchimento rápido (onda E, em cm/s), velocidade máxima do enchimento tardio (onda A, em cm/s), relação E/A e TDE (em ms). As velocidades parietais foram determinadas pelo Doppler tecidual, com volume amostra de 5 mm a 10 mm do Doppler pulsado posicionado no septo e parede lateral do VE a, pelo menos, 1 cm do ponto de inserção das cúspides da valva mitral. Foram avaliadas as velocidades de relaxamento miocárdico precoce (onda e', em cm/s) e de relaxamento tardio (onda a', em cm/s) e a velocidade sistólica (onda S, em cm/s).

O átrio esquerdo foi dimensionado, utilizando medidas lineares e o diâmetro anteroposterior obtido pela incidência paraesternal no eixo longitudinal.

Todos os parâmetros do VD foram analisados no corte apical de quatro câmaras focado nessa câmara cardíaca. A função sistólica do VD foi avaliada pelos parâmetros convencionais, conforme recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e Diretriz Brasileira de Ecocardiografia⁷⁴. Foram determinadas a excursão sistólica do plano anular tricúspide (TAPSE), a velocidade de excursão sistólica e a variação fracional de área pelos modo M, Doppler tecidual pulsado e ecocardiografia bidimensional, respectivamente.

3.5.2 Ecocardiograma com técnica de *speckle tracking*

Para aquisição das imagens bidimensionais para análise por *speckle tracking*, o aparelho ecocardiógrafo foi ajustado para gravar três ciclos cardíacos com período de gravação 100 ms antes e após o ciclo. Foi utilizada a imagem em segunda harmônica, em escala de cinza, com taxa de enquadramento (*frame rate*) ajustada entre 50 quadros/s e 80 quadros/s, conforme preconizado pelo fabricante e seguindo a maioria das publicações na literatura. Esta taxa de enquadramento foi obtida, tanto por ajustes indiretos como por meio da profundidade de imagem, abertura do feixe de ultrassom e resolução (ajustes gerais para a qualidade de imagem), e também por ajustes diretos permitidos pelos aparelhos ecocardiógrafos utilizados.

Ao início do exame, o tempo de evento sistólico foi determinado por meio da marcação dos momentos de abertura e fechamento da valva aórtica. Subsequentemente, foram obtidas imagens na janela apical do VE nas incidências longitudinal ou três câmaras, quatro câmaras e duas câmaras, além da incidência apical quatro câmaras com foco no VD.

Na sequência, foi realizada aquisição das imagens na janela paraesternal, eixo curto transversal do VE em seus três principais planos: basal, médio e apical. O nível basal do VE teve como referência anatômica a valva mitral, e o médio, os músculos papilares. Já o nível apical, sem marcador anatômico próprio, foi adquirido como um ponto o mais próximo possível do segmento 17 do VE, no qual ainda se mantinha adequada visibilização miocárdica, como também se observava, pelo menos, uma

tendência à rotação em algum sentido, horário ou anti-horário. Para o eixo transversal, todo esforço foi realizado para se obter uma imagem o mais circunferencial possível, no intuito de se obter dados mais acurados de rotação e *twist* do VE, além dos outros parâmetros previstos.

Por se tratar de uma técnica extremamente dependente da qualidade da imagem adquirida, uma especial atenção e esforço foram endereçados neste sentido. Múltiplas imagens foram capturadas no decorrer do exame, visando a obtenção daquelas com melhor resolução espacial. Terminada a aquisição, os exames foram gravados em mídias digital para análise *off-line*.

3.5.3 Quantificação da dinâmica ventricular pelo *speckle tracking*

O programa utilizado para análise quantitativa pelo *speckle tracking* foi o EchoPAC em sua versão BT10 (GE Healthcare, Milwaukee, EUA).

Após a marcação de pontos na face interna do VE e do VD, há delimitação semiautomática da borda endocárdica e o limite epicárdico, as chamadas regiões de interesse. Dentro destas regiões, padrões pontilhados miocárdicos (*speckles*) foram detectados e acompanhados automaticamente quadro a quadro ao longo do ciclo cardíaco. Uma avaliação automática da acurácia do seguimento do padrão pontilhado foi fornecida pelo programa, podendo ser aceita ou não. Quando não aprovada, ajustes na região de interesse foram possíveis, para propiciar um seguimento mais acurado. Todo este processo foi realizado nas janelas apical e transversal sendo obtidos os diversos parâmetros que compõem a análise da mecânica de contração do VE e do VD, mencionados abaixo. Esta análise foi realizada segmento a

segmento e as curvas geradas foram codificadas por cores. O programa mapeia e divide o VE em 18 segmentos, sendo esta segmentação baseada, porém não idêntica, à preconizada pela Sociedade Americana de Ecocardiografia. O VD é dividido em seis segmentos, sendo três segmentos referentes ao septo interventricular e os outros três referentes à parede livre desse ventrículo. O Quadro 1 enumera os segmentos analisados. Por fim, estes dados foram exportados para um programa destinado à produção de tabelas, o Excel (Excel 2007, Microsoft Corp, Seattle, Washington, EUA).

Quadro 1 - Segmentação dos ventrículos esquerdo e direito realizada pelo programa EchoPAC para quantificação pelo método de *speckle tracking*

| Eixo longitudinal | Eixo transverso |
|--|---|
| <p>Plano 3 câmaras</p> <p>Parede inferolateral (segmentos basal, médio e apical) e septo anterior (segmentos basal, médio e apical)</p> | <p>Plano basal</p> <p>Anterior, anterolateral, inferolateral, inferior, septo inferior e septo anterior</p> |
| <p>Plano 4 câmaras</p> <p>Parede anterolateral (segmentos basal, médio e apical) e septo inferior (segmentos basal, médio e apical)</p> | <p>Plano médio</p> <p>Anterior, anterolateral, inferolateral, inferior, septo inferior e septo anterior</p> |
| <p>Plano 4 câmaras modificado</p> <p>Parede livre do ventrículo direito (segmentos basal, médio e apical)</p> | <p>Plano apical</p> <p>Anterior, anterolateral, inferolateral, inferior, septo inferior e septo anterior</p> |
| <p>Plano 2 câmaras</p> <p>Parede anterior (segmentos basal, médio e apical) e inferior (segmentos basal, médio e apical)</p> | |

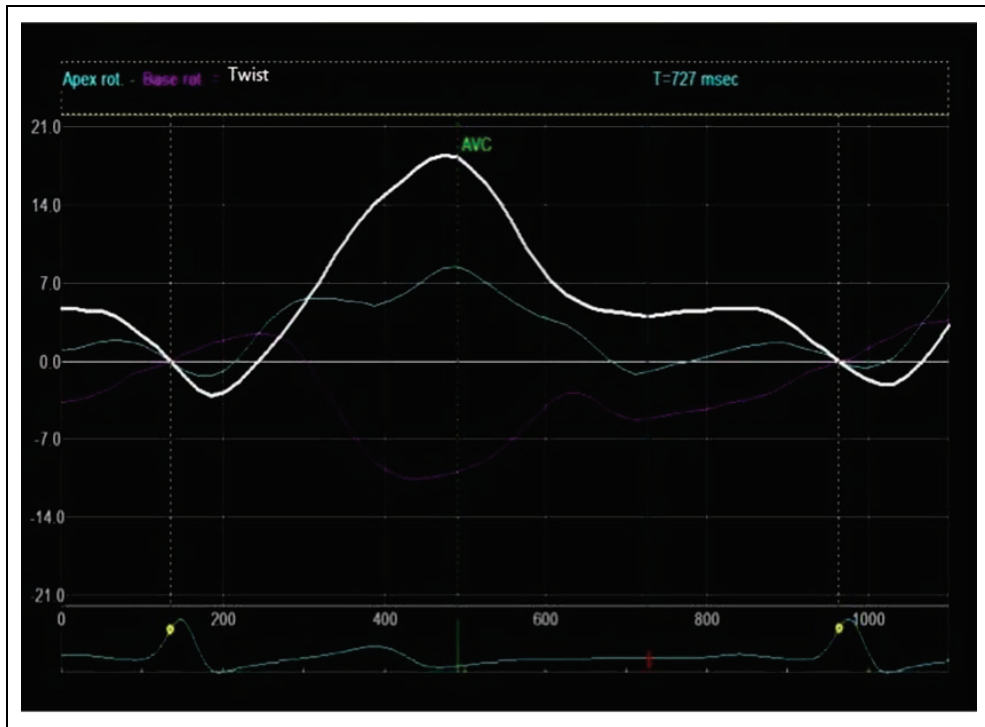
Os parâmetros fornecidos pelo programa para compor a descrição da mecânica de contração do VE e do VD no eixo longitudinal e do VE no eixo transversal, estão dispostos no Quadro 2.

Quadro 2 - Análises realizadas nos eixos longitudinal e transversal do ventrículo esquerdo e no eixo longitudinal do ventrículo direito

| Eixo longitudinal | Eixo transverso |
|--|------------------------------------|
| Plano 3, 4 e 2 câmaras | Plano basal, médio e apical |
| <i>Strain</i> longitudinal do ventrículo esquerdo | <i>Strain</i> circunferencial |
| <i>Strain rate</i> longitudinal do ventrículo esquerdo | <i>Strain</i> radial |
| | <i>Strain rate</i> circunferencial |
| Plano 4 câmaras modificado | <i>Strain rate</i> radial |
| | Rotação |
| <i>Strain</i> longitudinal da parede livre do ventrículo direito | <i>Twist</i> |

Os valores de rotação foram uma média das rotações dos segmentos avaliados no eixo curto do VE, planos basal e apical. Rotação basal, por convenção, rotulada com valor negativo (sentido horário) e rotação apical, com valor positivo (sentido anti-horário).

A partir destes dados de oposição de rotação, foi calculado o *twist* do VE, diferença absoluta entre estas rotações máximas ($VE_{twi} = VE_{rot\ apical} - VE_{rot\ basal}$), exemplificado na Figura 2. A Figura 3 demonstra exemplos de análise de *strain* longitudinal do VD e de *strain radial* do VE.



Curva azul - rotação apical; curva rosa - rotação basal; curva branca - *twist*.

