

**Reginaldo Cipullo**

**Vasculites e lesões isquêmicas imunomediadas como fatores preditores de mau  
prognóstico no transplante cardíaco**

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

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Noedir Antônio Groppo Stolf

**São Paulo**

**2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cipullo, Reginaldo

Vasculites e lesões isquêmicas imunomediadas como fatores preditores de mau prognóstico no transplante cardíaco / Reginaldo Cipullo. -- São Paulo, 2010.

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

Orientador: Noedir Antônio Groppo Stolf.

Descritores: 1.Biópsia 2.Vasculite 3.Eosinófilos 4.Transplante de coração

## **Dedicatória**

Dedico esta tese a Mariza Nazaré Martins Cipullo, minha esposa, e meus filhos Mariana Martins Cipullo, Pedro Martins Cipullo, e Gabriela Martins Cipullo, por todo amor, carinho, paciência e tolerância que recebi durante todos estes anos e também ao meu pai Ronaldo Cipullo e minha mãe Euzeli Aparecida Moreno Cipullo pelo carinho, orientação e amor que recebi durante toda a vida.

**Agradecimentos:**

As minhas irmãs Denise Cipullo Kunioshi e Marisa Cipullo Fontanes pela ajuda que recebi na redação da tese.

Aos meus tios Drs. José Paulo Cipullo e Roberto Cipullo pelo inestimável auxílio na revisão e correção do texto inicial.

Aos colegas de trabalho Marco Aurélio Finger e João Manuel Rossi pelas sábias opiniões freqüentes que muito auxiliaram durante todos estes anos.

As doutoras Mabel M. B. Zamorano e Lilian Mary as Silva por todo apoio que recebi no departamento de Anatomia Patológica todos estes anos e pelos conhecimentos e sugestões tão uteis na elaboração e condução deste trabalho.

E finalmente ao meu orientador Dr Noedir Antônio Groppo Stolf, pelos inestimáveis conhecimentos e opiniões que foram de grande valia para a execução desta tese

## Sumário

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	5
3	Revisão da literatura.....	6
3.1	Rejeições agudas.....	6
3.1.1	Importância clínica das rejeições agudas.....	6
3.1.2	Mecanismos fisiopatológicos.....	8
3.2	Biópsia endomiocárdica.....	13
3.3	Efeito Quilty.....	20
3.4	Vasculites.....	23
3.5	Lesões isquêmicas em transplante cardíaco.....	27
3.5.1	Lesões precoces.....	27
3.5.2	Lesões tardias.....	28
3.6	Eosinófilos e rejeições agudas.....	29
4	Método.....	31
4.1	População estudada.....	31
4.2	Biópsias endomiocárdicas.....	34

4.3 Acompanhamento clínico.....	45
4.4 Desenhos dos estudos .....	47
4.4.1 Desenho do estudo para analisar o desfecho clínico rejeição aguda.....	47
4.4.2 Desenho do estudo para analisar rejeição associada à grave comprometimento hemodinâmico.....	48
4.4.3 Desenho do estudo para analisar morte em decorrência de rejeição aguda.....	50
4.5 Análise estatística.....	51
5 Resultados.....	52
5.1 Descrição dos achados histológicos encontrados.....	52
5.2.1 Análise univariada para o desfecho clínico rejeição aguda.....	53
5.2.2 Análise univariada para o desfecho clínico rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico.....	55
5.2.3 Análise univariada para o desfecho clínico morte em decorrência de rejeição aguda.....	56
5.3 análise multivariada.....	57
5.3.1 Regressão proporcional de Cox para o desfecho clínico Rejeição aguda.....	57
5.3.2 Regressão proporcional de Cox para o desfecho clínico rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico.....	61
5.3.3 Regressão proporcional de Cox para o desfecho clínico morte devido à rejeição aguda.....	67
6 Discussão.....	73
7 Conclusões.....	81
8 Referências bibliográficas.....	82

## Lista de tabelas

Tabela 1- Comparação entre nomenclaturas padronizadas de rejeição cardíaca de 1990 e 2005.....	16
Tabela 2 - Frequência das lesões histológicas encontradas nas biópsias revisadas e na população de estudo.....	52
Tabela 3 - Análise univariada para o desfecho clínico rejeição aguda.....	54
Tabela 4 - Análise univariável desfecho clínico rejeição aguda com grave comprometimento hemodinâmico.....	55
TABELA 5 - Análise univariável para o desfecho clínico morte devido à rejeição aguda.....	56

## Lista de figuras

Figura 1 - Diagrama esquemático mostrando a classificação das vasculites quanto a sua intensidade.....	37
Figura 2 – Microfotografia mostrando vasculite leve, coloração hematoxilina eosina, aumento 200x.....	38
Figura 3- Microfotografia mostrando vasculite leve acometendo pequena artéria intramiocárdica, coloração hematoxilina eosina , aumento 200x.....	39
Figura 4- Microfotografia mostrando vasculite leve acometendo uma vênula, coloração hematoxilina eosina, aumento 200x.....	40
Figura 5- Microfotografia mostrando vasculite moderada acometendo pequena artéria intramiocárdica.....	41
Figura 6 – Microfotografia mostrando vasculite moderada acometendo vênula intramiocárdica, coloração hematoxilina eosina , aumento 200x.....	42
Figura 7 – Microfotografia demonstrando vasculite grave, com foco de lesão na parede do vaso.....	43
Figura 8 – Microfotografia mostrando pequena artéria intramiocárdica acometida por vasculite grave com intensa destruição da parede vascular.....	44
Figura 9 – Desenho do estudo para avaliar rejeição aguda.....	47
Figura 10 – Desenho do estudo para avaliar desfecho clínico rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico.....	51
Figura 11 - Desenho do estudo para avaliar morte devido à rejeição aguda.....	52

## Lista de gráficos

Gráfico 1 – Regressão de Cox para o desfecho clínico rejeição aguda.....	58
Gráfico 2 - Sobrevida livre de rejeição em pacientes com vasculites em biópsia endomiocárdica.....	60
Gráfico 3- Sobrevida livre de rejeição aguda em pacientes com eosinófilos no infiltrado intersticial.....	61
Gráfico 4 - Regressão de Cox para o desfecho clínico rejeição aguda associada co grave comprometimento hemodinâmico.....	63
Gráfico 5 - Sobrevida livre de rejeição associada à grave comprometimento hemodinâmico em pacientes com vasculites em suas biópsias endomiocárdicas.....	64
Gráfico 6 – sobrevida livre de rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico em pacientes que apresentam eosinófilos em suas biópsias endomiocárdicas.....	65
Gráfico 7- sobrevida livre de rejeição aguda com grave comprometimento hemodinâmico em pacientes com efeito Quilty.....	66
Gráfico 8 - regressão proporcional de Cox para o desfecho clínico morte devido à rejeição aguda.....	69
Gráfico 9 - sobrevida em pacientes com vasculites após transplante cardíaco.....	70
Gráfico 10 - sobrevida em pacientes com eosinófilos compondo o infiltrado endomiocárdico.....	71
Gráfico 11- sobrevida de pacientes com lesões isquêmicas nas biópsias endomiocárdicas.....	72

**Resumo:**

Cipullo R. Vasculites e isquemia imunomediadas como fatores preditores de mau prognóstico em transplante cardíaco [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo; 2010. 105 p.

**INTRODUÇÃO:** O significado clínico das vasculites, lesões isquêmicas, efeito Quilty e da presença de eosinófilos em biópsias endomiocárdicas de receptores de transplante cardíaco com rejeições leves não foi ainda estabelecido. **OBJETIVOS:** Verificar se estes achados histológicos encontrados nas biópsias endomiocárdicas (eosinófilos, vasculites, efeito Quilty e lesões isquêmicas) são capazes de predizer rejeição aguda do enxerto acompanhada ou não de grave comprometimento hemodinâmico e morte por rejeição aguda. **MÉTODOS:** Foram reavaliadas 939 biópsias endomiocárdicas consecutivas classificadas como OR ou 1R pela de 2005 da Nomenclatura da Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão e dividimos estas em dois grupos (1) Biópsias predictoras: aquelas que precederam rejeição aguda, rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico ou morte e (2) Biópsias não predictoras aquelas que não precederam eventos clínicos. Comparamos a ocorrência dos seguintes achados histológicos: vasculites, lesões isquêmicas, efeito Quilty e eosinófilos por análise uni e multivariada entre os grupos. **RESULTADOS:** Após análise estatística verificou-se que a presença de vasculite intensa e de eosinófilos como maiores preditores tanto para rejeição aguda futura, apresentando respectivamente as seguintes razões de chance: 10,60 (IC95%: 3,62 – 31,06.  $p < 0,001$ ) e 6,26 (IC95%: 3,16 – 12,43.  $p < 0,001$ ), quanto para rejeição aguda associada á grave comprometimento hemodinâmico, que para este desfecho clínico apresentaram respectivamente as seguintes razões de chance 7,52 (IC95%: 1,45-38,93.  $p = 0,016$ ) e 6,61 (IC95%: 2,38 – 18,31.  $p < 0,001$ ), e também para morte em decorrência a rejeição aguda com as respectivas razões de chance: 11,20

(IC95%: 3,53 – 36,17.  $p < 0,001$ ) e 14,50 (IC95%: 2,19 – 36,17.  $p = 0,006$ ).

**CONCLUSÕES:** Vasculites intensas e eosinófilos em biópsias do miocárdio são os principais fatores preditores de rejeição aguda, rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico e morte pós - transplante cardíaco.

**Descritores:** Biopsia, vasculite, eosinófilos, transplante de coração

## Summary

Abstract: Cipullo R Imuno mediated vasculitis and ischemia as predictor factors of bad prognosis in cardiac transplantation. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo; 2010. 105 p.

**INTRODUCTION:** The clinical meaning of vasculitis, ischemic lesions, Quilty effect and the presence of eosinophils in endomyocardial biopsies of transplant recipients with mild rejections have not been established yet. **OBJECTIVES:** Verify if these histological findings (eosinophils, vasculitis, Quilty effect and ischemic lesions), whose clinical meaning remains unknown so far, are able to predict acute rejection of the transplanted organ, accompanied or not by severe hemodynamic compromise and death due to acute rejection. **METHODS:** We reevaluated 939 consecutive endomyocardial biopsies classified as 0R or 1R, according to the nomenclature that the International Society for Heart and Lung Transplantation established in 2005. We divided these biopsies in 2 groups, as they follow: (1) Predictor biopsies, which are preceded by acute rejection, acute rejection associated to severe hemodynamic compromise or death and (2) Non-predictor biopsies that did not precede any clinical events. We compared the occurrence of the histological findings studied (eosinophils, vasculitis, Quilty effect and ischemic lesions) through univariate and multivariate analysis among the groups. **RESULTS:** After an appropriate statistical analysis, the result obtained was the presence of intense vasculitis and eosinophils as the greatest predictors of future acute rejection, presenting the respective odds ratio: 10,60 (IC95%: 3,62 – 31,06.  $p < 0,001$ ) and 6,26 (IC95%: 3,16 – 12,43.  $p < 0,001$ ), as well as acute rejection associated to severe hemodynamic compromise, which presented the respective odds ratio for this clinical outcome: 7,52 (IC95%: 1,45-38,93.  $p = 0,016$ ) and 6,61 (IC95%: 2,38 – 18,31.  $p < 0,001$ ) and death due to acute rejection, presenting the respective odds ratio: 11,20 (IC95%:

3,53 – 36,17.  $p < 0,001$ ) and 14,50 (IC95%: 2,19 – 36,17.  $p = 0,006$ ).

**CONCLUSIONS:** Intense vasculitis and eosinophils in myocardial biopsies post-cardiac transplantation are the chief factors that can predict acute rejection, acute rejection associated to severe hemodynamic compromise or death.

**Descriptors:** biopsy, vasculitis, eosinophils, heart transplantation

## **1- Introdução:**

A informação mais antiga sobre transplante de órgãos entre seres humanos na história ocidental é o milagre dos Santos Cosme e Damião, que data do terceiro século da era cristã. Diz a tradição popular que os santos removeram a perna cancerosa de um fiel de pele branca, e implantaram no lugar a perna morena de um mouro recém falecido. Quando a população da cidade averiguou o túmulo do mouro, encontraram sua perna removida e a perna branca cortada próxima ao seu corpo(1).

Apesar da idéia do transplante existir no imaginário popular desde os primórdios da Era Cristã, os primeiros experimentos de transplante de órgãos entre mamíferos foram realizados no início do século XX por Alexis Carrel. Este autor, com a colaboração de Charles Guthrie, descreveu o primeiro transplante cardíaco heterotópico em cães 1905 (2-4).

Em 1933, Mann e colaboradores, trabalhando com transplante cardíaco heterotópico implantados no pescoço de cachorros, obtiveram uma sobrevida máxima do enxerto de oito dias e chegaram à conclusão que existia um “fator biológico” fora do controle dos cirurgiões, que limitava a sobrevida do transplante de órgão(1;3). Este relato foi a primeira alusão à rejeição.