Figura 2 - Cálculo do *twist* do ventrículo esquerdo: diferença absoluta entre os valores de rotação apical e basal

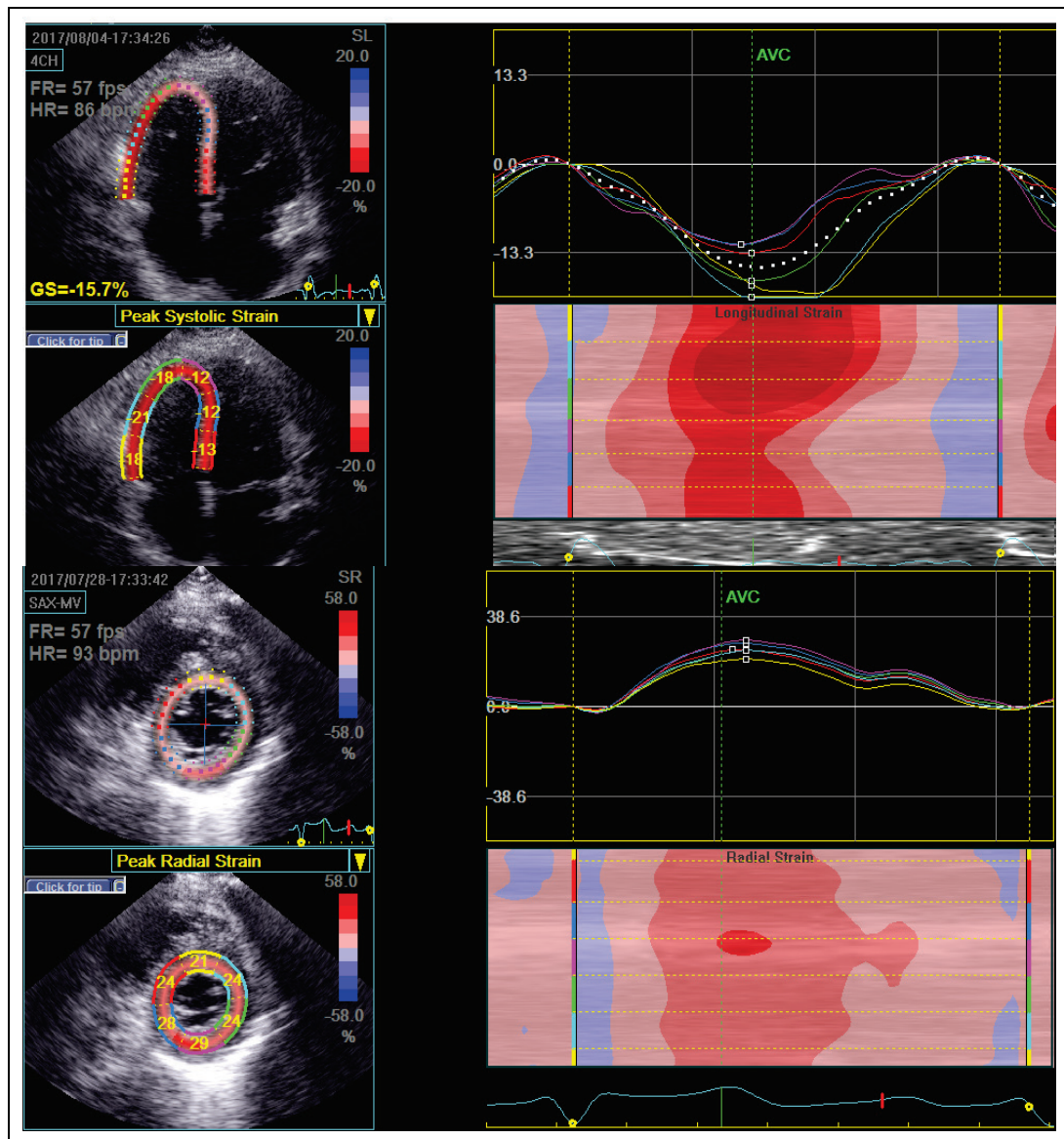


Figura 3 - Exemplo de análise de *strain* longitudinal de ventrículo direito (acima) e radial do ventrículo esquerdo (abaixo)

3.5.4 Análise do peptídeo natriurético cerebral

O BNP foi coletado no momento da preparação para BEVD dos pacientes transplantados. O método de dosagem de BNP utilizado foi o teste Triage R (*Biosite Diagnostics*), teste de imunofluorescência para determinação quantitativa do BNP em sangue ou plasma conservados com EDTA como anticoagulante. Depois de colocada a amostra de sangue no dispositivo, o sangue é separado do plasma por um filtro. Uma quantidade predeterminada de plasma é colocada sob reação com anticorpos fluorescentes. Após um período de incubação, a amostra segue para uma análise onde se detectam os complexos formados com os anticorpos fluorescentes.

O material utilizado para dosagem podia ser tanto sangue total em um período de 4 horas após a coleta, ou plasma, separado e estocado em temperatura de -20°C, homogeneizado e trazido à temperatura ambiente, antes da realização do teste.

3.5.5 Dosagem da troponina - método troponina ultrasensível

A coleta da troponina também foi realizada no momento da preparação para BEVD. A determinação quantitativa de troponina I foi obtida por meio de um imunoensaio de troponina ultrasensível, tipo sanduíche, efetuado em três etapas que utilizou tecnologia quimioluminescente direta e quantidades constantes de dois anticorpos monoclonais. Um reagente auxiliar foi incluído para reduzir a ligação não específica. Para isso, foi utilizado o produto comercial *ADVIA Centaur® TnI-Ultra* (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, New York, EUA) em equipamento automatizado da mesma marca.

3.6 Análise Estatística

A análise de tamanho amostral revelou que, para detecção de uma redução de 15% na medida do *strain* longitudinal global, com erro do tipo I de 5% e poder de 80%, seriam necessários 17 pacientes com RCA, considerando o valor normal de 20% e desvio padrão de 4%.

As variáveis categóricas foram apresentadas em tabelas, descrevendo suas frequências absoluta (n) e relativa (%). Teste de Qui-quadrado, razão de verossimilhança ou teste exato de Fisher foram usados para avaliar sua associação.

As variáveis contínuas foram apresentadas em tabelas, descrevendo suas médias e desvio padrão ou medianas e intervalo interquartilico (1º e 3º quartis). O teste de Kolmogorov-Smirnov avaliou se a distribuição era normal. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram testadas com análise de variância e teste de Tukey, e as demais foram testadas com Kruskal-Wallis e Dunn.

A sensibilidade, especificidade, acurácia e os valores preditivos positivos e negativos para detecção de RCA pelos diferentes parâmetros ecocardiográficos foram calculados.

As variáveis que apresentaram associação com RCA ($p < 0,10$) foram avaliadas no ajuste de um modelo de regressão logística múltipla.

As análises de variabilidade interobservador e intraobservador foram realizadas em 30 ecocardiogramas selecionados aleatoriamente. A análise interobservador foi feita entre dois ecocardiografistas experientes no método e a intraobservador, realizadas em quantificações repetidas com, pelo

menos, 120 dias entre elas. Utilizou-se o coeficiente de correlação intraclassa para avaliar os parâmetros ecocardiográficos quanto à reprodutibilidade interobservador (aleatório de uma via) e intraobservador (misto de duas vias).

Foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características Clínicas

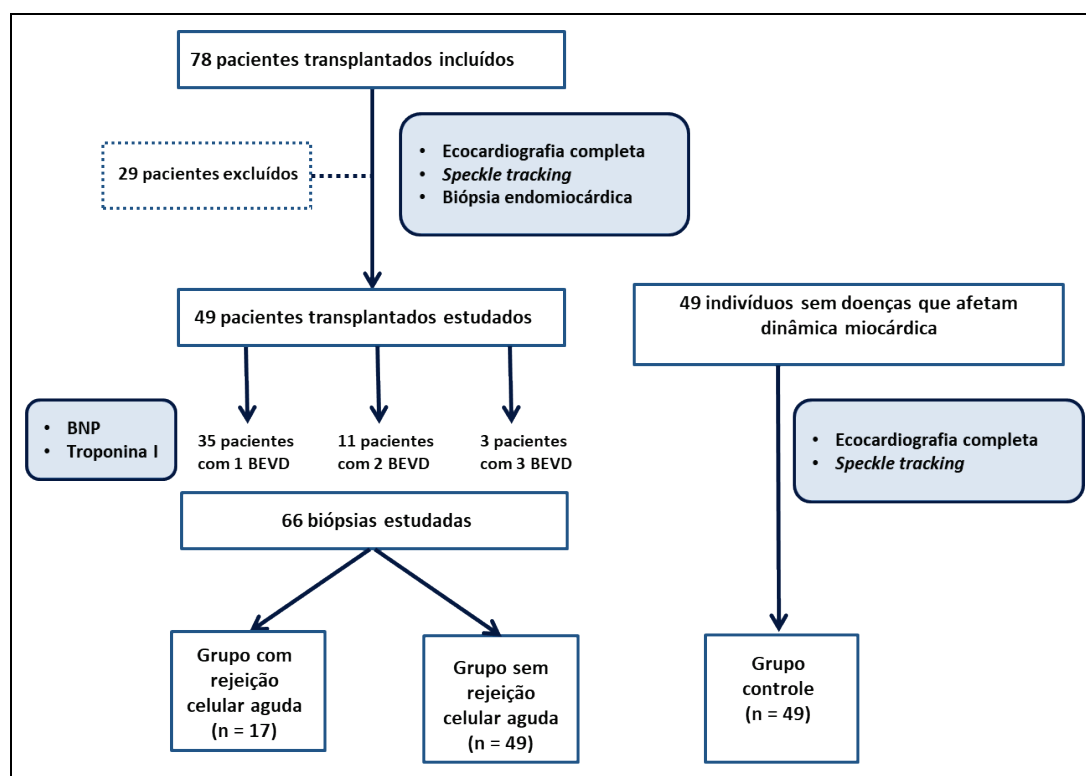
Entre maio de 2014 e novembro de 2017, 78 pacientes transplantados cardíacos foram submetidos a estudo ecocardiográfico e, inicialmente, incluídos no estudo. Destes, 29 foram excluídos, sendo cinco por disfunção sistólica do VE, quatro por disfunção sistólica do VD, 10 em razão da janela acústica ecocardiográfica limitada para análise do *speckle tracking*, dois por arritmia, quatro por resultados inconclusivos da BEVD, dois por rejeição humoral e dois por reativação da doença de Chagas. Um total de 49 pacientes transplantados cardíacos que realizaram BEVD e ecocardiografia com *speckle tracking* permaneceram no estudo (Figura 4).

O grupo controle constituiu-se de 49 indivíduos, pareados por idade e sexo, sem história clínica de qualquer doença conhecida por interferir na fisiologia da deformação, rotação e torção miocárdicas. Os indivíduos do grupo controle não tinham marcapasso, nem apresentavam arritmia durante o monitoramento eletrocardiográfico.

Assim, a população final do estudo compôs-se de 98 pacientes, sendo 49 indivíduos não transplantados, pertencentes ao grupo controle, e 49 pacientes transplantados.

Dentre os 49 pacientes transplantados, 35 realizaram uma BEVD, 11 pacientes realizaram duas BEVD e três pacientes realizaram três BEVD.

Portanto, estudou-se um total de 66 biópsias, ecocardiogramas com *speckle tracking* e dosagens de biomarcadores (troponina I e BNP) nos pacientes transplantados. Dentre estas 66 biópsias, 49 (74%) não apresentavam RCA (graus 0 ou 1R); e 17 (26%) apresentavam RCA (graus 2R e 3R).



BEVD: biópsia endomiocárdica de ventrículo direito; BNP = peptídeo natriurético cerebral.

Figura 4 - Representação esquemática da população de estudo

As características clínicas dos pacientes transplantados estão descritas nos dados da Tabela 1, enquanto a Tabela 2 mostra as características dos transplantados divididos em grupos com e sem RCA e grupo controle. A média de idade do grupo controle foi 44 ± 9 anos, do grupo transplantado sem RCA foi 44 ± 11 anos e o do grupo transplantado com RCA foi 48 ± 13 anos. Os grupos eram compostos predominantemente por homens. Os pacientes do grupo controle eram significativamente mais altos

do que os dos grupos dos transplantados ($p < 0,001$). Com relação às comorbidades, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos dos transplantados com e sem RCA, sendo a prevalência de hipertensão e diabetes maior no grupo de transplantados com RCA.