Durante a segunda guerra mundial, Peter Medwar e T. Gibson iniciaram uma série de observações clínicas que gerou a hipótese da rejeição do enxerto ser mediada por imunização ativa(2). Posteriormente, utilizando-se de experimentos de transplante de pele em coelhos, foi demonstrado que entre animais não aparentados ocorria a infiltração de linfócitos que destruíam o enxerto entre sete e dez dias. O mesmo não ocorria quando o transplante era feito entre coelhos gêmeos(3).

O progresso da cirurgia cardíaca e da imunologia ocorrido entre as décadas de 50 e 60 permitiram ao Dr. Christian Barnard, que, em três de dezembro de 1967, realizasse o primeiro transplante cardíaco entre seres humanos(1-4). Após a experiência inicial de Barnard, 102 transplantes foram realizados ao redor do mundo, com uma mortalidade de 60% nos oito primeiros dias após a cirurgia, e uma sobrevida média de apenas 29 dias. Com os resultados desanimadores do transplante cardíaco, a comunidade médica e a população geral desiludiram deste procedimento, praticamente o abandonando(5). Desta forma, na década de 70, poucos centros continuaram com o programa de transplante cardíaco ao redor do mundo(2).

Naquela época, o diagnóstico de rejeição do enxerto era feito através de alterações eletrocardiográficas, tais como: diminuição da voltagem do complexo QRS(3), desvio do eixo elétrico para direita e arritmias cardíacas, (4) o que não permitia o diagnóstico precoce da rejeição do enxerto. Em 1974, Phillippe Caves, pertencente ao grupo de Stanford, introduziu a biópsia endomiocárdica transcutânea em substituição ao eletrocardiograma para o diagnóstico de rejeição do enxerto. Estava solucionado o problema do diagnóstico precoce da rejeição aguda(1;4;6;7).

Com a disponibilidade da ciclosporina no início da década de 80, o transplante cardíaco voltou a tornar-se uma alternativa atraente para o tratamento da insuficiência cardíaca avançada, e a biópsia endomiocárdica passou a ser usada como uma ferramenta importante para o manejo dos receptores de transplante cardíacos. Nesta época surgiram vários sistemas de classificação histológica das rejeições em todo o mundo, o que impedia a comparação dos resultados do tratamento da rejeição entre os centros transplantadores, dificultando o progresso do conhecimento médico(7;8).

Em duas oportunidades diferentes no ano de 1989, Bruno Reichart, então presidente da Sociedade Internacional de Transplante de Coração, fez um apelo aos patologistas das equipes transplantadoras que criassem um sistema universal de gradação da rejeição celular, com o objetivo único de comparar efetivamente os resultados obtidos com o tratamento da rejeição nos diversos centros espalhados pela face da Terra(7;8).

Em Novembro de 1990 foi publicada a padronização da nomenclatura da rejeição em transplante cardíaco. Sendo um sistema de classificação simples e facilmente compreensível, foi adotado rapidamente pelos centros transplantadores ao redor do mundo, e serviu a comunidade transplantadora por mais de uma década. Sua revisão realizada em 2005 permite o seu uso até os dias atuais(9).

Apesar dos avanços da terapia imunossupressora, o típico receptor de transplante cardíaco apresenta entre uma a duas rejeições durante o primeiro ano de transplante cardíaco(10). Isto se deve, pelo menos em parte, a complexidade do sistema imune que possui vias redundantes de rejeição (11). Estas vias são acionadas quando a via efetora principal (Linfócito T CD8+) torna-se indisponível. Como exemplos de vias alternativas de rejeição, podemos citar: rejeição mediada por linfócitos CD4+(12), eosinófilos(11;13-17), células “natural Killer”, linfócitos B e neutrófilos (11).

A manifestação clínica da rejeição histológica depende da natureza e extensão do infiltrado inflamatório, assim como da presença de necrose de fibras miocárdicas. A disfunção do enxerto cardíaco correlaciona-se com a destruição dos miocitos e também com a produção de citocinas pelas células imunitárias capazes de induzir ao aumento de permeabilidade vascular, edema e disfunção endotelial, diminuição da produção de óxido nítrico e trombose da microcirculação (13).

A rejeição do enxerto cardíaco tem mortalidade entre cinco e seis por cento (18;19). Entretanto, quando acompanhada de sinais de diminuição do débito cardíaco ou choque cardiogênico, é associada com mortalidade em torno de 40% ao ano, tanto em transplante em adultos como pediátrico(20;21).

Após 35 anos do uso da biópsia do miocárdio como ferramenta diária no transplante cardíaco, e tendo uma nomenclatura padronizada para o diagnóstico de rejeição do enxerto bem definida e mundialmente aceita(9), ainda existem achados histológicos com significado clínico desconhecido, tais como: a presença de eosinófilos em rejeição leve ou mesmo na ausência desta(22;23), o efeito Quilty (infiltrado mononuclear endocárdico de aspecto nodular, constituído de linfócitos macrófagos e plasmócitos acompanhado de proliferação vascular e fibrose) (24-27), vasculites(28;29), micro infartos e lesões secundárias a isquemia (30).

## **2- Objetivos**

O objetivo primário desta pesquisa foi avaliar se a presença de vasculites em vasos intramiocárdicos e lesões isquêmicas em fibras miocárdicas, em biópsias cardíacas de pacientes sem rejeição ou com rejeição leve, são capazes de predizer o risco de: rejeição aguda, rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico e morte devido à rejeição aguda.

Objetivo secundário da pesquisa foi avaliar se a presença de eosinófilos compondo o infiltrado linfocitário e efeito Quilty são capazes de predizer o risco de: rejeição aguda, rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico e morte devido à rejeição aguda.

### **3 - Revisão da literatura**

#### **3.1- Rejeições agudas: importância clínica e mecanismos fisiopatológicos.**

##### **3.1.1 - Rejeições agudas e sua importância clínica.**

Ainda hoje a rejeição aguda celular é uma causa importante de morte no primeiro ano após o transplante cardíaco, sendo responsável por 12% do total de óbitos entre o 30º e 365º dias após a cirurgia (31) e a principal causa de morte súbita durante o primeiro ano de pós-operatório(32). Entre os pacientes submetidos a transplante cardíaco, 20% a 40% irão apresentar rejeições durante o primeiro ano de pós-operatório(33). Entretanto, após este período, esta complicação torna-se infrequente(34).

Cada episódio de rejeição possui um risco global de morte entre cinco e seis por cento(18;19). Porém, quando a rejeição é acompanhada de sinais de insuficiência cardíaca, a mortalidade pode ser elevada, até 40 % após o terceiro mês do início evento(20;21). Curiosamente, os pacientes que possuem rejeição celular moderada ou grave (2R ou 3R) e disfunção ventricular possuem risco de morte quase três vezes maior na primeira semana após o início do quadro, em comparação com pacientes que apresentam rejeição celular ausente ou leve (0R ou 1R) associados a comprometimento hemodinâmico. Entretanto, a sobrevivência deste segundo grupo é de apenas 46% ao final de dois anos, em comparação com 80% do grupo que apresentou rejeição maior ou igual a 2R (p=0,001) (20).

Um levantamento feito na Universidade da Califórnia em 2004 mostrou que apenas três por cento das biópsias correspondem a rejeições moderadas (2R) ou graves (3R). Entretanto, 10% a 20% das rejeições são acompanhadas de disfunção ventricular,

e grande parte destas deve-se à rejeição mediada por anticorpos(6;33). Este tipo de rejeição é acompanhado de queda do desempenho do ventrículo esquerdo, insuficiência cardíaca e choque cardiogênico em quase metade dos casos e é associado ainda à alta mortalidade (6;10;35;36).

Por microscopia óptica, a rejeição mediada por anticorpos pode ser reconhecida pela lesão dos capilares miocárdicos com edema de células endoteliais e acúmulo intravascular de macrófagos. Edema intersticial e hemorragia podem ser encontrados com neutrófilos dentro e em torno dos capilares(9;27). Apesar da recomendação da Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão, que sugere que procuremos indícios de rejeição mediada por anticorpos através da observação de lesões histológicas por microscopia óptica, há autores que contestam esta prática, não acreditando que ela permita rastrear rejeição mediada por anticorpos (37).

### 3.1.2- Mecanismos fisiopatológicos

O transplante entre indivíduos geneticamente diferentes induz uma resposta imune no receptor em decorrência dos antígenos do doador. Os efeitos biológicos gerados a partir do estímulo inicial são cumulativos e em cascata, e, se incontrolados, podem destruir o tecido enxertado e pôr em risco a vida do receptor(38).

O evento inicial ocorre quando o coração transplantado é reperfundido com sangue do receptor durante a etapa final do procedimento cirúrgico. Nesta ocasião, além das células imunes do receptor entrarem em contato com o endotélio do doador, outros componentes não próprios do doador, tais como; células, proteínas solúveis e debris, são levados, pela circulação sanguínea, para outras partes do corpo do receptor onde em poucos minutos são capturados pelo baço e por linfonodos. Nestes órgãos linfóides, ricos em células dendríticas e macrófagos, capazes de armazenar e processar grande quantidade de antígenos, é que se encontraram pela primeira vez as moléculas não próprias do doador com componentes do sistema imune do receptor (39).

Os principais antígenos envolvidos no processo de rejeição do enxerto fazem parte do sistema HLA, que é constituído de glicoproteínas polimórficas codificadas presentes na superfície celular(38). Os antígenos HLA são divididos em três subgrupos (I, II e III), mas apenas as moléculas tipo I e II são importantes para o transplante de órgãos(39). Os antígenos HLA I estão presentes na maioria das células nucleadas; já os antígenos HLA II, que estão presentes nos linfócitos B, monócitos e macrófagos, sob o estímulo do interferon gama podem também ser expressos no endotélio vascular(12;38).

Os linfócitos T representam a parcela mais importante da resposta imune celular do receptor ao aloantígeno presente no coração transplantado. Eles possuem o receptor de membrana CD3 e CD4 (linfócito T auxiliar) ou CD8 (linfócito citotóxico). A função

inicial do linfócito CD4 é reconhecer antígenos não próprios e, depois de ativado, recrutar outras células tais como: outros linfócitos CD4, linfócitos CD8, macrófagos (39), eosinófilos(11;40), neutrófilos (11) ou outras células inflamatórias. Os linfócitos CD8 são as células efetoras principais do sistema imune, e sua função básica é exterminar as células alvo, ou seja, que possuam HLA não próprio(39).

O reconhecimento do antígeno pode ocorrer quando as células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, monócitos e macrófagos) do doador apresentam seu próprio HLA para os linfócitos CD4 ou CD8 do receptor, e quando ativados, esta via de reconhecimento é denominada via direta, sendo de grande importância no mecanismo de rejeição aguda. A via indireta ocorre quando peptídeos do sistema HLA são exibidos por células apresentadoras de antígenos através dos receptores MHC II(38;39). Um linfócito em cada cinco mil reconhece as moléculas MHC intactas (via direta), enquanto que pela via indireta é da ordem de 1: 100.000 a 1: 1.000.000(41).

A apresentação do antígeno ao linfócito T virgem (conhecido como primeiro sinal) gera uma sinalização transmembrana necessária, porém insuficiente para a expansão clonal(39). Os receptores CD 80 e CD86, presentes nas células apresentadoras de antígenos, entram em contato com o receptor CD 28 do linfócito, gerando o segundo sinal, e ocasionando aumento de produção de citocinas, entre elas a interleucina 2 que ativa a produção clonal de linfócitos, interleucina 3 que ativa a produção clonal de macrófagos e plasmócitos, interferon gama que estimula a produção clonal de linfócitos T citotóxico, interleucinas 4,5,e,6 que são capazes de induzir rejeição mediada por anticorpos e a produção clonal de eosinófilos (38).

A ativação do linfócito B inicia-se com a captura do antígeno pelas imunoglobulinas presentes na superfície das células. O antígeno é levado para dentro da

célula, degradado, processado em peptídeos, carregados nas estrias da molécula MHC classe II e devolvida à superfície da célula B. A primeira célula T específica para antígeno fixa-se no complexo MHC e inicia um processo de ativação mútua. Como produto final da ativação da célula B obtém-se a produção de anticorpos e linfócitos B de memória(39).

O primeiro sinal inicia-se na captura do antígeno pelas imunoglobulinas na superfície da célula. Este é transportado ao interior da célula e processado da mesma maneira que é feito nas células apresentadoras de antígenos e as proteínas não próprias são fixadas na molécula MHC classe II e retornam para a superfície celular(39).

Quando a célula B entra nos linfonodos ou no baço, ela pode encontrar um linfócito T capaz de fixar-se no complexo antígeno não próprio e na molécula MHC. O contato entre os linfócitos B com as células CD4 faz com que o linfócito T produza citocinas e sintetize a molécula CD40 "ligand", que rapidamente fixa-se ao receptor CD40 do linfócito B, causando sua proliferação clonal e diferenciação em plasmócitos prontos para secretar anticorpos. Por sua vez, a célula B aumenta a expressão dos receptores CD 80 e 86 facilitando o segundo sinal da célula T(39). Talvez por esta interação entre linfócitos B e T é que freqüentemente temos rejeição humoral acompanhando rejeição vascular(10).

O endotélio vascular é a primeira interface entre o tecido não próprio do enxerto e o tecido próprio do doador(42). Ele é capaz de apresentar antígenos indiretamente, induzindo macrófagos a tornarem-se células apresentadoras de antígenos, ou podem apresentar antígenos HLA classe II diretamente, servindo de apresentador de antígeno e ao mesmo tempo alvo para célula T citotóxica(12;38).

Os leucócitos são capazes de migrar entre o endotélio vascular para entrar no local onde ocorre a inflamação. Este processo é elaborado por quimiocinas e interações entre o endotélio e os leucócitos; as células ativadas e de memória produzem proteínas de adesão e quimiocinas capazes de levá-las a migrar e alojar-se em tecidos periféricos(12;38;39).

O leucócito rola através do endotélio por um período inicial controlado por proteínas chamadas Selectinas, posteriormente por outro grupo de proteínas conhecidas como: Integrinas e moléculas de adesão ICAM e VCAM os fazem parar de rolar e iniciam a sua passagem pela membrana endotelial(38).

Os linfócitos T citotóxicos ativados possuem memória imunológica, o que dificulta a formação de tolerância no receptor(11). Eles administram seu “golpe letal” em células alvo que possuam antígeno específico, poupando dano às células vizinhas livres da proteína não própria, através de dois mecanismos: primeiro pela liberação de moléculas chamadas perforinas e granzimas, ambas capazes de perfurar a membrana de células alvo, levando-as à morte. O segundo mecanismo é efetuado através da indução da célula alvo a apoptose pela estimulação da molécula Fas (CD95) da célula alvo pela proteína de superfície da célula citotóxica chamada Fas (CD95) “ligand”(39).

Existem células efetoras que tem mecanismo de ação não específico, ou seja, capazes de exterminar células não marcadas como alvos. Entre estas células encontraram os linfócitos natural killer eosinófilos, monócitos, macrófagos, granulócitos e mastócitos. Estas células podem ser utilizadas em rejeições graves(9) ou quando a via do linfócito T citotóxico não estiver disponível (11).

Os linfócitos T auxiliares tipo 1 são produtores de interferon gama e estimulam a produção dos linfócitos T citotóxicos, sendo esta a principal via efetora de rejeição.

Entretanto, quando esta via encontra-se indisponível, o processo de rejeição pode ocorrer pelos linfócitos T auxiliares tipo 2, que secretam interleucinas 4, 5, 6 e 9, desencadeando rejeição mediada por eosinófilos(14;16;17) e, semelhante às células CD8, os linfócitos CD4 também podem induzir a célula alvo a apoptose pela via fas/fas'ligand”(14).

Em condições especiais, especula-se que o linfócito T auxiliar 17 (produtor de interleucina 17) seja capaz de induzir rejeições mediadas por neutrófilos(11), sendo esta mais uma via capaz de desencadear rejeição ao enxerto.

### **3.2 - Biópsia endomiocárdica:**

A biópsia transvascular foi introduzida por Sakakibara e Kono em 1962. Dez anos mais tarde, Philipe Caves, um cirurgião cardíaco Inglês do grupo de Stanford, desenvolveu um biótomo mais flexível, especialmente para o uso percutâneo no transplante cardíaco(43).

Ainda hoje a biópsia endomiocárdica é o padrão ouro(27;34;44-48) para o diagnóstico de rejeição aguda do enxerto. Ela possui alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de rejeição celular aguda. Não há até o momento método de imagem ou marcador sorológico capaz de substituí-la nos cuidados e manejo do receptor de transplante cardíaco(33;44). Apesar de ser um procedimento invasivo que causa desconforto ao paciente, a biópsia endomiocárdica é segura, apresentando um risco de 1% a 2% de complicações, e 0,02% de morte respectivamente(43;49).

As principais indicações da biópsia endomiocárdica no transplante cardíaco são: suspeita clínica de rejeição, avaliação da resposta imunossupressora e vigilância para detectar rejeição clinicamente silenciosa(45). A realização de biópsias endomiocárdicas rotineiras de vigilância traz como principal benefício prático a detecção precoce da rejeição, e a possibilidade de reduzir a quantidade de miocárdio com dano permanente com o tratamento imunossupressor adequado(50), preservando assim o enxerto cardíaco. Este é o principal motivo que leva a maioria dos centros transplantadores a realizarem biópsias periódicas em seus receptores(27;44).

Com a popularização do uso da biópsia endomiocárdica no transplante cardíaco para o diagnóstico de rejeição do enxerto, surgiram ao redor do mundo inúmeras nomenclaturas de rejeição aguda, sendo as mais importantes: Stanford, Texas, Hannover, Brigham, Boston Consortium e Pittsburg. Porém, esta diversidade de formas

para classificar a rejeição aguda impossibilitava a comparação dos resultados(7) e o progresso da ciência da transplantação.

Com a primeira nomenclatura padronizada, fruto do Encontro Internacional de Patologistas de centros com grande experiência em transplante cardíaco realizado em Stanford em agosto de 1990(8), tornou-se possível a comparação de resultados entre centros transplantadores. Esta nomenclatura foi amplamente adotada, e serviu bem a comunidade transplantadora por mais de uma década(9), permitindo o progresso nesta área do conhecimento médico.

Entretanto, durante a década de noventa, e mesmo após a virada do século, vários autores apontaram para o fato que esta classificação padronizada de rejeição permitia interpretação variada em diversos cenários histológicos (33;47;51;51), incluindo confusão entre graus de rejeição leve (1A, 1B e 2) com rejeições moderadas (3A) e graves (3B), ou ainda entre lesões isquêmicas com rejeição leve (2) ou moderada (3A) (9), o que poderia acarretar em desfechos clínicos inadequados.

Tendo em vista os avanços do conhecimento da rejeição aguda e as novas opções terapêuticas para o seu tratamento, associado à variabilidade do sistema anterior, em novembro de 2005 foi publicada a revisão da nomenclatura padronizada de 1990 no diagnóstico da rejeição cardíaca (9). Esta nova normatização levou em conta que rejeições leves (graus 1 e 2) progrediam para rejeições graves em apenas 15% a 20% das biópsias subsequentes, agrupando assim os antigos graus 1A, 1B e 2 no grau revisado 1R, devido ao seu comportamento clínico semelhante. Da mesma forma, os antigos graus 3B e 4, que correspondiam a formas graves de rejeição, sendo sempre tratados com rigorosa imunossupressão, foram reunidos no grau 3R, e por último, o

grau 3A da nomenclatura de 1990 foi transformado em 2R, por tratar-se de rejeição moderada. A tabela 1 compara as nomenclaturas de 1990 e 2005.

Tabela 6- comparação entre nomenclaturas padronizadas de rejeição cardíaca de 1990 e 2005.

CLASSIFICAÇÃO DE 1990	CLASSIFICAÇÃO DE 2005	Definição
0	0R	Sem evidências de inflamação mononuclear ou dano aos miocitos
1A, 1B, 2	1R	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Células mononucleares perivasculares ou intersticiais, respeitando as bordas dos miocitos e não distorcendo a arquitetura normal das fibras.</li> <li>2. Um foco de infiltrado mononuclear associado a dano aos miocitos</li> </ol>
3A	2R	Dois ou mais focos de infiltrados inflamatórios acompanhados de danos células musculares cardíacas, eosinófilos podem estar presentes sendo que estes focos podem estar distribuídos em um ou mais fragmentos de biópsias.
3B ou 4	3R	Processo inflamatório difuso, envolvendo a maioria dos fragmentos, sendo predominantemente composto por linfócitos, macrófagos ou PMN. Nas formas mais graves encontramos: edema intersticial, hemorragia e vasculites.

Para a correta interpretação da biópsia endomiocárdica, é necessário respeitar algumas considerações técnicas com a intenção de minimizar a chance de obter resultados falsos negativos, e para o correto diagnóstico diferencial entre rejeição aguda e outros achados, tais como efeito Quilty ou lesões isquêmicas.

Devido ao potencial de erro de amostragem no diagnóstico de rejeição aguda, é necessário colher entre cinco e sete amostras da região septal do ventrículo direito, preferencialmente de regiões diferentes do septo. Estas amostras devem ser manuseadas com cuidado e fixadas rapidamente com formol a 10% em temperatura ambiente(9;27) e embebidas em parafina. Posteriormente, estes fragmentos são seccionados em tiras de quatro micra de espessura(43), realizando cortes histológicos seqüenciais ao menos em três níveis e corados com hematoxilina e eosina. É recomendável que cortes intermediários fiquem reservados para colorações específicas (como o tricromo de Masson) ou imuno- histoquímica (27).

Para a análise e interpretação adequada da biópsia endomiocárdica, necessitamos que em pelo menos três (preferencialmente quatro ou mais) fragmentos válidos sejam constituídos de 50% ou mais de tecido miocárdico sem cicatrizes de biópsias antigas, tecido adiposo ou trombos sanguíneos(9;27). As biópsias que apresentam três fragmentos válidos para sua análise possuem um risco de apresentar um resultado falso negativo de cinco por cento. Este risco diminui para três por cento quando temos quatro fragmentos válidos (23), e para dois por cento com cinco ou mais fragmentos válidos (43).

Algumas lesões histológicas encontradas nas biópsias endomiocárdicas encontradas em pacientes receptores de transplante cardíacos não são diretamente

relacionadas com rejeição cardíaca. Entre elas encontramos: as lesões isquêmicas, efeito Quilty, infecções, neoplasia linfóide e local de biópsia prévia.

Lesões isquêmicas caracterizam-se pela presença de micro infartos em diferentes estágios evolutivos e distinguem-se das rejeições agudas pela desproporção entre a intensidade das agressões às fibras musculares miocárdicas e a escassez de infiltrado inflamatório. É um achado comum até a sexta semana após a cirurgia, podendo correlacionar-se com disfunção precoce do enxerto. Após este período, pode estar associada à doença vascular do enxerto(27).

Infiltrados endocárdicos nodulares são conhecidos como efeito Quilty. Seu significado ainda hoje é incerto, podendo(52;53) ou não(9;27) relacionar-se com rejeição aguda. Na classificação de Billingham (8) foi proposta a diferenciação entre Quilty tipo A, sendo aquele contido no endocárdio, e tipo B, quando o infiltrado invadia o miocárdio. Porém, esta classificação não se mostrou clinicamente relevante, sendo abandonada em 2005(9).

Local de biópsia prévia caracteriza-se por tecido de granulação ou área fibrosa cicatricial, podendo ser encontrado no endocárdio e no miocárdio, que se forma depois de repetidas biópsias, e não deve ser confundido com rejeição aguda e não é considerado área avaliável da biópsia endomiocárdica.

É rara a detecção de agentes infecciosos na biópsia endomiocárdica. Os mais descritos são o citomegalovírus e o *Toxoplasma gondi*. No nosso meio, a distinção entre a reativação da doença de Chagas e rejeição aguda pode ser difícil, visto que a reativação da doença de Chagas pode causar infiltrado inflamatório intenso indistinguível de rejeição aguda, (54) e podendo ou não encontrar parasitas no material analisado.

Neoplasia linfóide: Não é comum que a doença linfoproliferativa pós-transplante acometa o coração, e seu aspecto pode confundir-se com rejeição aguda celular. O caráter monomórfico de seu infiltrado, associado ao perfil imunofenotípico (geralmente tipo B), permitem o diagnóstico(27).

### 3.3 Efeito Quilty

Descrito por Billingham em 1981, o infiltrado nodular endocárdico foi batizado de efeito Quilty com o nome do primeiro paciente em que esta lesão foi reconhecida(26;55;56). Esta lesão é composta predominantemente de linfócitos T, com poucos linfócitos B e ocasionalmente macrófagos. A incidência de pacientes que apresentam efeito Quilty varia entre 8% e 78,6% dos pacientes estudados, sendo mais comum em pacientes jovens e do sexo feminino(25).

Sua origem vem sendo debatida por muitos anos, sendo já propostos vários fatores etiológicos, tais como: toxicidade a ciclosporina, rejeição crônica, reação inflamatória reacional ao vírus Ebstein-Barr, rejeição limitada ao endocárdio (56), diminuição dos níveis de ciclosporina endocárdico (57) e plasmático(58).