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes transplantados

| Características | Pacientes transplantados cardíacos (n=49) |
|--|---|
| Sexo masculino | 28 (57,1%) |
| Idade (anos) | 45,2 ± 11,5 |
| Peso (kg) | 63,3 ± 13,4 |
| Altura (cm) | 160,5 ± 10,3 |
| Área superfície corpórea (m ²) | 1,7 ± 0,2 |
| Doença primária | |
| Cardiopatia chagásica | 19 (38,8%) |
| Cardiomiopatia dilatada idiopática | 18 (36,7%) |
| Cardiomiopatia isquêmica | 5 (10,2%) |
| Cardiomiopatia hipertensiva | 4 (8,2%) |
| Cardiomiopatia valvular | 2 (4,1%) |
| Cardiomiopatia não compactada | 1 (2,0%) |
| DCRTC | 1 (2,0%) |
| Hipertensão arterial sistêmica | 10 (20,4%) |
| Diabete melitus | 10 (20,4%) |
| Tabagismo | 13 (26,5%) |
| Creatinina sérica (mg/dL) | 1,1 (0,93 - 1,3) |
| Tempo de transplante (meses) | 8 (6 - 12) |

Variáveis apresentadas como média (desvio padrão), números (porcentagem) ou mediana (intervalo interquartilico).

DCRTC - disfunção cardíaca relacionada à terapia do câncer.

Tabela 2 - Características demográficas, antropométricas e clínicas dos grupos

| Variável | Grupo Controle | Grupo transplantado sem RCA | Grupo transplantado com RCA | p |
|---------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| Idade (anos) | 43 ± 9 | 44 ± 11 | 48 ± 13 | 0,20 0 ^c |
| Sexo (masculino) | 28 (57,1%) | 26 (59%) | 9 (64%) | 0,941 ^b |
| Peso (kg) | 72 (63-80) | 70 (58-81) | 71 (61-87) | 0,684 ^a |
| Altura (cm) | 1,69 ± 0,09 | 1,62 ± 0,09 [#] | 1,59 ± 0,13 [#] | <0,001 ^c |
| IMC (kg/m ²) | 24,7 (22,9-27,1) | 26,0 (22,7-31,6) | 26,1 (24,0-34,7) | 0,152 ^a |
| HAS | 0 (0%) | 8 (17,0%) | 5 (31,3%) | <0,001 ^b |
| DM | 0 (0%) | 8 (17,0%) | 7 (41,2%) | <0,001 ^b |
| Tabagismo | 0 (0%) | 14 (29,8%) | 4 (23,5%) | <0,001 ^b |
| Creatinina sérica (mg/dL) | - | 1,19 (0,9-1,34) | 1,1 (0,95-1,4) | 0,930 ^d |
| SC (m ²) | 1,60 (1,55-1,68) | 1,78 (1,58-1,93) [#] | 1,75 (1,60- 2,03) [#] | <0,001 ^a |

Variáveis apresentadas como média (desvio padrão), números (porcentagem) ou mediana (intervalo interquartil).

^aKruskal-Wallis; ^bQui-quadrado de Pearson; ^cANOVA; ^dMann-Whitney; [#]p<0,05 (vs. grupo controle) RCA - rejeição celular aguda significativa; IMC - índice de massa corpórea; HAS - hipertensão arterial sistêmica; DM - diabetes melitus; SC - superfície corpórea.

4.2 Ecocardiograma Convencional

As variáveis ecocardiográficas obtidas pelo exame convencional estão na Tabela 3. Na avaliação de medidas lineares, foram identificadas diferenças no diâmetro do átrio esquerdo, índice de massa miocárdica e espessura relativa, com valores superiores nos grupos dos transplantados comparados aos do grupo controle (p <0,001). Entre o grupo dos transplantados com e sem RCA, não houve diferença quanto a esses parâmetros. Não foi observada diferença significativa no valor da fração de ejeção do VE entre os grupos (p = 0,730).

Com relação às variáveis do VD, foram observados valores significativamente menores na excursão sistólica do plano anular da tricúspide (TAPSE), na variação fracional de área e no pico de velocidade do plano anular tricúspide pelo Doppler tecidual (S') nos grupos dos transplantados em comparação ao grupo controle, embora não tenha havido diferença significativa dessas variáveis entre o grupo de transplantados com e sem RCA.

Na avaliação dos parâmetros relacionados com a diástole, houve diferença da maioria deles entre os grupos dos transplantados e o grupo controle. Nota-se que a velocidade da onda E e da onda e' são menores nos grupos dos transplantados e a relação E/e' é maior nesses mesmos grupos em relação ao grupo controle. No entanto, nenhum desses parâmetros foi marcador de RCA.

Tabela 3 - Variáveis ecocardiográficas convencionais

| Variável | Grupo Controle | Grupo transplantado sem RCA | Grupo transplantado com RCA | p |
|--------------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| AE (mm) | 34 (31-36) | 43 (35-49) [#] | 41 (38-46) [#] | <0,001 ^a |
| Septo (mm) | 8 (8-9) | 11 (10-13) [#] | 12 (10-13) [#] | <0,001 ^a |
| Parede (mm) | 8 (8-9) | 11 (10-11) [#] | 11 (9-13) [#] | <0,001 ^a |
| Espessura relativa | 0,38 (0,35-0,41) | 0,49 (0,44-0,53) [#] | 0,47 (0,40-0,55) [#] | <0,001 ^a |
| IMVE (g/m ²) | 71 (65-83) | 102 (86-124) [#] | 109 (80-141) [#] | <0,001 ^a |
| FEVE (%) | 65 (62-68) | 64 (62-67) | 65 (63-67) | 0,739 ^a |
| Vel E (m/s) | 0,84 (0,69-0,93) | 0,65 (0,60-0,76) | 0,66 (0,54-0,84) | <0,001 ^a |
| TDE (ms) | 189 (168-208) | 187 (144-214) | 190 (153-207) | 0,787 ^a |
| Vel A (m/s) | 0,50 (0,42-0,58) | 0,41 (0,32-0,50) | 0,42 (0,38-0,68) | 0,001 ^a |
| E/A | 1,60 (1,38-1,93) | 1,64 (1,29-2,00) | 1,46 (1,29-1,75) | 0,543 ^a |
| Vel s' septal (m/s) | 0,08 (0,07-0,09) | 0,07 (0,06-0,08) [#] | 0,07 (0,05-0,08) | 0,010 ^a |
| Vel e' septal (m/s) | 0,11 (0,09-0,12) | 0,06 (0,05-0,08) [#] | 0,07 (0,05-0,07) [#] | <0,001 ^a |
| Vel a' septal (m/s) | 0,08 (0,07-0,10) | 0,06 (0,05-0,08) [#] | 0,08 (0,06-0,09) [#] | <0,001 ^a |
| E/e' | 7,92 (6,63-8,78) | 10,14 (7,99-12,96) [#] | 10 (7,93-14,21) [#] | <0,001 ^a |
| Vel s' lateral (m/s) | | 0,09 (0,07-0,10) | 0,09 (0,07-0,11) | 0,773 ^b |
| Vel e' lateral (m/s) | | 0,11 ± 0,04 | 0,1 ± 0,04 | 0,235 ^c |
| Vel a' lateral (m/s) | | 0,06 (0,05-0,08) | 0,06 (0,05-0,07) | 0,498 ^b |
| FAC (%) | 43 (40-48) | 39 (36-45) | 39 (37-42) | 0,001 ^a |
| TAPSE (mm) | 24 (20-26) | 17 (15-18) [#] | 16 (15-17) [#] | <0,001 ^a |
| s' do VD(cm/s) | 13 (12-15) | 12 (11-14) | 11 (11-12) [#] | <0,001 ^a |

Variáveis apresentadas como média (desvio padrão) ou mediana (intervalo interquartilico). ^aKruskal-Wallis; ^bMann-Whitney; ^cteste t-Student. #p<0,05 (vs. Grupo controle).

RCA - rejeição celular aguda significativa; AE - átrio esquerdo; IMVE - índice de massa do ventrículo esquerdo; FEVE - fração de ejeção do ventrículo esquerdo; TDE - tempo de desaceleração da onda E; FAC - variação fracional da área; TAPSE - excursão sistólica do anel tricúspide; Vel - velocidade; VD - ventrículo direito.

4.3 Análise da Mecânica de Contração - Eixo Longitudinal

4.3.1 *Strain* e *strain rate* longitudinal

Os valores de *strain* longitudinal global do VE foram os seguintes: grupo controle $-21 \pm 2,27\%$; grupo dos transplantados sem RCA $-13,5 \pm 3,24\%$ e grupo dos transplantados com RCA $-12,4 \pm 3,60\%$, sendo observado que o valor absoluto do *strain* longitudinal global foi significativamente maior no grupo controle quando comparado aos grupos de pacientes transplantados ($p < 0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de transplantados com e sem RCA quanto a essa variável. Estas observações também ocorreram nas análises de *strain rate* longitudinal global (SRLG) (Tabela 4).

Na análise do *strain* longitudinal da parede livre do VD (SLPL-VD), nota-se que os grupos dos transplantados também apresentam valores absolutos de *strain* mais baixos do que o grupo controle ($p < 0,05$), como demonstrado na Tabela 4. Houve diferença estatisticamente significativa do valor dessa variável (SLPL-VD) entre o grupo dos pacientes transplantados sem RCA ($-22,11 \pm 2,90\%$) e o grupo dos transplantados com RCA ($-17,57 \pm 4,94\%$), com valor absoluto menor nesse último grupo ($p < 0,001$) (Gráfico 1). O valor absoluto de SLPL-VD menor que $17,57\%$ apresentou sensibilidade de 71% (intervalo de confiança de $95\% = 49-92\%$) e especificidade de 90% (intervalo de confiança de $95\% = 86-95\%$) para detectar RCA nos pacientes transplantados, com acurácia de 84% , valor preditivo positivo de 75% e valor preditivo negativo de 88% .

Tabela 4 - Parâmetros da mecânica dos ventrículos esquerdo e direito obtidos no eixo longitudinal pela ecocardiografia com *speckle tracking*

| Variável | Grupo Controle | Grupo transplantado sem RCA | Grupo transplantado com RCA | p |
|---------------|-----------------------------|--|---|---------------------|
| SLG-VE (%) | -21,08 (-22,77 a -19,91) | -13,81 (-16,09 a -12,51) [#] | -12,54 (-15,49 a -9,82) [#] | <0,001 ^a |
| SRLG-VE (1/s) | -1,20 ± 0,17 | -1,12 ± 0,19 [#] | -1,10 ± 0,18 | 0,023 ^b |
| SLPL-VD (%) | -24,88 ± 3,10 | -22,11 ± 2,90 [#] | -17,57 ± 4,94 ^{#*} | <0,001 ^b |

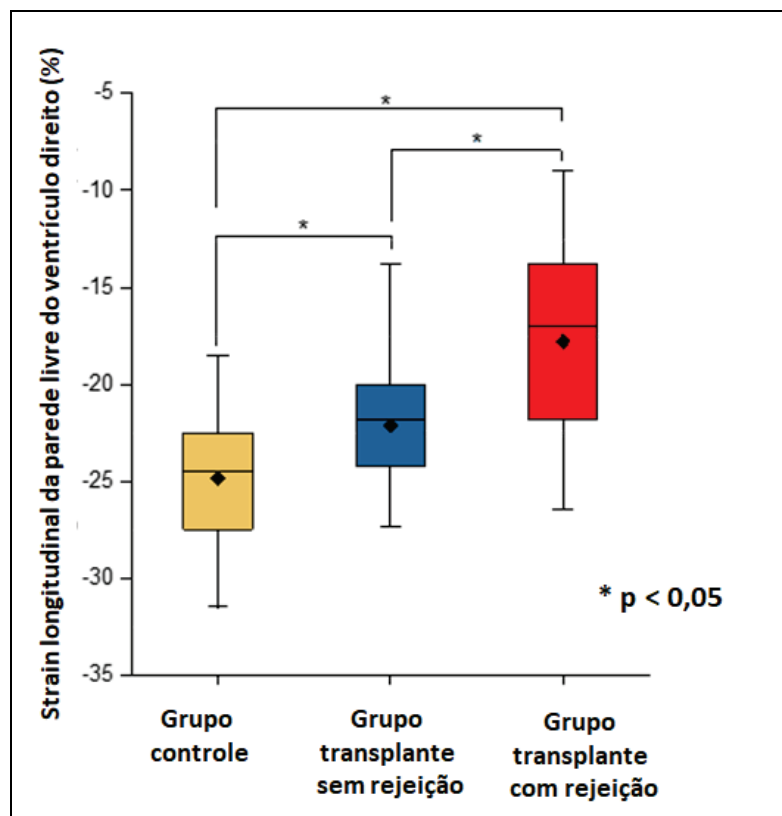
Variáveis apresentadas como média (desvio padrão) ou mediana (intervalo interquartil).