Os relatos iniciais, datados dos anos 80, mostram que receptores que não recebiam ciclosporina apresentavam maior número de rejeições graves; por outro lado, não possuíam efeito Quilty em suas biópsias endomiocárdicas. Com o uso da ciclosporina houve uma diminuição das rejeições graves e, paradoxalmente, um aumento do efeito Quilty (59-62). Esta observação levou ao postulado inicial que os infiltrados nodulares intersticiais seriam induzidos pelo uso da ciclosporina, como efeito colateral do fármaco(63). Entretanto, essa hipótese foi desacreditada devido à demonstração por necropsia do não aparecimento desta lesão histológica em corações de pacientes em uso de ciclosporina, por motivo de transplante de outros órgãos, tais como rim ou fígado(64).

No início da década de 90 surgem relatos mostrando que o efeito Quilty correlaciona-se diretamente com o grau de rejeição, ou seja, quanto maior o grau de rejeição, maior a chance de aparecimento do infiltrado endocárdico nodular em

pacientes recebendo ciclosporina, e que ocorre o desaparecimento desta lesão com o aumento da imunossupressão, originando a hipótese que o efeito Quilty possa ser parte da rejeição aguda do enxerto(26;65).

Posteriormente, surgiram autores que correlacionavam a presença do efeito Quilty na biópsia endocárdica atual com um aumento de risco de rejeição na biópsia subsequente, sendo que a magnitude deste risco variou entre 1,63 e 9,80 conforme descrito em diferentes artigos (52;53;66), desta forma sugerindo que o efeito Quilty pudesse ser usado como fator preditor de rejeição aguda.

A baixa produção de interleucina 10, responsável pela supressão dos macrófagos e dos linfócitos T auxiliares, em pacientes formadores de efeito Quilty(67) e a maior incidência de apoptose em pacientes com a presença de efeito Quilty(56) corroboram para a hipótese de que os infiltrados nodulares endocárdicos sejam forma precoce, localizada ou abortada de rejeição aguda.

A relação entre efeito Quilty e doença vascular do enxerto proposta inicialmente em 2003(68), não foi confirmada posteriormente(55;69). Entretanto, recentemente, a presença de infiltrado nodular endocárdico foi associado à formação de lesões obstrutivas na microcirculação miocárdica e falência do coração transplantado(70).

A relação do efeito Quilty com rejeição aguda vem tornando-se mais clara ultimamente. Pacientes que apresentam efeito Quilty, apesar de não apresentarem anticorpos anti-HLA I e II(55) em taxas maiores que os pacientes sem esta lesão, exibem sinais de acionamento do sistema imune tais como: ativação do sistema complemento no endocárdio(24), aumento da apoptose celular e maior incidência de rejeição moderada ou grave na biópsia subsequente em comparação com pacientes que não apresentam esta lesão histológica (52;53;55;69). Estas evidências mostram que o

efeito Quilty é um fator de risco para eventos imunológicos agudos e crônicos e não apenas um expectador silencioso do processo de rejeição(71)

Quanto ao prognóstico, alguns autores relutantemente sugerem que pacientes que possuem efeito Quilty apresentam maior sobrevida(55;69), enquanto outros pesquisadores obtiveram resultados opostos em suas pesquisas, demonstrando pior sobrevida e maior chance de falência do enxerto em pacientes que apresentam infiltrado linfocitário endocárdico em suas biópsias no primeiro ano pós-transplante cardíaco(70;71).

### **3.4 Vasculites**

Vasculites consistem no processo inflamatório, acometendo um ou mais vasos, com extensão limitada em estruturas adjacentes, podendo ser acompanhada de hemorragias ou lesões isquêmicas na área de distribuição do vaso devido a dano vascular(72).

No início dos anos 80, demonstrou-se em ratos que o ambiente intravascular da microcirculação miocárdica é o primeiro alvo a ser agredido pelos efeitos da rejeição aguda, ocorrendo solução de continuidade nos vasos analisados e desintegração do endotélio nas rejeições mais intensas. Este modelo deixou claro que a agressão às fibras musculares ocorre após a lesão microvascular(42).

Posteriormente, em 1987, em um estudo que procurava padrões histológicos capazes de prever rejeição aguda em biópsias subsequentes, foi demonstrado que entre 17 parâmetros histológicos diferentes analisados em biópsias do miocárdio de receptores de transplante cardíaco, apenas as vasculites arteriolares conseguiriam prever rejeição aguda letal ou disfunção de ventrículo esquerdo no enxerto, em um intervalo que variou entre um e 88 dias entre a biópsia do miocárdio e a data do desfecho clínico (73).

Nesta mesma época, outros autores demonstraram que lesões vasculares eram significativamente correlacionadas com rejeição aguda, que a incidência de aparecimento de trombos brancos ou vermelhos era diretamente proporcional ao aumento da severidade da rejeição miocárdica(65), e que a presença de vasculites pressagia a necessidade de incremento da dose de imunossuppressores utilizada (74).

Estudo de necropsias feito em 33 pacientes, de uma população total de 99 pacientes transplantados entre novembro de 1981 e fevereiro de 1986, demonstra que 14

corações apresentaram sinais de rejeição aguda, e em todos foram encontradas vasculites em artérias de grande, moderado e pequeno calibre. Analisando os 19 corações remanescentes que não apresentavam rejeição aguda como causa da morte do receptor de transplante cardíaco, não se encontrou vasculite em nenhum caso. Analisando toda a população transplantada, 44% dos pacientes que apresentaram vasculites em suas biópsias faleceram ou necessitaram de novo transplante devido à rejeição aguda, com intervalo médio de 23 dias entre a biópsia e o evento clínico. Porém, dentre os pacientes sem vasculites que apresentaram um ou mais episódios de rejeição, a taxa de mortalidade ou retransplante foi de 22% (75).

Posteriormente, outros autores relataram sua experiência no manejo de pacientes que apresentaram vasculites em suas biópsias endomiocárdicas, relatando ser este um sinal histológico de mau prognóstico (76;77).

Nos meados dos anos 80, pouco se conhecia sobre os mecanismos que levavam a rejeição aguda. Elegante pesquisa sobre este tema realizado em ratos não tratados e pré-tratados com ciclosporina mostrou que no primeiro grupo houve grande infiltrado inflamatório, edema intersticial importante, assim como necrose de fibras miocárdicas. Nestes ratos houve aumento significativo da expressão de MHC tipo I e II nas células endocárdicas (sendo proporcionalmente maior a expressão do tipo I que do Tipo II) e MHC tipo I nas fibras miocárdicas. Entretanto, nos ratos que receberam pré-tratamento com ciclosporina, a rejeição desenvolveu-se lentamente e com menor intensidade, apresentando vasculites, o que não ocorreu no grupo sem tratamento. Neste grupo ocorreu aumento do MHC tipo II no leito vascular antes dos achados histológicos de rejeição, porém, durante a rejeição, a expressão de MHC tipo I e II apresentava-se aumentada em proporções semelhantes. Animais portadores de vasculites possuíam maior expressão de MHC tipo I e II em comparação com aqueles em que esta lesão

histológica não ocorreu. A regressão linear mostrou correlação entre a severidade das vasculites e a expressão de antígenos MHC Tipo II no endotélio das artérias(78).

A relação entre vasculites graves e rejeição mediada por anticorpos foi observada em xenotransplante concordante entre espécies de roedores. Neste modelo, o aparecimento e posterior aumento da intensidade das vasculites foram concordantes com a produção de anticorpos direcionados ao tecido do doador(79). Em homens, entretanto, foram encontradas vasculites em apenas 1/3 dos pacientes que apresentavam rejeição mediada por anticorpo (36).

Em doenças reumáticas, as síndromes vasculíticas abrangem um grupo heterogêneo de doenças raras em que exista inflamação de um vaso sanguíneo, podendo afetar virtualmente qualquer tipo de vaso em qualquer parte do corpo. Estas doenças podem ter evolução lenta, focal ou fulminante. As vasculites originam-se da deposição de imunocomplexos, anticorpos produzidos contra componentes celulares ou mesmo por imunidade mediada por células T(80-82). A isquemia dos tecidos afetados é determinante no prognóstico, podendo levar a disfunção do órgão afetado ou a lesão permanente deste (83).

O comprometimento cardíaco nas vasculites reumáticas piora dramaticamente o prognóstico, podendo a morte ser ocasionada por insuficiência cardíaca, arritmias ou infarto agudo do miocárdio(81).

A associação entre vasculites de artérias ou arteríolas intramiocárdicas e lesões isquêmicas segmentares do miocárdio tais como: formação de trombos intravasculares, vacuolização de fibras, bandas de contração e necrose miocárdica, em receptores de transplante cardíaco foi descrita no início da década de 90 (84). Posteriormente em nosso meio, este achado foi confirmado, e, apesar de não relacionado com a intensidade

da rejeição celular encontrada no tecido miocárdico, as vasculites em vasos intramiocárdicos foram associadas com a inflamação das porções distais das artérias coronárias e pequenos focos de infarto do miocárdio(85).

Achados semelhantes são descritos em transplante renal, onde a presença de arterites correlacionou-se com rejeição resistente a corticóide, e a presença de artérias apresentando inflamação e necrose fibrinóide, demonstradas nas biópsias renais, foi associada à perda do enxerto(29;86).

No decorrer da última década, foi demonstrado que o endotélio desempenha funções importantes durante a rejeição aguda, tais como o recrutamento de células imunes para dentro do enxerto, aumento das moléculas de adesão na superfície das células endoteliais levando as células recrutadas ao interstício, produzir e liberar citocinas capazes de ativar células T e recrutar outras células inflamatórias(87).

As células endoteliais são particularmente sensível à imunidade celular e a mediadores solúveis de injúria imunológica (28), sua ativação durante episódios de rejeição aguda podem gerar micropartículas pró-coagulantes, capazes de levar a inflamação endotelial e em última instância a trombose do vaso(88).

### **3.4 - Lesões isquêmicas miocárdicas e micro infartos em transplante cardíaco.**

#### **3.4.1 - Lesões isquêmicas precoces**

A avaliação de biópsias do miocárdio obtidas nas primeiras semanas após o transplante cardíaco, tem mostrado áreas subendocárdicas de insulto isquêmico demonstrado pela presença de bandas de contração(9), focos de miocitólise e necrose de coagulação. Quando presentes, estes achados persistem por várias semanas(87).

Estas lesões são provenientes e diretamente proporcionais ao período de isquemia sofrido entre a captação do órgão(30) e o transplante, podendo ser exacerbadas devido à hipotensão prolongada sofrida pelo órgão durante a cirurgia e o período pós-operatório (decorrentes de disfunção do enxerto ou sangramento excessivo)(9), ou aos efeitos da tempestade de catecolaminas após a morte encefálica (89;90) ou ainda pelo uso prolongado e em altas doses de inotrópicos no pós operatório(9).

Estudo pioneiro datado da metade da década de 90 demonstrou que as lesões isquêmicas miocárdicas peri-operatórias ocorreram em 89% do pacientes submetidos a transplante cardíacos, sendo comumente observadas nas duas primeiras semanas após a cirurgia. Sua presença ou intensidade não se correlacionou com a sobrevida ou quantidade de rejeição moderadas ou graves ocorridas no primeiro ano após o transplante cardíaco. Entretanto, a falência primária do enxerto foi mais comum no grupo que apresentava lesões isquêmicas intensas(30).

No início desta década foi proposto a associação entre fibrose decorrente de isquemia peritransplante , e o aumento da incidência de doença vascular do enxerto diagnosticada por ultrassom intravascular e por cateterismo cardíaco. Estas lesões foram também correlacionadas com diminuição da sobrevida do receptor em longo prazo,

sendo a formação da vasculopatia independente dos episódios de rejeição celular ou outros fatores relacionados com a imunidade(91).

Como seqüela das lesões isquêmicas sofridas durante a captação do órgão e a realização do transplante cardíaco, o conteúdo médio de colágeno em corações transplantados é em torno de duas vezes maior que o encontrado em corações normais, sendo que este conteúdo aumenta proporcionalmente com o aumento do tempo de isquemia sofrido pelo órgão entre a captação no doador até seu implante no receptor (92).

### **3.4.2 - Lesões isquêmicas tardias**

Após as primeiras seis semanas do transplante, o aparecimento de lesões isquêmicas pode estar associado à geração de trombos decorrente da inflamação do leito arterial intramiocárdico (tal como ocorre nas vasculites reumáticas que afetam o coração)(83). Estas lesões são decorrentes às alterações do endotélio que podem levar a estados hipercoagulantes, tais como: presença de rejeição aguda (88), doença vascular do enxerto(93) uso de corticosteróides(94), em decorrência a rejeição mediada por anticorpos(95-97) e em decorrência a doença vascular do enxerto(27).

Alguns grupos consideram as alterações isquêmicas do miocárdio encontradas nas biópsias, tais como: vacuolização dos miocitos subendocárdicos, sinal de isquemia subletal e necrose de coagulação aguda, ou em cicatrização, como os sinais morfológicos mais importantes indicativos de isquemia do miocárdio decorrente da doença vascular do enxerto(98).

### **3.5 - Eosinófilos e rejeição aguda.**

A função potencial dos eosinófilos na rejeição aguda foi indicada pela primeira vez em 1985, com a observação que eosinofilia em sangue periférico precedia rejeições de transplantes renais e hepáticos (99).

Hoje sabemos que os eosinófilos participam de uma via alternativa da rejeição do enxerto, sendo que estes se encontram inibidos na presença das células T citotóxicas; porém, entram em ação quando estas células estão indisponíveis. A função dos eosinófilos como via efetora secundária de rejeição foi cuidadosamente demonstrada em animais. Entretanto, existe pouco conhecimento deste processo no homem. Da mesma forma que ocorre nos transplantes renais e hepáticos, também no transplante cardíaco os episódios de rejeição são precedidos de eosinofilia periférica, e está correlacionada diretamente com os níveis séricos de eotaxina, quimiocina capaz de atrair eosinófilos sendo inversamente proporcional a dose de prednisona (15).

Na ausência de linfócitos T citotóxicos, as células T auxiliaadoras do tipo dois são capazes de secretar interleucina cinco, que possui ação central na rejeição mediada por eosinófilos, sendo capaz de desencadeá-la (16). Esta interleucina diferencia a célula pluripotente em eosinófilo, em seguida o amadurece, e posteriormente o ativa iniciando a rejeição aguda(14;16).

As interleucinas 4, 5 e 13 estimulam a expressão no endotélio vascular da molécula de adesão VCAM- 1 que extravasa os eosinófilos ativados do meio intravascular para o interstício dos tecidos rejeitados, além de induzirem a produção de eotaxina, em uma série de grupos celulares diferentes(17). A interleucina 9 potencializa os efeitos de outras interleucinas, principalmente da interleucina cinco (14;17).

A presença de eosinófilos integrando o infiltrado inflamatório intersticial em biópsia endomiocárdica associa-se com rejeições de maior gravidade e mau prognóstico em receptores de transplante cardíaco (8;9;50;100). Entretanto em 1990, em uma série de casos foram observados eosinófilos encontrados em rejeições leves e moderadas. Achado inédito na época, os autores sugeriram que este sinal patológico poderia ser utilizado como um marcador precoce de necrose miocárdica futura decorrente à rejeição celular aguda (22). Entretanto, esta linha de pesquisa não proliferou. Ainda hoje não está claro o significado clínico da presença de eosinófilos em rejeições leves.

## **4- Método:**

### **4.1 - População estudada**

No instituto Dante Pazzanese entre 10 de Janeiro de 2002 a 10 de janeiro de 2009, 144 pacientes foram submetidos ao transplante cardíaco. Destes, analisamos todos os 109 pacientes que realizaram duas ou mais biópsias do miocárdio após o transplante. Esta amostra corresponde a 45% de todos os pacientes transplantados desde o início do programa de transplante cardíaco (novembro de 1991) até o encerramento do estudo, e 76% dos pacientes transplantados no período da pesquisa.

Do total de pacientes transplantados foram excluídos 36 pacientes desta pesquisa, todos por terem realizado menos de duas biópsias endomiocárdicas. Destes, 31 (86%) faleceram antes da primeira biópsia do miocárdio, três realizaram apenas uma biópsia (8%) e dois pacientes por monitorarem a rejeição por métodos não invasivos (6%).

Na amostra populacional analisada, 87 (80%) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 22 (20%) dos pacientes ao feminino. O mais jovem deste grupo apresentava 11 anos e o mais velho 69 anos na época do transplante. Em média, a idade dos receptores foi de  $46 \pm 13$  anos na data da cirurgia. Quanto à cor da pele 73% se denominavam brancos, 16% mulatos e 11% negros.

A doença cardíaca prévia ao transplante mais comum nesta amostra populacional foi: a cardiomiopatia dilatada idiopática presente em 35% dos pacientes, seguida da cardiomiopatia secundária a doença isquêmica do miocárdio com 33%, doença de Chagas 22%, cardiopatia secundária a valvulopatias com 7% e outras etiologias foram encontradas em 3% dos pacientes respectivamente.

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

A imunossupressão foi realizada inicialmente com metilprednisolona 20mg/kg, via endovenosa, dividida em duas doses: a primeira cerca de 30 minutos antes da indução anestésica, e a segunda ao chegar à unidade de terapia intensiva. A partir do primeiro pós-operatório, a dose deste fármaco foi reduzida para 10 mg/kg em dose única, e mantida desta forma até o sétimo dia pós-operatório, quando se iniciou redução gradual da metilprednisolona em 100mg por dia e após a substituição deste corticóide endovenoso por Prednisona 1mg/kg administrado por via oral, sendo que esta dose foi progressivamente reduzida até a dose da alta hospitalar de 0,4mg/kg.

No primeiro dia pós-operatório foi introduzido o micofenolato de mofetil em doses entre um e dois gramas ao dia por via oral, e esta dose foi mantida até a alta hospitalar. A ciclosporina foi iniciada entre o terceiro e quarto dia pós-operatório em pacientes com creatinina plasmática  $\leq$  a 1,5 mg/dl, inicialmente na dose de 1 mg/kg, aumentando progressivamente de acordo com a tolerância e a função renal do paciente, até atingir a dose alvo de 4mg/kg. Nos pacientes que não toleraram a introdução de Ciclosporina ou com insuficiência renal crônica agudizada, utilizamos sirolimus na dose de 2 mg em substituição à Ciclosporina por duas semanas, sendo posteriormente tentada a reintrodução do inibidor de calcineurina.

Alterações na imunossupressão posteriores a alta hospitalar foram permitidas de acordo com a necessidade clínica e em benefício do paciente. Comumente iniciou-se a redução da dose de corticóide entre o segundo e o sexto mês após a cirurgia, porém a maioria dos pacientes ainda recebia prednisona no final do primeiro ano após o transplante.

A ciclosporina foi substituída por tacrolimus nos pacientes que apresentaram mais de uma rejeição moderada ou severa. Os inibidores de calcineurina foram substituídos por sirolimus em pacientes com insuficiência renal crônica não dialítica após transplante, quando os níveis de creatinina mantiveram-se superior a dois mg/dl, apesar da adequação dos outros fármacos não imunossupressores.

O esquema de imunossupressão inicial foi Ciclosporina, micofenolato de mofetil e prednisona em 96 (88%) dos pacientes, e sirolimus, micofenolato mofetil e prednisona em 12 (11%) dos pacientes, e em 1 (1%) paciente a imunossupressão inicial foi composta por tacrolimus, micofenolato mofetil e prednisona. Nenhum paciente desta amostra usou Azatioprina.

O período de inclusão de pacientes no estudo foi de 10 de janeiro de 2002 a 10 de Janeiro de 2009, as biópsias realizadas até 28 de Fevereiro de 2009 foram consideradas válidas para a pesquisa, e o acompanhamento clínico dos pacientes ocorreu até 15 de Maio de 2009, cerca de seis meses depois da inclusão do último paciente.

#### **4.2 - Biópsias endomiocárdicas:**

As biópsias endomiocárdicas foram agendadas e realizadas de acordo com protocolo para pesquisa de vigilância de rejeição silenciosa ou quando havia suspeita clínica desta complicação. A frequência deste exame foi semanal durante o primeiro mês, quinzenal nos segundo e terceiro meses e mensal no quarto, quinto e sexto meses após o transplante, respectivamente. Nova biópsia então foi realizada no aniversário de primeiro ano de transplante e após anualmente.

As biópsias endomiocárdicas foram realizadas em centro cirúrgico, onde, após antisepsia e posicionamento dos campos estéreis, realizou-se anestesia local com Lidocaína 2% sem vasoconstritor, punção venosa central (preferencialmente veia jugular interna direita) e passagem de introdutor vascular. Com o auxílio da fluoroscopia introduzimos o biótomo de Stanford - Caves pelo introdutor vascular e, após a passagem pela valva tricúspide, obtivemos a amostra do septo interventricular do ventrículo direito. Em cada exame foram colhidas de quatro a seis amostras de miocárdio e, antes da retirada do introdutor vascular, foi administrada Cefazolina na dose de 1grama por via endovenosa.

Terminadas as biópsias, os pacientes repousaram por intervalo mínimo de duas horas em hospital-dia, e, após avaliação clínica, foram liberados para retornar ao seu domicílio.

Todos os fragmentos colhidos foram fixados com Formol a 10% logo após o término do procedimento cirúrgico e posteriormente embebido em parafina formando blocos, que depois de secos foram divididos em três planos: superficial, intermediário e profundo. Com o auxílio do micrótomo obtivemos de cada bloco de 20 a 40 fatias de

três micrômetros de espessura, que após montadas em lâmina de vidro foram coradas com hematoxilina - eosina para os três planos e tricrômico de Masson apenas para o nível intermediário.

Todas as lâminas geradas das biópsias do miocárdio foram analisadas em microscópio óptico da marca Weiss<sup>®</sup>, inicialmente por patologistas especializadas em transplante cardíaco como rotina do programa de transplante cardíaco do instituto Dante Pazzanese de cardiologia.

Entre Janeiro de 2007 e Setembro de 2009, foram revisadas todas as biópsias endomiocárdicas dos receptores de transplante cardíaco incluídos no estudo, sendo que no momento da análise, o revisor desconhecia a identidade do paciente do qual foram colhidos os fragmentos miocárdicos reanalisados.

Na reavaliação das biópsias foram examinados seqüencialmente: endocárdio, miocárdio, interstício e por último os vasos contidos na amostra, com o objetivo de encontrarmos: efeito Quilty, lesões das fibras miocárdicas de origem inflamatória ou isquêmica, eosinófilos e vasculites, respectivamente. Nas observações de lesões endocárdicas e miocárdicas, utilizamos aumento de até 200x no microscópio óptico. Já para análise de lesões de vasos e para a pesquisa de eosinófilos no infiltrado inflamatório intersticial, utilizamos ampliações de até 400x.

Investigamos em cada biópsia a presença ou ausência do efeito Quilty, lesões isquêmicas e eosinófilos no interstício miocárdico, bastando à presença destas lesões em apenas uma das quatro lâminas da biópsia para este exame ser considerado como positivo.

Quanto às vasculites, para mensurar a freqüência destas lesões em cada exame revisado, analisamos todas as três lâminas coradas com hematoxilina– eosina de cada

biópsia. Em seguida, elegemos a coluna de fatias de fragmentos miocárdicos de cada lâmina que possuía lesões mais representativas. Procedemos então à contagem dos vasos acometidos pelo processo inflamatório encontradas em cada plano e posteriormente à somatória dessas lesões vasculares em todas as lâminas analisadas. Este valor foi dividido pelo número de planos analisados, obtendo a média aritmética dos vasculites por lâminas analisadas. A seguir, dividimos este resultado pelo número de fragmentos miocárdicos colhidos na biópsia; obtivemos assim, o número médio de vasos acometidos por processo inflamatório por fragmento analisado.

Optamos por analisar a frequência das vasculites através de suas médias aritméticas devido à constatação de que as vasculites não ocorreram simultaneamente em todos os planos avaliados de uma mesma biópsia, e a grande variabilidade do número de fragmentos miocárdicos analisados neste exame.

Classificamos as vasculites de acordo com as características apresentadas pelo infiltrado inflamatório encontrado na parede dos vasos afetados, da seguinte forma:

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

As características acima descritas podem ser vistas no diagrama da figura 1 e nas microfotografias de 2 a 8.