^aKruskal-Wallis teste; ^bANOVA.

[#]Comparação significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; *Comparação significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo transplantado sem rejeição.

RCA - rejeição celular aguda significativa; VE - ventrículo esquerdo; VD - ventrículo direito; SLG - *strain* longitudinal global; SRLG - *strain rate* longitudinal global; SLPL-VD - *strain* longitudinal da parede livre.

Gráfico 1 - Valores de *strain* longitudinal de parede livre de ventrículo direito no grupo controle e nos grupos dos transplantados cardíacos com e sem rejeição celular aguda significativa (RCA)



4.3.2 Análise de reprodutibilidade

A reprodutibilidade das medidas de strain foi analisada em 30 pacientes selecionados randomicamente. A correlação intraclassa do *strain* longitudinal global do VE foi 0,92 (intervalo de confiança de 95% = 0,85-0,96) para variabilidade interobservador. Em relação à variabilidade intraobservador, a correlação intraclassa do *strain* longitudinal global do VE foi 0,93 (intervalo de confiança de 95% = 0,86-0,97). As correlações intraclassas do SLPL-VD foram 0,90 (intervalo de confiança de 95% = 0,80-0,95) e 0,92 (intervalo de confiança de 95% = 0,84-0,96) para variabilidade inter e intraobservador, respectivamente.

4.4 Análise da Mecânica Global de Contração - Eixo Transverso

4.4.1 *Strain* e *strain rate* circunferencial e radial

Os resultados da análise dos parâmetros de contração do VE obtidos pelo eixo transversal, com medidas do *strain* e *strain rate* circunferencial e radial, nos grupos controle, transplantados com RCA e transplantados sem RCA, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - *Strain* e *strain rate* circunferencial e radial do ventrículo esquerdo obtidos no eixo transverso pela ecocardiografia com *speckle tracking*

| Variável | Grupo Controle | Grupo transplantado sem RCA | Grupo transplantado com RCA | p |
|------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| SCG (%) | -21,23 ± 2,98 | -16,00 ± 4,14# | -15,41 ± 3,56# | <0,001 ^b |
| SRCG (1/s) | -1,58 (-1,77 a -1,44) | -1,69 (-1,97 a -1,42) | -1,69 (-2,03 a -1,31) | 0,621 ^a |
| SRG (%) | 41,67 ± 12,53 | 28,37 ± 10,49# | 28,27 ± 9,34# | <0,001 ^b |
| SRRG (1/s) | -7,55 ± 1,89 | -4,90 ± 3,08# | -5,71 ± 1,80# | <0,001 ^b |

Variáveis apresentadas como média (desvio padrão) ou mediana (intervalo interquartil).

^aKruskal-Wallis; ^bANOVA. #Comparação significativa (p<0,05) em relação ao grupo controle; RCA - rejeição celular aguda significativa; SCG - *strain* circunferencial global; SRCG - *strain rate* circunferencial global; SRG - *strain* radial global; SRRG - *strain rate* radial global.

Uma diferença estatisticamente significativa das variáveis *strain* circunferencial global e radial global foi evidenciada entre os grupos controle e o dos pacientes transplantados (p<0,001), com valores absolutos menores neste último grupo. Já estas mesmas variáveis não apresentaram diferença entre os grupos de transplantados com e sem RCA. Quanto à variável *strain rate* global circunferencial, não houve diferença significativa entre os grupos. Em relação à variável *strain rate* radial, houve valores absolutos significativamente menores no grupo dos transplantados (p<0,001).

4.4.2 *Twist* do ventrículo esquerdo

Os resultados da análise de *twist* do VE demonstraram diferença significativa entre os grupos dos transplantados sem RCA (16,14° ± 6,39°), transplantados com RCA (13,91° ± 7,70°) e o grupo controle (18,96° ± 4,71°); p = 0,006. Não houve diferença significativa entre os grupos dos transplantados com e sem RCA.

4.4.3 Troponina I e BNP

Os níveis séricos de troponina I foram significativamente maiores no grupo com RCA [0,19 (intervalo interquartilico 0,09-1,31 ng/mL)] que no grupo sem RCA [0,05 (intervalo interquartilico 0,01-0,18 ng/mL)], $p = 0,007$. Não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de BNP entre os grupos com RCA [264,5 (intervalo interquartilico 160 a 976 pg/mL)] e sem RCA [248 (intervalo interquartilico 90 a 528 pg/mL)], $p = 0,435$.

4.5 Preditores de Rejeição Celular Aguda Significativa

Um modelo de regressão logística múltipla foi construído para determinar os fatores preditivos de RCA nos pacientes transplantados. Na análise univariada, os preditores de rejeição, incluindo variáveis clínicas e ecocardiográficas, foram: altura, hipertensão arterial sistêmica, diabetes melito, nível sérico de troponina I e SLPL-VD obtido pela ecocardiografia com *speckle tracking*.

Pela análise multivariada, o único preditor independente de RCA foi o SLPL-VD com razão de chance de 1,70 (intervalo de confiança de 95% = 1,17-2,48); $p = 0,006$, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Preditores de rejeição celular aguda significativa nos pacientes transplantados cardíacos obtidos pela análise multivariada

| Variáveis | Razão de chances | 95% intervalo de confiança | p |
|-----------------|------------------|----------------------------|-------|
| Altura (cm) | 0,06 | 0,00 - 938,74 | 0,570 |
| Hipertensão | 0,38 | 0,01 - 11,82 | 0,581 |
| Diabete melitus | 14,36 | 0,49 - 418,36 | 0,121 |
| Troponina I | 4,22 | 0,87 - 20,55 | 0,075 |
| SLPL-VD | 1,70 | 1,17 - 2,48 | 0,006 |

SLPL-VD = *strain* longitudinal da parede livre do ventrículo direito.

O Gráfico 2 demonstra a probabilidade de RCA com base nos valores de SLPL-VD. O Gráfico 3 mostra a curva ROC (*receiver operating characteristic*) do SLPL-VD.

Gráfico 2 - Curva de probabilidade de rejeição celular aguda de acordo com os valores de *strain* longitudinal da parede livre do ventrículo direito. O valor de corte foi estabelecido em 17,57%

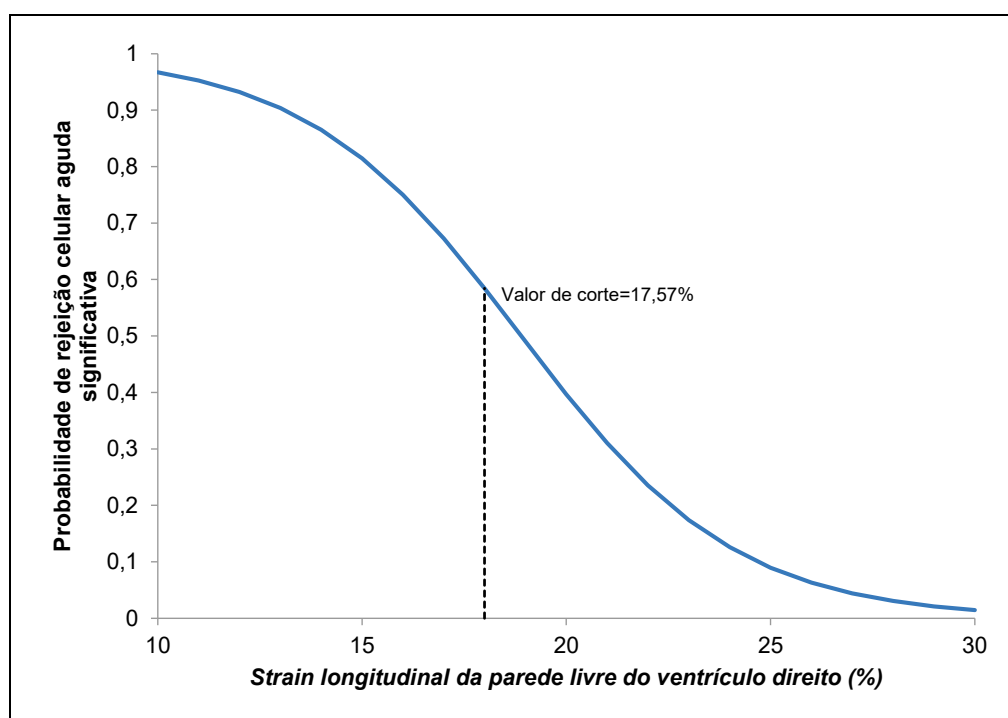
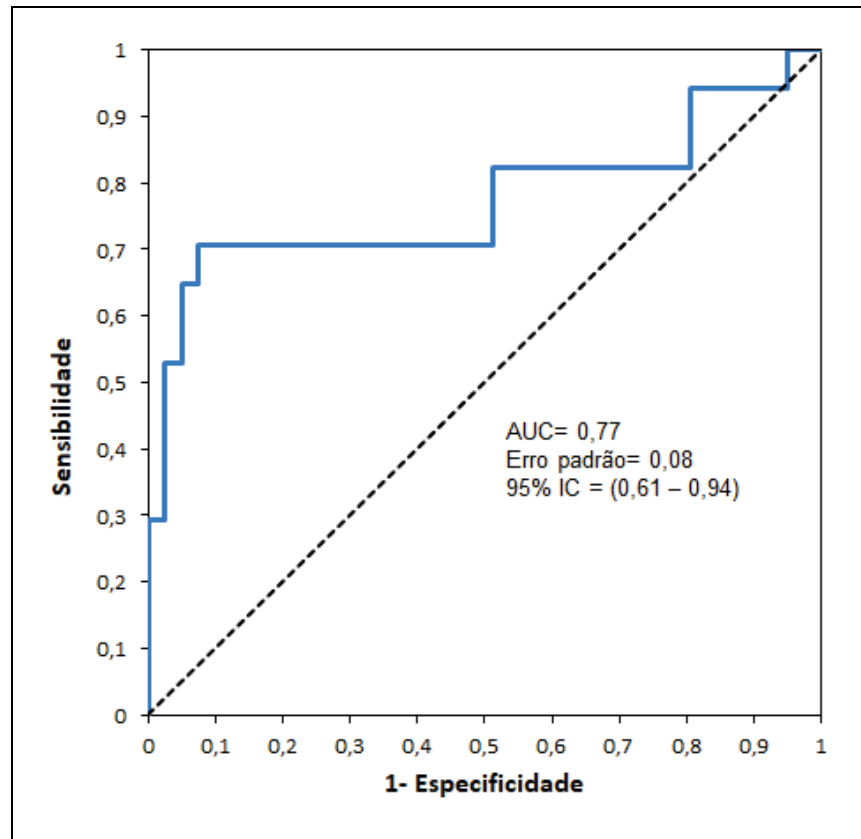


Gráfico 3 - Valor do *strain* longitudinal da parede livre do ventrículo direito para o diagnóstico de rejeição celular aguda significativa em pacientes transplantados cardíacos



AUC - área embaixo da curva; IC - intervalo de confiança.