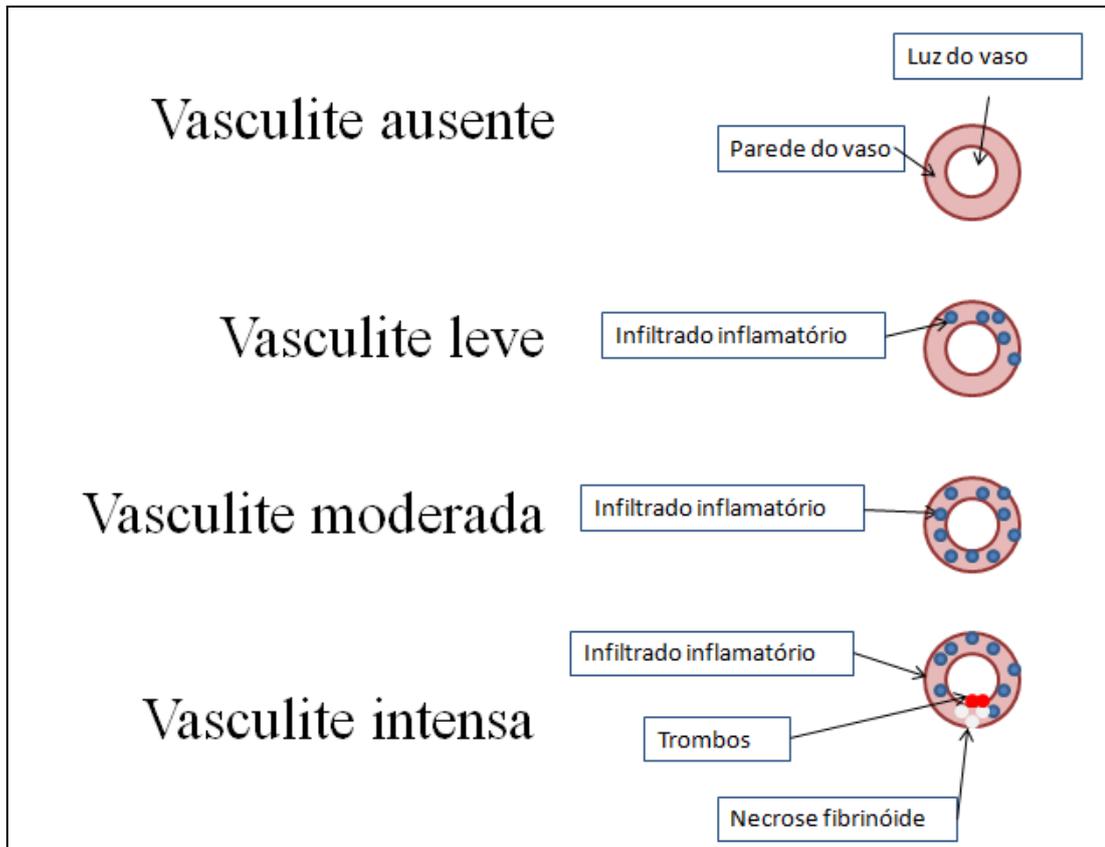


Figura 6 - diagrama esquemático mostrando a classificação das vasculites quanto à sua intensidade

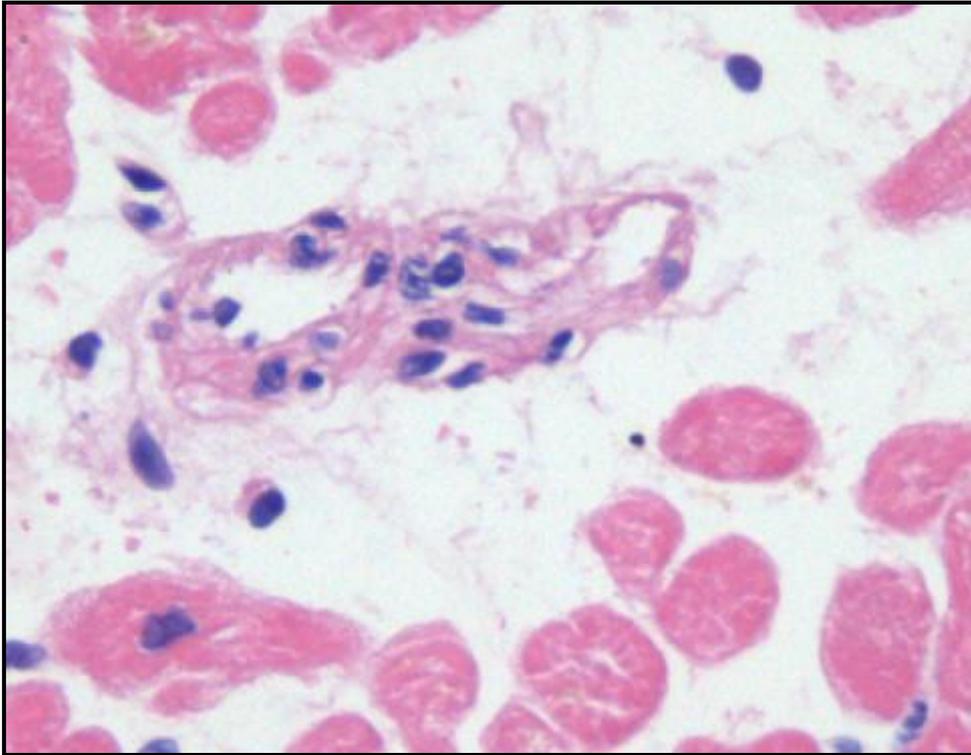


Figura 7 - microfotografia mostrando pequena artéria com infiltrado linfocitário em suas paredes caracterizando vasculite leve, coloração hematoxilina eosina, aumento 200x

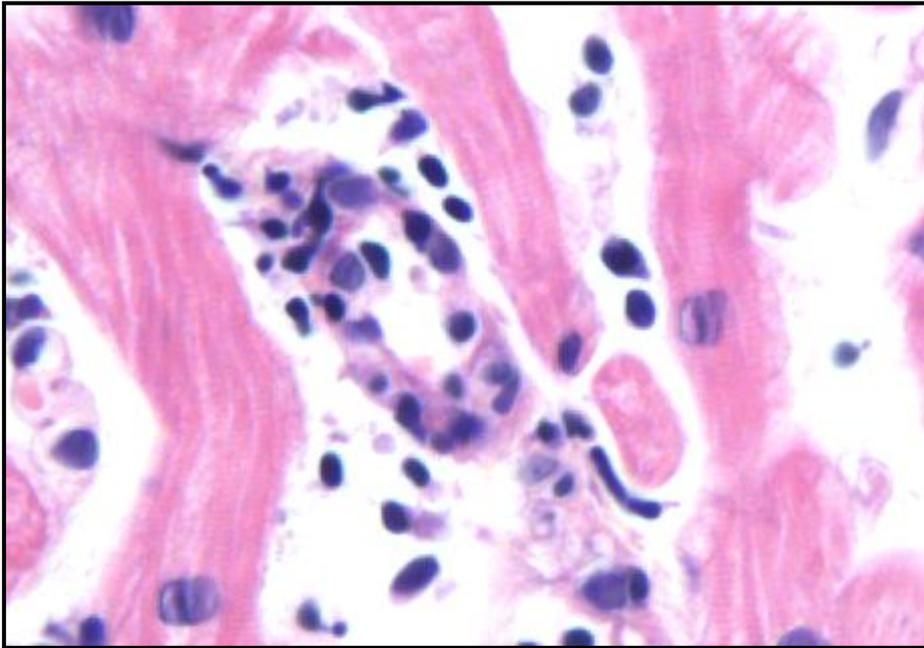


Figura 8-microfotografia mostrando infiltrado inflamatório acometendo parte da parede de pequena artéria intramiocárdica, coloração hematoxilina eosina, aumento 200x

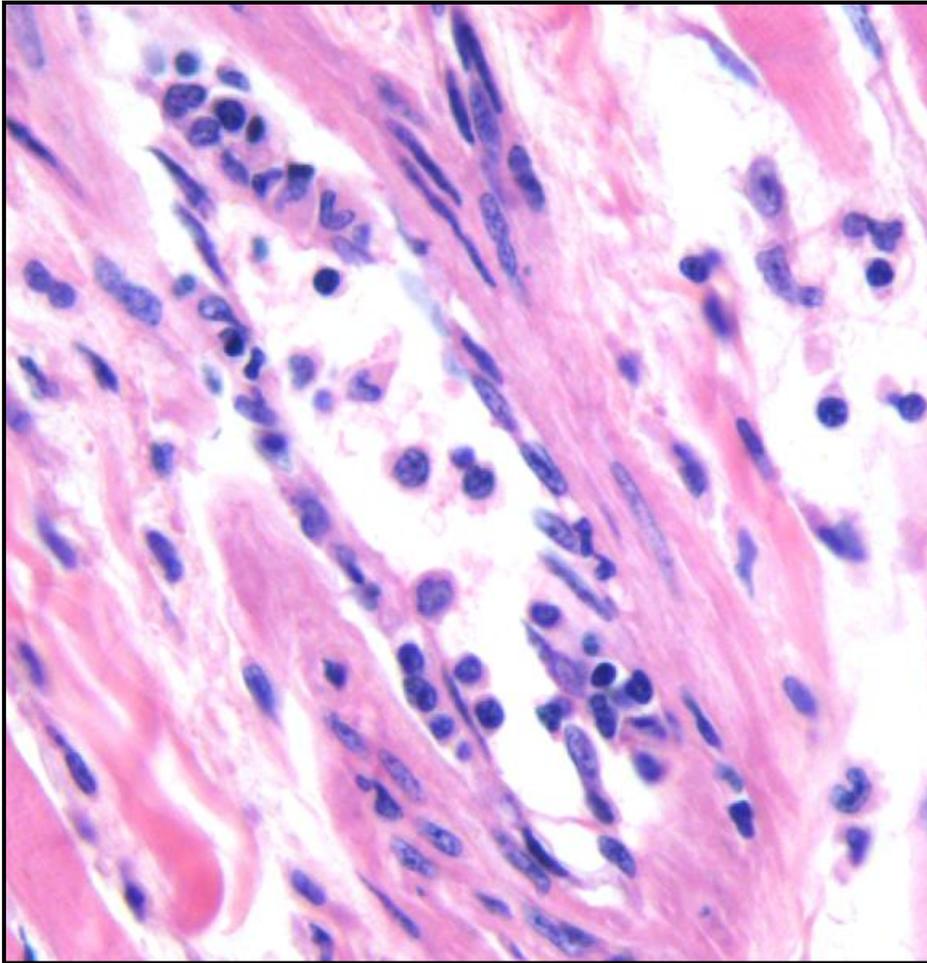


Figura 9 microfotografia mostrando infiltrado inflamatório acometendo parte da parede de uma vênula caracterizando vasculite leve, coloração hematoxilina eosina aumento 200x

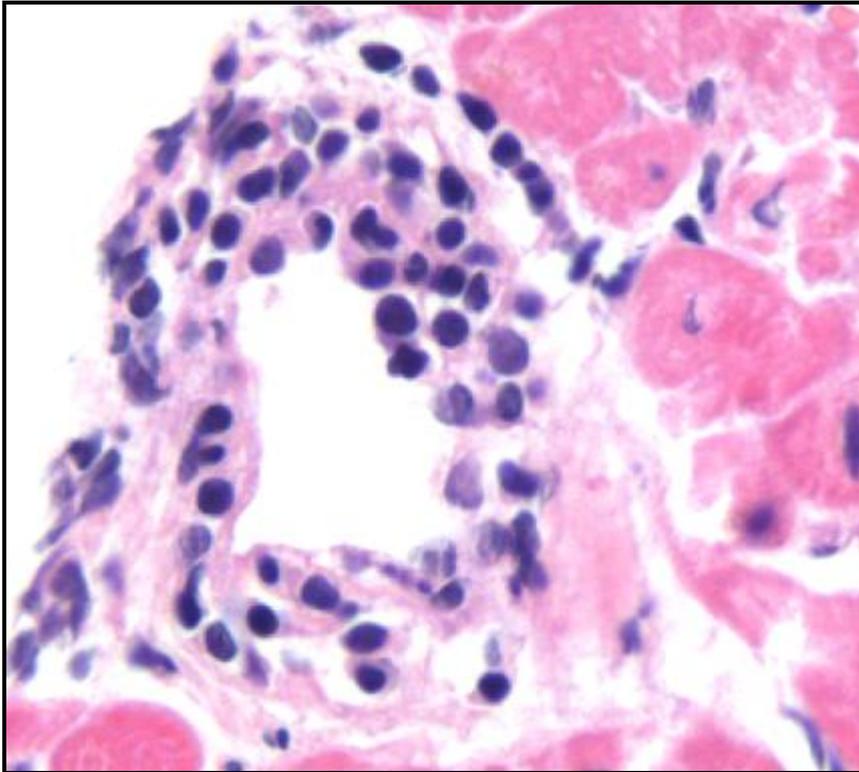


Figura 10- microfotografia mostrando infiltrado inflamatório acometendo todo o perímetro da parede de pequena artéria intramiocárdica caracterizando vasculite moderada