A Figura 5 ilustra exemplo de SLPL-VD obtido pela ecocardiografia com *speckle tracking* e a respectiva imagem anatomopatológica obtida pela BEVD em paciente transplantado cardíaco com RCA (imagens superiores) e sem RCA (imagens inferiores).

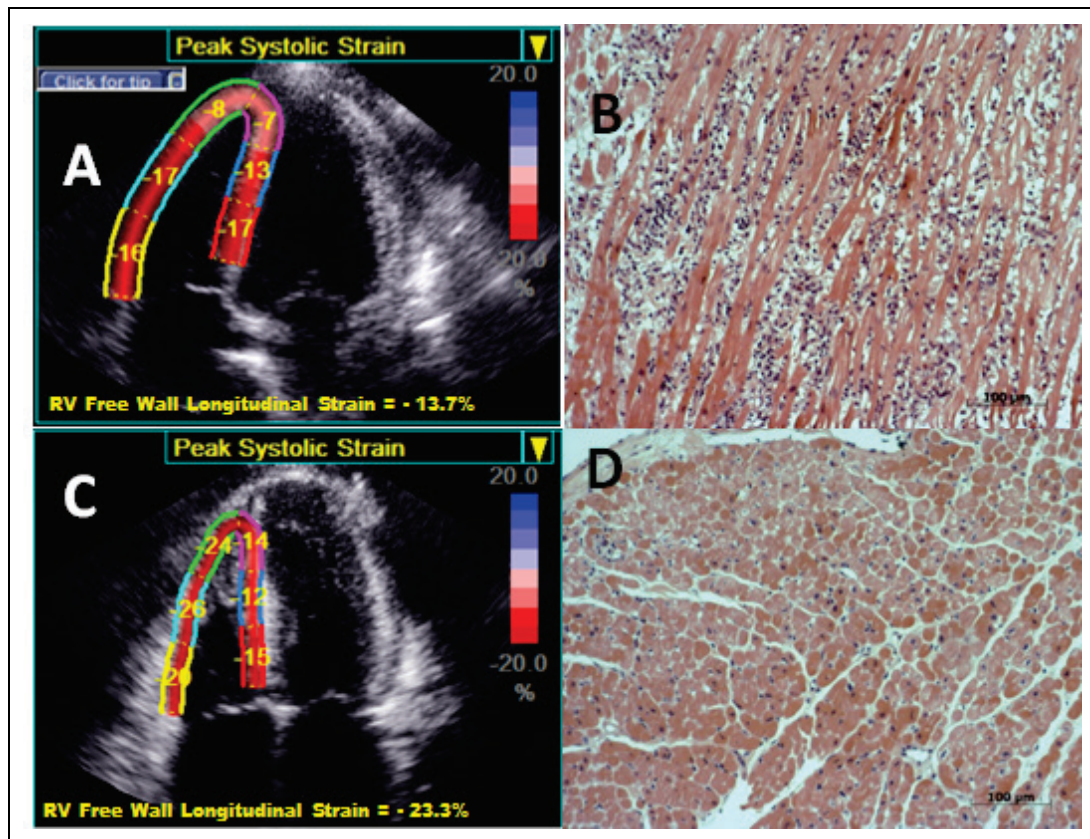


Figura 5 - *Strain* longitudinal de parede livre do ventrículo direito (SLPL-VD) e biópsia endomiocárdica do ventrículo direito em pacientes transplantados cardíacos. A) SLPL-VD em um paciente transplantado demonstrando valor absoluto baixo (- 13,7%) e B) biópsia endomiocárdica correspondente demonstrando rejeição celular aguda significativa; C) SLPL-VD em um paciente transplantado demonstrando valor absoluto alto (- 23,3%) e D) biópsia endomiocárdica correspondente demonstrando ausência de rejeição celular aguda

5 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi que o SLPL-VD, obtido pela EST, é um preditor independente de RCA em pacientes transplantados cardíacos. Um SLPL-VD < 17,57% (valor absoluto) apresentou sensibilidade de 71% e especificidade de 90% para detecção de RCA. Nesta população, o alto valor preditivo negativo do SLPL-VD pode ajudar a descartar RCA. Além disso, observa-se que, embora os níveis séricos de troponina I tenham sido significativamente maiores no grupo com RCA, não foram um preditor independente.

Nota-se que os pacientes transplantados cardíacos apresentaram maiores valores de espessura de septo e de parede posterior, maior diâmetro de átrio esquerdo, de índice de massa ventricular esquerda em comparação aos controles pareados por sexo e idade, o que vai de acordo com os achados prévios na literatura⁷⁷. Pacientes transplantados cardíacos também apresentaram valores menores dos parâmetros de análise da função sistólica do VD, como a variação fracional da área (FAC), velocidade sistólica do anel tricúspideo e TAPSE. Além disso, em relação à função diastólica do VE, os pacientes transplantados cardíacos apresentaram menores valores de velocidade de Doppler tecidual e maiores valores da relação E/e', sugerindo relaxamento diminuído e aumento das pressões de enchimento ventricular esquerdo nesses pacientes.

Rejeição é uma complicação importante e frequente do transplante cardíaco. No primeiro ano, é a causa mais comum de mortalidade. Atualmente, a BEVD é o padrão-ouro para seu diagnóstico, sendo, na verdade, a única ferramenta para o diagnóstico e classificação da rejeição de aloenxerto⁷⁸. Esforços vêm sendo feitos para melhorar a consistência, confiabilidade e reprodutibilidade da avaliação histopatológica da BEVD. De fato, várias questões tornam sua avaliação não tão fácil e reprodutível. Os pontos críticos incluem a interpretação patológica subjetiva e desafiadora da BEVD e os riscos associados ao procedimento^{79,80}.

Considerando estas limitações, foram avaliadas técnicas não invasivas para detectar rejeição cardíaca em pacientes transplantados, como biomarcadores (troponina I e BNP) e várias modalidades de imagem como a ecocardiografia, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética, a tomografia por emissão de pósitrons e também o perfil de expressão gênica⁸¹.

Estudos anteriores mostraram que as medidas de deformação miocárdica, especificamente, o *strain*, têm maior sensibilidade do que a ecocardiografia convencional e, portanto, pode ser uma ferramenta importante para detectar a disfunção cardíaca subclínica precoce⁸². Um estudo experimental foi o primeiro a mostrar que o *strain* derivado da EST pode correlacionar-se com rejeição cardíaca⁸³.

No presente estudo, pôde-se demonstrar que pacientes transplantados cardíacos apresentam uma dinâmica ventricular própria, caracterizada por menor valor absoluto de *strain* longitudinal, circunferencial

e radial de VE e SLPL-VD, em comparação com indivíduos controle. Foram confirmados os dados recentemente publicados por Ingvarsson *et al.*⁷⁷, que mostraram, em uma análise de 124 pacientes transplantados cardíacos, diferentes medidas ecocardiográficas, quando comparados aos valores de referência. Neste trabalho, foi incluído um grupo controle, pareado por idade e sexo, para confirmar estes resultados. Múltiplos mecanismos podem explicar os diferentes achados ecocardiográficos em pacientes transplantados cardíacos. A fisiopatologia envolve as consequências do trauma cirúrgico, como lesão isquêmica e liberação de mediadores inflamatórios, além de hipertensão pulmonar prévia, comprometendo a dinâmica ventricular direita e os riscos associados de rejeições, biópsias cardíacas e medicamentos imunossupressores.

Sera *et al.*⁸³, em um estudo retrospectivo envolvendo 59 pacientes e 160 biópsias endomiocárdicas, demonstraram que *strain* longitudinal do VE com valor absoluto inferior a 14,8% apresentou sensibilidade e especificidade de 64% e 63%, respectivamente, para detecção de rejeição. Outro estudo retrospectivo, com 30 pacientes transplantados cardíacos, não conseguiu demonstrar que as anormalidades nos parâmetros da EST, como *strain* longitudinal e circunferencial do VE, *strain rate* sistólico e diastólico poderiam prever rejeição aguda nesses pacientes⁴⁶.

Mingo-Santos *et al.*⁴⁷ demonstraram um papel preditivo da EST no diagnóstico de rejeição (SLPL-VD e *strain* longitudinal do VE com valores absolutos inferiores a 17% e 15,5%, respectivamente). Entretanto, uma importante limitação deste estudo foi o baixo número de casos de biópsias

positivas para rejeição (12 biópsias endomiocárdicas $\geq 2R$ em um total de 235 amostras), o que poderia levar a uma superestimação da sensibilidade e do valor preditivo negativo dos parâmetros ecocardiográficos. Além disso, este estudo dividiu as biópsias em três grupos (0, 1R e $\geq 2R$), mas não foi capaz de detectar qualquer diferença entre as medidas dos grupos 1R e $\geq 2R$. Por outro lado, o presente estudo dividiu as biópsias, de acordo com o grau de rejeição em apenas dois grupos: biópsias sem RCA (0 e 1R) e biópsias com RCA ($\geq 2R$). Tal divisão foi baseada no significado clínico do grau de rejeição, uma vez que os casos com rejeição de 0 ou 1R não requerem intervenção imediata com ajuste de medicações imunossupressoras, mas este ajuste é necessário em pacientes com rejeição 2R e 3R. De acordo com o estudo de Mingo-Santos *et al.*⁴⁷, confirmou-se o valor preditivo da SLPL-VD para o diagnóstico de RCA, destacando sua alta especificidade. Um valor absoluto de SLPL-VD $<17,57\%$ exclui a RCA com uma especificidade de 90%. O valor de corte do presente estudo foi um pouco maior, o que pode ser justificado pelo uso equipamentos de ecocardiografia diferentes em cada estudo.

Até onde se sabe, este é o primeiro estudo que analisou a deformação ventricular direita usando EST em pacientes com função sistólica normal do VD (variação de área fracional acima de 0,34), para diagnosticar rejeição celular clinicamente significativa. Um cuidado extra foi dado no presente estudo para restringir a seleção de pacientes para um período fixo de tempo (6 meses até 1 ano após o TC), a fim de minimizar uma possível influência do tempo de transplante nos valores de deformação

miocárdica. Além disso, este período fixo de seleção minimizou um possível viés de lesão isquêmica pós-transplante, que pode ocorrer até o sexto mês após a cirurgia. Este é um período de adaptação, quando muitos pacientes ainda podem apresentar algum grau de disfunção sistólica do VD. O único estudo que analisou a deformação ventricular direita utilizando EST para diagnosticar rejeição, publicado por Mingo-Santos *et al.*⁴⁷, não excluiu pacientes com variação de área fracional abaixo do limite inferior da normalidade, incluindo indivíduos com 10 dias após o transplante cardíaco e não classificou os episódios de rejeição de acordo com seu significado clínico.