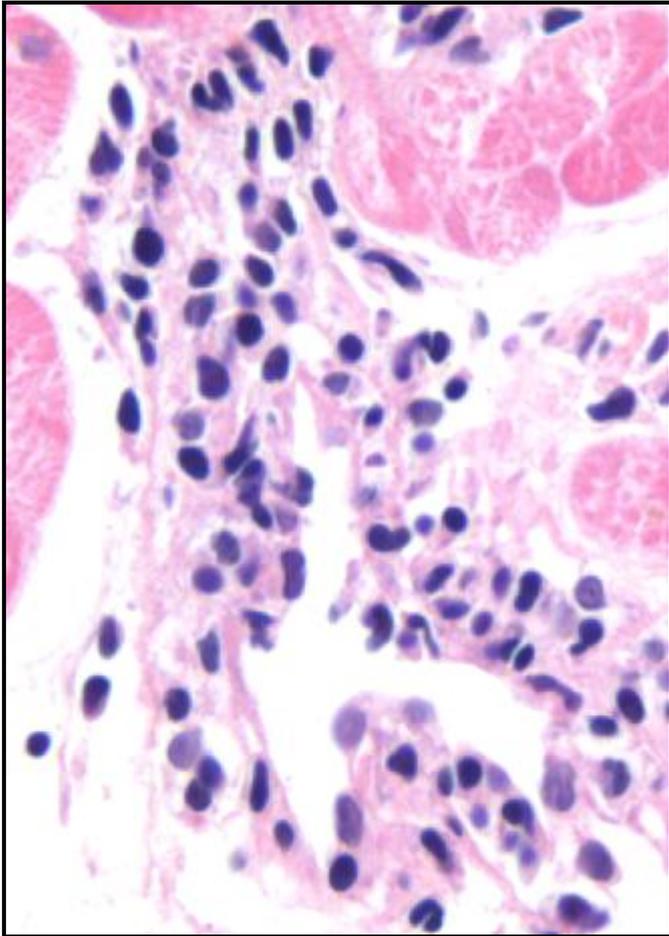


Figura 11- microfotografia mostrando vênula intramiocárdica com todas as paredes do vaso infiltrado por linfócitos sendo caracterizado como vasculite moderada , coloração hematoxilina eosina, aumento 200x

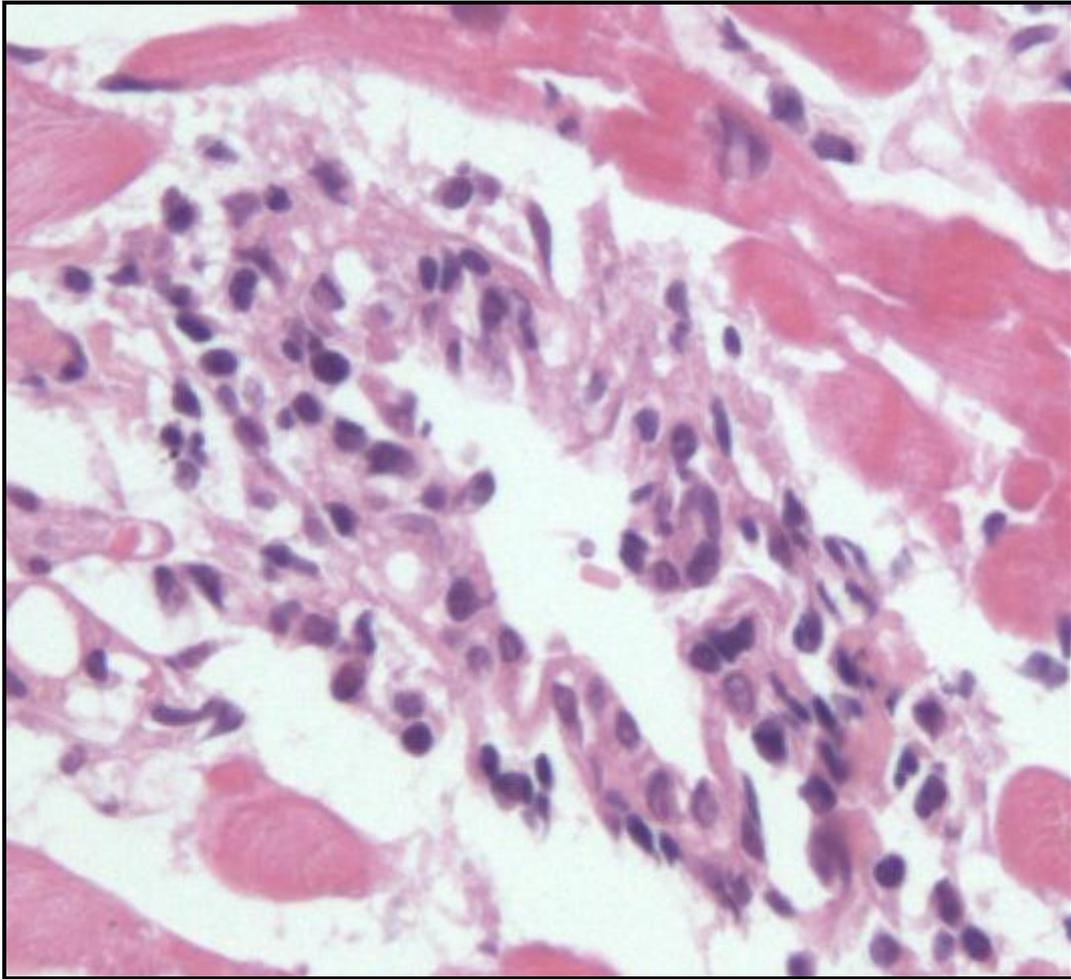


Figura 7- microfotografia demonstrando vênula com infiltrado inflamatório difuso e lesões focais nas paredes do vaso caracterizando vasculite grave

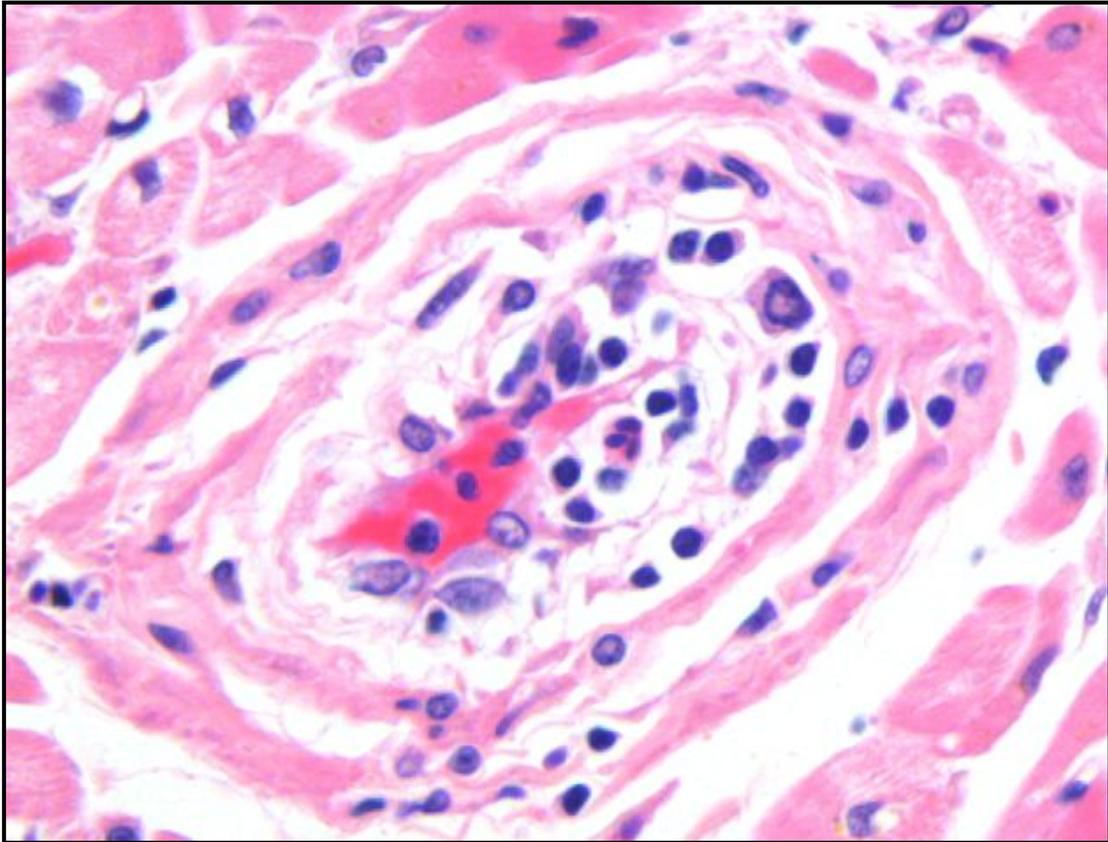


Figura 8 - microfotografia mostrando pequena artéria intramiocárdica acometida por infiltrado inflamatório e paredes do vaso delaminadas, coloração hematoxilina – eosina aumento de 200x

Após o término da coleta de dados, comparamos os diagnósticos fornecidos pelo serviço de anatomia patológica do instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e aqueles obtidos na revisão das biópsias, e encontramos discordância em 7% dos exames. Optamos nestes casos utilizar para a pesquisa os dados inicialmente fornecidos pelas patologistas de nossa instituição, desprezando os dados obtidos na da revisão das biópsias.

### **4.3 - Acompanhamento clínico:**

Os pacientes compareceram em visitas médicas periódicas e previamente agendadas em intervalos de quinze dias, no primeiro mês após a alta hospitalar, mensais, até o final do primeiro ano e bimestrais do início do segundo ano até final do acompanhamento ou o falecimento do paciente.

Todas as internações necessárias foram realizadas em nossa instituição, exceto em três oportunidades: dois pacientes apresentaram abdome agudo e foram operados na cidade em que moravam, e uma paciente que apresentou necrose asséptica da cabeça do fêmur, sendo submetida à artroplastia de quadril na rede pública da cidade de São Paulo.

Com informações obtidas nas consultas ambulatoriais e internações hospitalares, construiu-se um banco de dados detalhado com a evolução clínica de cada receptor de transplante cardíaco da data de seu transplante até seu falecimento ou 15 de Maio de 2009, data do encerramento do acompanhamento clínico desta pesquisa.

Consideramos as seguintes situações clínicas como desfecho da pesquisa:

1. Rejeição aguda: diagnosticada através de biópsia endomiocárdica moderada (2R) ou grave (3R), segundo a nomenclatura da Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão(9), ou evento clínico que induziu aumento agudo e imediato da imunossupressão que usualmente, mas nem sempre, foi acompanhado de resultado anormal da biópsia endomiocárdica(20).
2. Rejeição aguda acompanhada de grave comprometimento hemodinâmico, sendo este caracterizado como queda da fração de ejeção subitamente abaixo de 45% durante episódio de rejeição, ou a necessidade de suporte inotrópico(45), ou

ainda redução relativa de 25% da fração de ejeção no ecocardiograma atual em relação ao maior valor de fração de ejeção obtido entre os ecocardiogramas realizados até o trigésimo dia pós-operatório.

3. Morte em decorrência de rejeição celular ou mediada por anticorpos com comprovação através de exames anatomopatológicos (necropsia ou biópsia endomiocárdica).

Não consideramos como desfechos clínicos as seguintes condições:

1. Diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, insuficiência cardíaca ou mortes decorrentes da doença vascular do enxerto.
2. Miocardites causadas por agentes infecciosos, tais como: reativação da doença de Chagas e inflamação miocárdica devida à ação do Citomegalovírus.
3. Morte causada por doenças infecciosas, mesmo que decorrentes do aumento da terapia imunossupressora.
4. Morte não relacionada à rejeição aguda, como por exemplo, acidente vascular cerebral, mortes acidentais ou neoplasias.

#### **4.4- Desenhos dos estudos:**

Entre 10 de Janeiro de 2002 e 28 de Fevereiro de 2009, foram realizadas no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia 1012 biópsias endomiocárdicas. Deste total, 31 (3,06 %) biópsias foram excluídas: nove por apresentarem sinais de reativação da doença de Chagas e 22 por apresentarem menos que quatro fragmentos válidos para a análise. Das 981 biópsias restantes, separamos 28 (2,77%) por apresentarem o desfecho clínico estudado: rejeição 2R ou 3R. Tornaram-se então elegíveis para o estudo 953 biópsias endomiocárdicas, que foram divididas em dois grupos que apresentaram diferentes composições conforme o desfecho clínico estudado.

##### **4.4.1- Desenho do estudo para analisar o desfecho clínico rejeições agudas:**

Grupo preditor: formado por 52 biópsias, sendo 28 biópsias que antecederam episódios de rejeições agudas demonstradas por microscopia óptica somadas a 24 biópsias que antecederam pulsoterapia com imunossupressores devido a evidências clínicas e ecocardiográficas de rejeição aguda.

Grupo não preditor: formado por 901 biópsias endomiocárdicas que não antecederam episódios de rejeição aguda.