O presente estudo não confirmou os dados anteriores sobre a capacidade de *strain* longitudinal global do VE para prever rejeição. Postulou-se que isso poderia ter acontecido porque os valores absolutos de *strain* longitudinal global do VE do grupo transplantado, tanto com como sem RCA eram mais baixos. Portanto, a EST não foi sensível o suficiente para detectar a contribuição adicional da rejeição à disfunção subclínica basal do VE, que já é inerente aos corações transplantados. Outra possível explicação para a diferença encontrada nas medidas do VD, mas não nas do VE, é que o miocárdio do VD é composto sobretudo por fibras implantadas longitudinalmente. Assim, a análise da deformação miocárdica longitudinal pode ser particularmente relevante quando se tenta quantificar a função ventricular direita em comparação com a função ventricular esquerda.

O presente trabalho não encontrou qualquer associação entre marcadores diastólicos e rejeição. Os resultados encontrados na literatura

são altamente conflitantes e não podem ser replicados. Isso pode ser explicado pela limitação dos parâmetros da disfunção diastólica em decorrência de sua dependência da frequência cardíaca (que, geralmente, é elevada em pacientes transplantados, com fusão das ondas E e A), das condições de carga e idade do doador⁸⁴⁻⁸⁸.

Como a rejeição cardíaca está ligada à necrose dos cardiomiócitos e resulta em comprometimento da mecânica cardíaca, a liberação de troponina e BNP vem sendo avaliada como uma ferramenta potencial em seu diagnóstico^{67,68}. Há estudos controversos sobre esses biomarcadores no campo de TC^{89,90}. Este estudo utilizou um teste altamente sensível à detecção de troponina I, detectando níveis entre 10 e 100 vezes menores do que os ensaios-padrão. Os níveis de troponina I foram significativamente maiores nos pacientes com RCA. Entretanto, na análise multivariada, esta variável não foi um preditor independente. Níveis séricos de BNP não foram diferentes entre os grupos. Isso pode ser explicado pelo fato de que o BNP ainda permanece alterado na maioria dos pacientes de 6 meses até um ano após o TC, como sugerido por alguns estudos^{56,57}. Os resultados deste estudo estão de acordo com os de Bader *et al.*⁹¹, que observaram que os níveis de BNP não prediziam rejeição em qualquer momento após o TC, e sugerem que o BNP não é clinicamente útil para detecção de rejeição ou disfunção de aloenxertos.

5.1 Limitações do Estudo

O estudo apresentou algumas limitações. Primeiro, foi um estudo unicêntrico com um pequeno número de pacientes e um número limitado de rejeições classificadas como iguais ou acima de 2R (17 em 66 amostras). No entanto, os pacientes foram divididos de acordo com o significado clínico da rejeição celular e foi realizada uma análise multivariada, o que traz mais relevância aos achados.

Outro ponto é que, apesar do método de ecocardiografia com *speckle tracking* ter sido extensivamente validado, é uma técnica em evolução e ainda são necessárias melhorias, como na precisão do rastreamento dos pontos. Além disso, esta precisão também é altamente dependente da qualidade da imagem. Variáveis longitudinais são as mais acuradas. O *strain* circunferencial tem pior acurácia, seguindo-se dos parâmetros radiais. Isso pode ter tido algum impacto no poder da técnica em demonstrar diferenças entre os grupos. A resolução abaixo do ideal pode produzir um impacto negativo nos resultados finais. No entanto, apesar destas limitações, conseguiu-se realizar com sucesso a análise do *speckle tracking* em 92% dos pacientes para *strain* do VE e da parede livre do VD. A reprodutibilidade dos parâmetros utilizados foi boa, semelhante à relatada em outros estudos, mas esta abordagem poderia ser melhorada com os desenvolvimentos mais recentes da tecnologia.

Os transplantados com rejeição significativa eram mais hipertensos e diabéticos, do que o grupo de transplantados sem rejeição. Assim sendo, a análise de regressão logística múltipla foi realizada, não demonstrando

essas variáveis como fatores preditores para o desfecho encontrado de redução do SLPL-VD no grupo com rejeição significativa.

De qualquer forma, estes resultados devem ser validados de forma independente em uma coorte externa prospectiva, preferencialmente, em estudos multicêntricos, antes que possam ser utilizados na prática clínica.

6 CONCLUSÕES

Pelos dados analisados, pôde-se concluir que o coração transplantado tem dinâmica de contração ventricular própria, com valores absolutos de deformação e seus derivados (*strain*, *strain rate* e *twist*) mais baixos do que o coração não transplantado. A EST é uma técnica valiosa para detecção não invasiva de RCA em pacientes transplantados.

Strain longitudinal de parede livre de VD < 17,57% (valor absoluto) é um preditor independente de RCA significativa, com boa acurácia e alto valor preditivo negativo.

Embora a troponina I tenha sido menor em pacientes transplantados com RCA, não se mostrou preditor independente de rejeição.

7 ANEXOS

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido

TCLE Grupo Transplante

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **AVALIAÇÃO DE REJEIÇÃO AGUDA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS CARDÍACOS PELA TÉCNICA DE SPCKLE TRACKING**

2. PESQUISADOR: **JEANE MIKE TSUTSUI**

CARGO/FUNÇÃO: **MÉDICO** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 75682

UNIDADE DO HCFMUSP: **SERVIÇO DE ECOCARDIOGRAFIA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO (InCor)**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: **36 MESES**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 – Pessoas submetidas a transplante cardíaco podem ter problema de rejeição do “coração novo”, o que pode comprometer a contração cardíaca e que se não tratada adequadamente e a tempo pode comprometer a “força” desse coração transplantado. O objetivo desta pesquisa é avaliar a contração do coração, no repouso, por meio de um novo exame mais avançado de ecocardiograma chamado *speckle tracking*. Isso é importante para detectarmos alterações precoces que não foram vistas nos outros exames e permitir o ajuste de medicações que impedem a evolução dessa disfunção. Além disso, os resultados serão comparados com aqueles de um grupo de adultos saudáveis (grupo controle).

2 – Após a indicação da biópsia do coração, pela equipe do transplante, o Senhor/ a Senhora fará um exame de ecocardiograma 48 horas antes ou depois desse procedimento. No momento da biópsia, serão colhidas amostras de sangue por punção periférica da veia do antebraço para análise de alguns exames (BNP e Troponina I) que também podem se alterar nos casos de rejeição e ajudariam no diagnóstico. Esses exames não necessitam de preparo especial do paciente.

3- Ao término dos exames, os resultados ficarão disponíveis para o seu médico nos computadores do InCor.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

4 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, o Senhor/ a Senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra Jeane Mike Tsutsui, que pode ser encontrada no Centro de Pesquisa em Cardiologia e Ecocardiografia (CEPEC) do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas, cujo endereço é na Av. Enéias de Carvalho Aguiar 44,

Cerqueira César em São Paulo. Telefone para contato: (11) 2661-5646. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26, email: cappesq@hcnet.usp.br.

5 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo.

6 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

7 – O Senhor / a Senhora poderá ser mantido(a) atualizado(a) sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

8 – Despesas e compensações: para os pacientes ambulatoriais poderão ser pagos vale transporte e vale lanche. Não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

9 – Existe o compromisso do pesquisador de usar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

10 – Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "AVALIAÇÃO DE REJEIÇÃO AGUDA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS CARDÍACOS PELA TÉCNICA DE *SPECKLE TRACKING*".

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Eu discuti com a Prof. Dra. Jeane Mike Tsutsui a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é gratuita e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter recebido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

TCLE Grupo Controle

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **AVALIAÇÃO DE REJEIÇÃO AGUDA EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS CARDÍACOS PELA TÉCNICA DE SPCKLE TRACKING**
2. PESQUISADOR: **JEANE MIKE TSUTSUI**
- CARGO/FUNÇÃO: **MÉDICO** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 75682
- UNIDADE DO HCFMUSP: **SERVIÇO DE ECOCARDIOGRAFIA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO (InCor)**
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- | | | | |
|--------------|-------------------------------------|-------------|--------------------------|
| RISCO MÍNIMO | <input type="checkbox"/> | RISCO MÉDIO | <input type="checkbox"/> |
| RISCO BAIXO | <input checked="" type="checkbox"/> | RISCO MAIOR | <input type="checkbox"/> |
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: **36 MESES**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 – Pessoas submetidas a transplante cardíaco podem ter problema de rejeição do “coração novo”, o que pode comprometer a contração cardíaca e que se não tratada adequadamente e a tempo pode comprometer a “força” desse coração transplantado. O objetivo desta pesquisa é avaliar a contração do coração, no repouso, por meio de um novo exame mais avançado de ecocardiograma chamado *speckle tracking*. Isso é importante para detectarmos alterações precoces que não foram vistas nos outros exames e permitir o ajuste de medicações que impedem a evolução dessa disfunção. Além disso, os resultados serão comparados com aqueles de um grupo de adultos saudáveis (grupo controle).

2 – Os adultos do grupo controle serão submetidos a um exame de ecocardiograma. Esse exame não necessita de preparo especial do paciente e não oferece nenhum risco ao mesmo. Os pacientes desse grupo nos ajudarão a entender o quanto os pacientes transplantados são diferentes dos normais esperado para a idade.

3- Ao término dos exames, os resultados ficarão disponíveis para o seu médico nos computadores do InCor.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

4 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, o Senhor/ a Senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra Jeane Mike Tsutsui, que pode ser encontrada no Centro de Pesquisa em Cardiologia e Ecocardiografia (CEPEC) do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas, cujo endereço é na Av. Enéias de Carvalho Aguiar 44, Cerqueira César em São Paulo. Telefone para contato: (11) 2661-5646. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel:

2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26, email: cappesq@hcnet.usp.br.

5 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo.

6 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

7 – O Senhor / a Senhora poderá ser mantido(a) atualizado(a) sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

8 – Despesas e compensações: para os pacientes ambulatoriais poderão ser pagos vale transporte e vale lanche. Não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

9 – Existe o compromisso do pesquisador de usar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

10 – Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "AVALIAÇÃO DE REJEIÇÃO AGUDA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS CARDÍACOS PELA TÉCNICA DE *SPECKLE TRACKING*".

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Eu discuti com a Prof. Dra. Jeane Mike Tsutsui a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é gratuita e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter recebido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

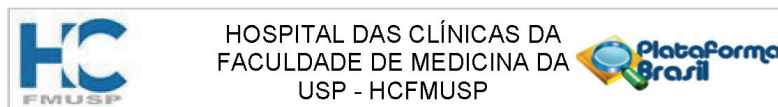
(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo B - Aprovação do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE REJEIÇÃO AGUDA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS CARDÍACOS PELA TÉCNICA DE SPECKLE TRACKING

Pesquisador: Jeane Mike Tsutsui

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 33362014.6.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO
HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 835.758

Data da Relatoria: 01/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo prospectivo em que a técnica de ecocardiografia com "speckle tracking" será testada em correlacionada aos dados de biopsia endomiocárdica do ventrículo direito em pacientes transplantados cardíacos. Adicionalmente serão analisados os valores de BNP e Troponina I frente aos resultados da biopsia. Tem finalidade acadêmica para Doutorado de Cecilia Beatriz B Viana Cruz, sob orientação de Jeane Miki Tsutsui

Objetivo da Pesquisa:

Verificar se a ecocardiografia com "speckle tracking" pode ser utilizada como um método diagnóstico não invasivo de rejeição aguda celular em pacientes transplantados cardíacos e a utilidade de marcadores sanguíneos BNP e troponina I para esse diagnóstico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos adicionais ao cuidado dos pacientes é mínimo. Há potencial benefício para o indivíduo pois se o método for indicativo de rejeição ele pode ajudar a otimizar o esquema de medicação imunossupressora. Para a coletividade o benefício pode ser grande se o método mostrar-se útil,

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 835.758

pois trata-se de método não invasivo para o diagnóstico da rejeição.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem delineado, de grande interesse prático. O estudo é factível na instituição, com previsão orçamentária adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Houve adequação do TCLE e redação de TCLE para controles

Recomendações:

Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 17 de Outubro de 2014

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8 REFERÊNCIAS

1. Luckraz H, Sharples LD, Charman SC, Tsui SS, Wallwork J, Parameshwar J, Large SR. Does heart transplantation confer survival benefit in all risk groups? *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(9):1231-4.
2. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Keck BM, Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report--2004. *J Heart Lung Transplant*. 2004;23(7):796-803.
3. Bacal F, de Lima MG, Manrique R, Higuchi Mde L, Brofman P, Tenório D, de Souza JD, de Carvalho AC, de Souza MM. I Guidelines of the Brazilian Cardiology Society for Heart Transplantation: IV. Rejection]. *Arq Bras Cardiol*. 1999;73 Suppl 5:21-6.
4. Lindenfeld J, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, Mestroni L, Page RL 2nd, Kobashigawa J. Drug therapy in the heart transplant recipient: part I: cardiac rejection and immunosuppressive drugs. *Circulation*. 2004;110(24):3734-40.

5. Reed EF, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Kobashigawa JA, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose M, Stewart S, Suci-Foca N, Zeevi A, Fishbein MC; International Society for Heart and Lung Transplantation. Acute antibody-mediated rejection of cardiac transplants. *J Heart Lung Transplant.* 2006;25(2):153-9.
6. Colvin MM, Cook JL, Chang P, Francis G, Hsu DT, Kiernan MS, et al. Antibody-mediated rejection in cardiac transplantation: emerging knowledge in diagnosis and management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2015;131(18):1608-39.
7. Berry GJ, Burke MM, Andersen C, Bruneval P, Fedrigo M, Fishbein MC, Goddard M, Hammond EH, Leone O, Marboe C, Miller D, Neil D, Rassl D, Revelo MP, Rice A, Rene Rodriguez E, Stewart S, Tan CD, Winters GL, West L, Mehra MR, Angelini A. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2013;32(12):1147-62.
8. Berry GJ, Angelini A, Burke MM, Bruneval P, Fishbein MC, Hammond E, Miller D, Neil D, Revelo MP, Rodriguez ER, Stewart S, Tan CD, Winters GL, Kobashigawa J, Mehra MR. The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: evolution and current status (2005-2011). *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(6):601-11.

9. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Marboe CC, McManus B, Reed EF, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose AG, Rose M, Suciu-Focia N, Zeevi A, Billingham ME. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(11):1710-20.
10. Gradek WQ, D'Amico C, Smith AL, Vega D, Book WM. Routine surveillance endomyocardial biopsy continues to detect significant rejection late after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20(5):497-502.
11. Tan CD, Baldwin WM, 3rd, Rodriguez ER. Update on cardiac transplantation pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(8):1169-91.
12. Saraiva F, Matos V, Goncalves L, Antunes M, Providencia LA. Complications of endomyocardial biopsy in heart transplant patients: a retrospective study of 2117 consecutive procedures. *Transplant Proc*. 2011;43(5):1908-12.
13. Yilmaz A, Kindermann I, Kindermann M, Mahfoud F, Ukena C, Athanasiadis A, Hill S, Mahrholdt H, Voehringer M, Schieber M, Klingel K, Kandolf R, Böhm M, Sechtem U. Comparative evaluation of left and right ventricular endomyocardial biopsy: differences in complication rate and diagnostic performance. *Circulation*. 2010;122(9):900-9.

14. Holzmann M, Nicko A, Kühl U, Noutsias M, Poller W, Hoffmann W, Morguet A, Witzenbichler B, Tschöpe C, Schultheiss HP, Pauschinger M. Complication rate of right ventricular endomyocardial biopsy via the femoral approach: a retrospective and prospective study analyzing 3048 diagnostic procedures over an 11-year period. *Circulation*. 2008;118(17):1722-8.
15. Deckers JW, Hare JM, Baughman KL. Complications of transvenous right ventricular endomyocardial biopsy in adult patients with cardiomyopathy: a seven-year survey of 546 consecutive diagnostic procedures in a tertiary referral center. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19(1):43-7.
16. Nguyen V, Cantarovich M, Cecere R, Giannetti N. Tricuspid regurgitation after cardiac transplantation: how many biopsies are too many? *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(7 Suppl):S227-31.
17. Mielniczuk L, Haddad H, Davies RA, Veinot JP. Tricuspid valve chordal tissue in endomyocardial biopsy specimens of patients with significant tricuspid regurgitation. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(10):1586-90.
18. Frustaci A, Pieroni M, Chimenti C. The role of endomyocardial biopsy in the diagnosis of cardiomyopathies. *Ital Heart J*. 2002;3(6):348-53.
19. Felker GM, Hu W, Hare JM, Hruban RH, Baughman KL, Kasper EK. The spectrum of dilated cardiomyopathy. The Johns Hopkins experience with 1,278 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1999;78(4):270-83.

20. Zakliczynski M, Nozynski J, Konecka-Mrowka D, Pyka L, Trybunia D, Swierad M, Maruszewski M, Zembala M. Quilty effect correlates with biopsy-proven acute cellular rejection but does not predict transplanted heart coronary artery vasculopathy. *J Heart Lung Transplant.* 2009;28(3):255-9.
21. Pardo-Mindan FJ, Lozano MD. "Quilty effect" in heart transplantation: is it related to acute rejection? *J Heart Lung Transplant.* 1991;10(6):937-41.
22. Forbes RD, Rowan RA, Billingham ME. Endocardial infiltrates in human heart transplants: a serial biopsy analysis comparing four immunosuppression protocols. *Hum Pathol.* 1990;21(8):850-5.
23. Spratt P, Sivathasan C, Macdonald P, Keogh A, Chang V. Role of routine endomyocardial biopsy to monitor late rejection after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1991;10(6):912-4.
24. Mehra MR, Uber PA, Uber WE, Park MH, Scott RL. Anything but a biopsy: noninvasive monitoring for cardiac allograft rejection. *Curr Opin Cardiol.* 2002;17(2):131-6.
25. Valantine HA, Schnittger I. The role of echocardiography in the evaluation of patients after heart transplantation. In: Otto CM editor. *The practice of clinical echocardiography.* Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2002:658-78.

26. St Goar FG, Gibbons R, Schnittger I, Valantine HA, Popp RL. Left ventricular diastolic function. Doppler echocardiographic changes soon after cardiac transplantation. *Circulation*. 1990;82(3):872-8.
27. Sagar KB, Hastillo A, Wolfgang TC, Lower RR, Hess ML. Left ventricular mass by M-mode echocardiography in cardiac transplant patients with acute rejection. *Circulation*. 1981;64(2 Pt 2):II217-20.
28. Ciliberto GR, Anjos MC, Gronda E, Bonacina E, Danzi G, Colombo P, Mangiavacchi M, Alberti A, Frigerio M, De Vita C. Significance of pericardial effusion after heart transplantation. *Am J Cardiol*. 1995;76(4):297-300.
29. Cladellas M, Abadal ML, Pons-Lladó G, Ballester M, Carreras F, Obrador D, Garcia-Moll M, Padró JM, Aris A, Caralps JM. Early transient multivalvular regurgitation detected by pulsed Doppler in cardiac transplantation. *Am J Cardiol*. 1986;58(11):1122-4.
30. Valantine HA, Yeoh TK, Gibbons R, McCarthy P, Stinson EB, Billingham ME, Popp RL. Sensitivity and specificity of diastolic indexes for rejection surveillance: temporal correlation with endomyocardial biopsy. *J Heart Lung Transplant*. 1991;10(5 Pt 1):757-65.
31. Dendel M, Hetzer R. Echocardiographic strain and strain rate imaging - Clinical applications. *Int J Cardiol*. 2009;132:11-24.

32. Perk G, Tunick PA, Kronzon I. Non-Doppler two-dimensional strain imaging by echocardiography – From technical considerations to clinical applications. *J Am Soc Echocardiogr.* 2007;49(19):1903-14.
33. Geyer H, Caracciolo G, Abe H, Wilansky S, Carerj S, Gentile F, Nesser HJ, Khandheria B, Narula J, Sengupta PP. Assessment of myocardial mechanics using speckle tracking echocardiography: fundamental and clinical applications. *J Am Soc Echocardiogr.* 2010;23:351-69.
34. D'hooge J, Heimdal A, Jamal F, Kukulski T, Bijnens B, Rademakers F, Hatle L, Suetens P, Sutherland GR. Regional strain and strain rate measurements by cardiac ultrasound: principals, implementation and limitations. *Eur J Echocardiogr.* 2000;1:154-70.
35. Torrent-Guasp F, Kocica MJ, Corno AF, Komeda M, Carreras-Costa F, Flotats A, Cosin-Aguillar J, Wen H. Towards new understanding of the heart structure and function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005;27(2):191-201.
36. Buckberg GD. Basic science review: the helix and the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;124(5):863-83.
37. Helle-Valle T, Crosby J, Edvardsen T, Lyseggen E, Amundsen BH, Smith HJ, Rosen BD, Lima JA, Torp H, Ihlen H, Smiseth OA. New noninvasive method for assessment of left ventricular rotation: speckle tracking echocardiography. *Circulation.* 2005;112(20):3149-56.

38. Amundsen BH, Helle-Valle T, Edvardsen T, Torp H, Crosby J, Lyseggen E, Støylen A, Ihlen H, Lima JA, Smiseth OA, Slørdahl SA. Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(4):789-93.
39. Fuchs E, Muller MF, Oswald H, Thony H, Mohacsi P, Hess OM. Cardiac rotation and relaxation in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2004;6(6):715-22.
40. Opdahl A, Helle-Valle T, Remme EW, Vartdal T, Pettersen E, Lunde K, Edvardsen T, Smiseth OA. Apical rotation by speckle tracking echocardiography: a simplified bedside index of left ventricular twist. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008;21(10):1121-8.
41. Kim HK, Sohn DW, Lee SE, Choi SY, Park JS, Kim YJ, Oh BH, Park YB, Choi YS. Assessment of left ventricular rotation and torsion with two-dimensional speckle tracking echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2007;20(1):45-53.
42. Bansal M, Leano RL, Marwick TH. Clinical assessment of left ventricular systolic torsion: effects of myocardial infarction and ischemia. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008;21(8):887-94.
43. Park SJ, Miyazaki C, Bruce CJ, Ommen S, Miller FA, Oh JK. Left ventricular torsion by two-dimensional speckle tracking echocardiography in patients with diastolic dysfunction and normal ejection fraction. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008;21(10):1129-37.

44. Nagel E, Stuber M, Burkhard B, Fischer SE, Scheidegger MB, Boesiger P, Hess OM. Cardiac rotation and relaxation in patients with aortic valve stenosis. *Eur Heart J*. 2000;21(7):582-9.
45. Shi J, Pan C, Shu X, Sun M, Yang Z, Zhu S, Wang C. The role of speckle tracking imaging in the noninvasive detection of acute rejection after heterotopic cardiac transplantation in rats. *Acta Cardiol*. 2011;66(6):779-85.
46. Ambardekar AV, Alluri N, Patel AC, Lindenfeld J, Dorosz JL. Myocardial strain and strain rate from speckle-tracking echocardiography are unable to differentiate asymptomatic biopsy-proven cellular rejection in the first year after cardiac transplantation. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28(4):478-85.
47. Mingo-Santos S, Moñivas-Palomero V, Garcia-Lunar I, Mitroi CD, Goirigolzarri-Artaza J, Rivero B, Oteo JF, Castedo E, González-Mirelis J, Cavero MA, Gómez-Bueno M, Segovia J, Alonso-Pulpón L. Usefulness of Two-Dimensional Strain Parameters to Diagnose Acute Rejection after Heart Transplantation. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28(10):1149-56.
48. Pichler P, Binder T, Höfer P, Bergler-Klein J, Goliash G, Lajic N, Aliabadi A, Zuckermann A, Syeda B. Two-dimensional speckle tracking echocardiography in heart transplant patients: three-year follow-up of deformation parameters and ejection fraction derived from transthoracic echocardiography. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2012;13(2):181-6.

49. Moñivas Palomero V, Mingo Santos S, Goirigolzarri Artaza J, Rodriguez Gonzalez E, Restrepo Córdoba MA, Jiménez Sanchez D, Rivero Arribas B, Garcia Lunar I, Mitroi CD, Sayago Silva I, Cavero Gibanel MA, Gómez Bueno M, Alonso Pulpón LA, Segovia Cubero J. Two-dimensional speckle tracking echocardiography in heart transplant patients: two-year follow-up of right and left ventricular function. *Echocardiography*. 2016;33(5):703-13.
50. Maack T. The broad homeostatic role of natriuretic peptides. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(2):198-207.
51. Kruger S, Graf J, Kunz D, Stickel T, Hanrath P, Janssens U. brain natriuretic peptide levels predict functional capacity in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(4):718-22.
52. Tang WH, Girod JP, Lee MJ, Starling RC, Young JB, Van Lente F, Francis GS. Plasma B-type natriuretic peptide levels in ambulatory patients with established chronic symptomatic systolic heart failure. *Circulation*. 2003;108(24):2964-6.
53. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, Wolf PA, Vasan RS. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med*. 2004;350(7):655-63.
54. Ationu A, Sorensen K, Whitehead B, Singer D, Burch M, Carter ND. Ventricular expression of brain natriuretic peptide gene following orthotopic cardiac transplantation in children--a three year follow up. *Cardiovasc Res*. 1993;27(12):2135-9.

55. Shaw SM, Fildes J, Yonan N, Williams SG. Does brain natriuretic peptide interact with the immune system after cardiac transplantation? *Transplantation*. 2007;84(11):1377-81.
56. Hervás I, Almenar L, Pérez-Pastor JL, Chirivella M, Osa A, Martínez-Dolz L, Bello P, Martí JF, Arnau MA, Vera F, Rueda J, Palencia M, Mateo A. Radioimmunoassay of B-type natriuretic peptide (BNP) in heart transplantation: correlation between BNP determinations and biopsy grading of rejection. *Nucl Med Commun*. 2003;24(8):925-31.
57. Gardner RS, Chong KS, Murday AJ, Morton JJ, McDonagh TA. N-terminal brain natriuretic peptide is predictive of death after cardiac transplantation. *Heart*. 2006;92(1):121-3.
58. Martínez-Dolz L, Almenar L, Hervás I, Moro J, Agüero J, Sánchez-Lázaro I, Mateo A, Salvador A. Prognostic relationship between two serial determinations of B-type natriuretic peptide and medium-long-term events in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27(7):735-40.
59. Rossano JW, Denfield SW, Kim JJ, Price JF, Jefferies JL, Decker JA, Smith EO, Clunie SK, Towbin JA, Dreyer WJ. B-type natriuretic peptide is a sensitive screening test for acute rejection in pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27(6):649-54.
60. de Godoy MF, Braile DM, Purini Neto J. Troponin as myocardial cell injury marker. *Arq Bras Cardiol*. 1998;71(4):629-33.

61. Adams JE 3rd, Bodor GS, Dávila-Roman VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson JH, Jaffe AS. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation*. 1993;88(1):101-6.
62. Bodor GS, Porterfield D, Voss EM, Smith S, Apple FS. Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. *Clin Chem*. 1995;41(12 Pt 1):1710-5.
63. Jaffe AS, Vasile VC, Milone M, Saenger AK, Olson KN, Apple FS. Diseased skeletal muscle: a noncardiac source of increased circulating concentrations of cardiac troponin T. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(17):1819-24.
64. Panteghini M, Pagani F, Yeo KT, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Ravkilde J, Wu AH; Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem*. 2004;50(2):327-32.
65. Apple FS, Quist HE, Doyle PJ, Otto AP, Murakami MM. Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations. *Clin Chem*. 2003;49(8):1331-6.

66. Ricchiuti V, Voss EM, Ney A, Odland M, Anderson PA, Apple FS. Cardiac troponin T isoforms expressed in renal diseased skeletal muscle will not cause false-positive results by the second generation cardiac troponin T assay by Boehringer Mannheim. *Clin Chem.* 1998;44(9):1919-24.
67. Zimmermann R, Baki S, Dengler TJ, Ring GH, Remppis A, Lange R, Hagl S, Kübler W, Katus HA. Troponin T release after heart transplantation. *Br Heart J.* 1993;69(5):395-8.
68. Dengler TJ, Zimmermann R, Braun K, Müller-Bardorff M, Zehelein J, Sack FU, Schnabel PA, Kübler W, Katus HA. Elevated serum concentrations of cardiac troponin T in acute allograft rejection after human heart transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(2):405-12.
69. Mullen JC, Bentley MJ, Scherr KD, Chorney SG, Burton NI, Tymchak WJ, Koshal A, Modry DL. Troponin T and I are not reliable markers of cardiac transplant rejection. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002;22(2):233-7.
70. Moran AM, Lipshultz SE, Rifai N, O'Brien P, Mooney H, Perry S, Perez-Atayde A, Lipsitz SR, Colan SD. Non-invasive assessment of rejection in pediatric transplant patients: serologic and echocardiographic prediction of biopsy-proven myocardial rejection. *J Heart Lung Transplant.* 2000;19(8):756-64.

71. Balduini A, Campana C, Ceresa M, Arbustini E, Bosoni T, Serio A, Tinelli C, Viganò M, Melzi D'Eril GL, Tavazzi L, Moratti R, Merlini G. Utility of biochemical markers in the follow-up of heart transplant recipients. *Transplant Proc.* 2003;35(8):3075-8.
72. Chance JJ, Segal JB, Wallerson G, Kasper E, Hruban RH, Kickler TS, Chan DW. Cardiac troponin T and C-reactive protein as markers of acute cardiac allograft rejection. *Clin Chim Acta.* 2001;312(1-2):31-9.
73. Dyer AK, Barnes AP, Fixler DE, Shah TK, Sutcliffe DL, Hashim I, Drazner MH, de Lemos JA. Use of a highly sensitive assay for cardiac troponin T and N-terminal pro-brain natriuretic peptide to diagnose acute rejection in pediatric cardiac transplant recipients. *Am Heart J.* 2012;163(4):595-600.
74. Barbosa MM, Nunes MCP, Campos Filho O, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes das Indicações da Ecocardiografia. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(6 Supl.3):e265-e302.
75. Pellikka PA, Nagueh SF, Elhendy AA, Kuehl CA, Sawada SG, American Society of E. American Society of Echocardiography recommendations for performance, interpretation, and application of stress echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2007;20(9):1021-41.
76. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol.* 1986;57(6):450-8.

77. Ingvarsson A, Werther Evaldsson A, Waktare J, Nilsson J, Smith GJ, Stagmo M, Roijer A, Rådegran G, Meurling CJ. Normal reference ranges for transthoracic echocardiography following heart transplantation. *J Am Soc Echocardiogr.* 2018;31(3):349-60.
78. Murphy J, Frantz R, Cooper L. Endomyocardial biopsy (123). In Murphy J, Lloyd M editores: *Mayo Clinic Cardiology Concise Textbook.* Minnesota: Rochester; 2007, p 1481.
79. Strecker T, Rosch J, Weyand M, Agaimy A. Endomyocardial biopsy for monitoring heart transplant patients: 11-years-experience at a german heart center. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(1):55-65.
80. Holweg CT, Potena L, Luikart H, Yu T, Berry GJ, Cooke JP, Valentine HA, Mocarski ES. Identification and classification of acute cardiac rejection by intragraft transcriptional profiling. *Circulation.* 2011;123(20):2236-43.
81. Wu YL, Ye Q, Ho C. Cellular and functional imaging of cardiac transplant rejection. *Curr Cardiovasc Imaging Rep.* 2011;4(1):50-62.
82. Pieper GM, Shah A, Harmann L, Cooley BC, Ionova IA, Migrino RQ. Speckle-tracking 2-dimensional strain echocardiography: a new noninvasive imaging tool to evaluate acute rejection in cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29(9):1039-46.

83. Sera F, Kato TS, Farr M, Russo C, Jin Z, Marboe CC, Di Tullio MR, Mancini D, Homma S. Left ventricular longitudinal strain by speckle-tracking echocardiography is associated with treatment-requiring cardiac allograft rejection. *J Card Fail.* 2014;20(5):359-64.
84. Mena C, Wencker D, Krumholz HM, McNamara RL. Detection of heart transplant rejection in adults by echocardiographic diastolic indices: a systematic review of the literature. *J Am Soc Echocardiogr.* 2006;19(10):1295-300.
85. Dandel M, Hummel M, Müller J, Wellnhofer E, Meyer R, Solowjowa N, Ewert R, Hetzer R. Reliability of tissue Doppler wall motion monitoring after heart transplantation for replacement of invasive routine screenings by optimally timed cardiac biopsies and catheterizations. *Circulation.* 2001;104(12 Suppl 1):I184-91.
86. Sun JP, Abdalla IA, Asher CR, Greenberg NL, Popović ZB, Taylor DO, Starling RC, Thomas JD, Garcia MJ. Non-invasive evaluation of orthotopic heart transplant rejection by echocardiography. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(2):160-5.
87. Sade LE, Sezgin A, Ulucam M, Taymaz S, Simşek V, Tayfun E, Tokel K, Aşlamaci S, Müderrisoğlu H. Evaluation of the potential role of echocardiography in the detection of allograft rejection in heart transplant recipients. *Transplant Proc.* 2006;38(2):636-8.

88. Stengel SM, Allemann Y, Zimmerli M, Lipp E, Kucher N, Mohacsi P, Seiler C. Doppler tissue imaging for assessing left ventricular diastolic dysfunction in heart transplant rejection. *Heart*. 2001;86(4):432-7.
89. Fitzsimons S, Evans J, Parameshwar J, Pettit SJ. Utility of troponin assays for exclusion of acute cellular rejection after heart transplantation: A systematic review. *J Heart Lung Transplant*. 2018;37(5):631-8.
90. Talha S, Charloux A, Piquard F, Geny B. Brain natriuretic peptide and right heart dysfunction after heart transplantation. *Clin Transplant*. 2017;31(6). doi: 10.1111/ctr.12969. Epub 2017 Apr 16.
91. Bader FM, Rogers RK, Kfoury AG, Gilbert EM, Horne BD, Stehlik J, Renlund DG. Time-dependent changes in B-type natriuretic peptide after heart transplantation: correlation with allograft rejection and function. *Congest Heart Fail*. 2009;15(2):63-7.