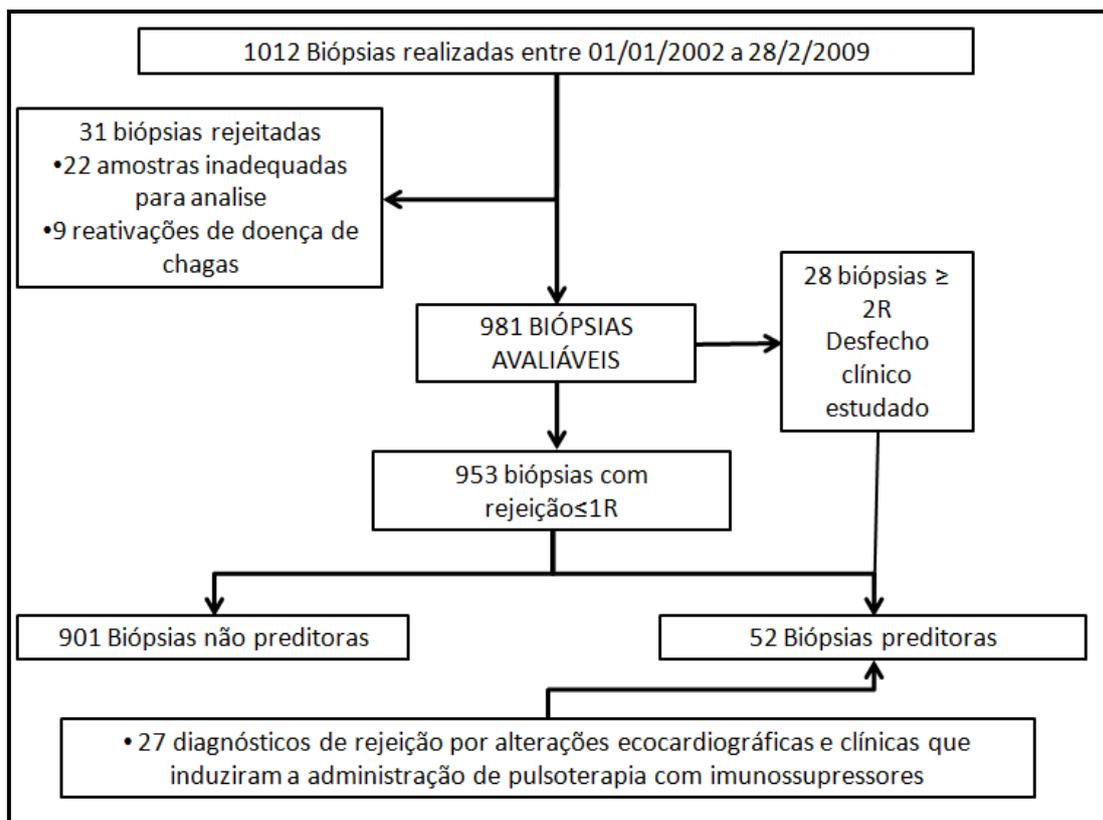


Figura 10 - desenho do estudo para avaliar o desfecho rejeição aguda.

#### 4.4.2 - Desenho do estudo para avaliar o desfecho rejeição aguda do enxerto associada à grave comprometimento hemodinâmico.

Grupo preditor: composto por 27 biópsias. Destas três exames precederam biópsias com rejeição celular moderada ou grave acompanhada de choque cardiogênico e necessidade do uso de drogas vasoativas e alterações ecocardiográficas. As 24 biópsias restantes precederam queda da fração de ejeção ao ecocardiograma, sendo acompanhadas de uma ou mais das seguintes condições: insuficiência cardíaca, choque cardiogênico ou necessidade do uso de drogas vasoativas.

Grupo não preditor: composto por 926 biópsias que não foram sucedidas por rejeição com comprometimento hemodinâmico.

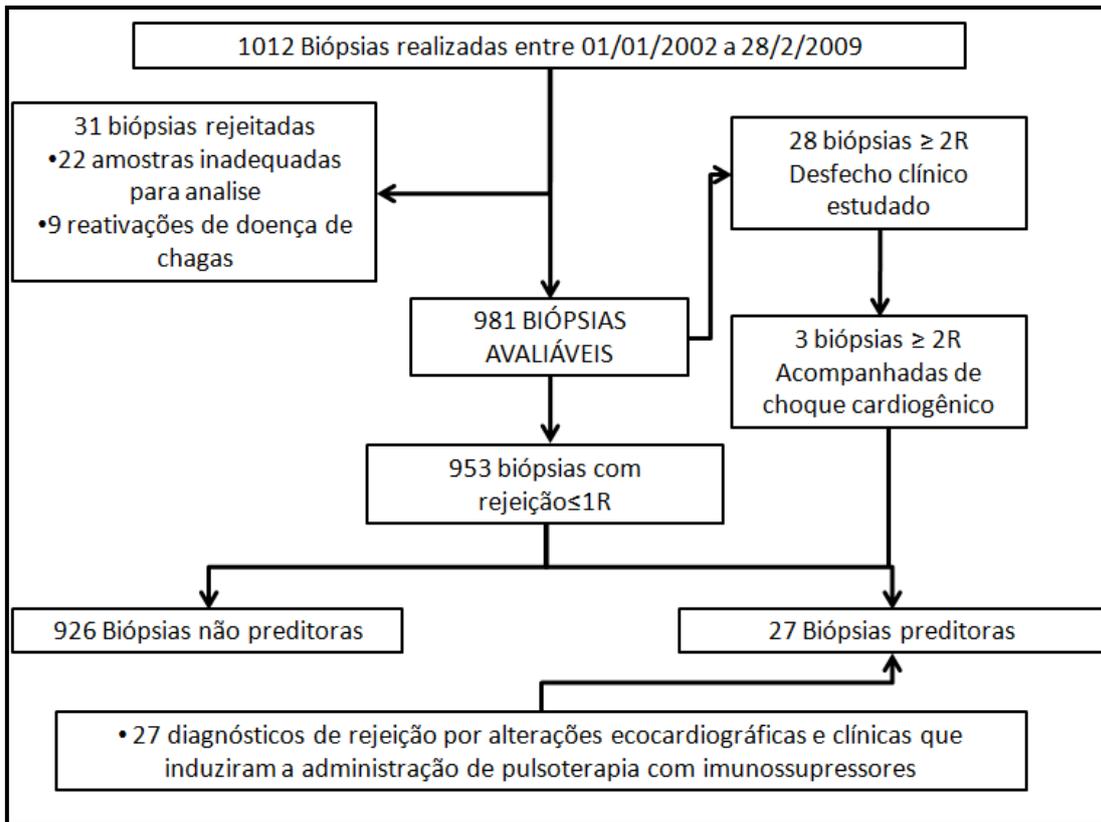


Figura 11- desenho do estudo para avaliar o desfecho clínico rejeição aguda com grave comprometimento hemodinâmico

#### 4.4.3 - Desenho do estudo para avaliar o desfecho morte em decorrência de rejeição aguda do enxerto.

Grupo preditor: constituído por 14 biópsias. Destes dois exames precederam biópsias com rejeição celular moderada ou grave, em que o paciente, apesar do tratamento imunossupressor administrado faleceu devido à rejeição aguda, e 12 biópsias que antecederam o falecimento do paciente por rejeição aguda.

Grupo não preditor: constituído de 939 biópsias que não precederam a morte do receptor por rejeição aguda.

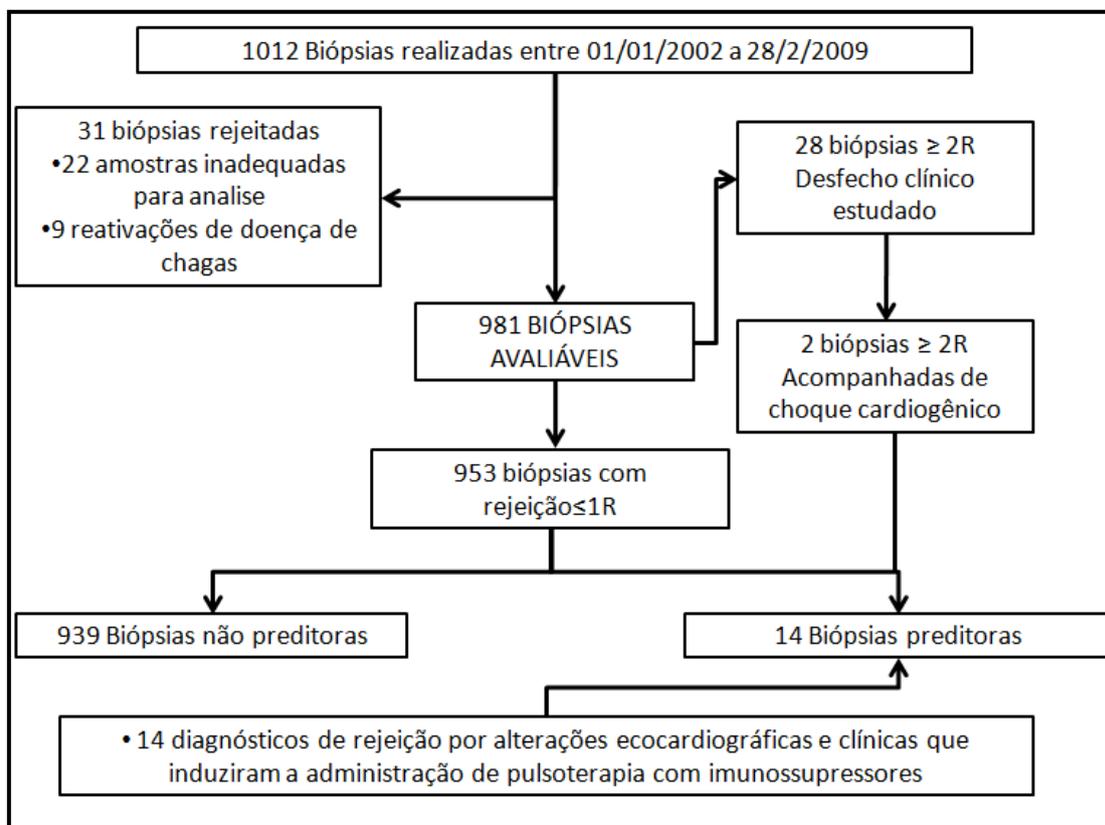


Figura 12 - desenho do estudo para avaliar o desfecho clínico morte devido a rejeição aguda.

#### **4.5 - Análise estatística:**

Todos os dados colhidos nesta pesquisa foram armazenados em planilha do software Excel 2003 para Windows<sup>®</sup>, e utilizamos o programa SPSS<sup>®</sup> versão 10.0 para a realização dos cálculos estatísticos.

Para a análise univariada, utilizamos os testes: Qui-quadrado, Mann-Whitney, Anova ou teste exato de Fisher para as variáveis categóricas e o teste t de Student para as variáveis normais. As variáveis na análise univariada que apresentaram valor de  $p \leq 0,10$  foram consideradas significantes e elegeram-se para compor a análise multivariada.

Na análise multivariada utilizou-se o método de regressão proporcional de Cox, para determinar o risco oferecido por cada variável estudada de ocorrência de rejeição aguda, rejeição aguda associada à disfunção ventricular e morte em decorrência à rejeição aguda. Incluímos no cálculo todas as variáveis que se mostraram significativas depois de concluída a análise univariada. Para estimarmos a sobrevida e sobrevida livre de rejeição (com ou sem comprometimento hemodinâmico), utilizamos o método de Kaplan-Meier e as diferenças entre os grupos foram verificadas pelo cálculo do log Rank Test. Consideramos como resultados significativos da análise multivariada, aqueles que apresentavam valores de  $p \leq 0,05$ .

## 5 - Resultados:

### 5.1- Descrição dos achados histopatológicos encontrados:

Ao analisar a totalidade das biópsias do estudo (antes de dividi-las em dois grupos) notamos que as lesões mais frequentemente encontradas foram o efeito Quilty, as vasculites discretas e moderadas e ainda as lesões isquêmicas. Estas lesões estiveram também presentes, ao menos em uma vez, nas biópsias endomiocárdicas da maioria da população do estudo. A Tabela 2 descreve os achados histopatológicos encontrados.

Tabela 7 - frequência das lesões histológicas encontradas nas biópsias revisadas e na população de estudo

Lesão histológica	Frequência encontrada nas biópsias (%)	Frequência encontrada na população estudada (%)
Efeito Quilty	400 (42,0%)	92 (84,4%)
Vasculites discretas	263 (27,6%)	89(81,7%)
Vasculites moderadas	175 (18,4%)	71 (65,1%)
Vasculites graves	41(4,3%)	24 (22,0%)
Eosinófilos	58 (6,1%)	42 (38,5%)
Lesões isquêmicas	204 (21,4%)	88 (80,7%)

Com exceção das vasculites moderadas, que foram significativamente menos frequentes em pacientes que antes do transplante sofriam de cardiomiopatia dilatada ou

secundária a doença valvar, a cardiopatia prévia ao transplante não influenciou as lesões encontradas nas biópsias endomiocárdicas no período pós-transplante.

Rejeição celular moderada ou grave foi encontrada em 27 biópsias (2,83% de todas as biópsias analisadas) e em 19,3% da população estudada (21 pacientes). Entretanto, quando consideramos rejeição como o evento que induziu ao aumento agudo da imunossupressão, encontramos este em 52 casos (5,5% do total de biópsias), afetando 30 (27,52%) dos pacientes estudados.

Não encontramos também relação significativa entre a cardiopatia prévia ao transplante e a ocorrência de rejeição moderada ou grave no receptor de transplante cardíaco.

### **5.2.1 - Análise univariada para o desfecho clínico rejeição aguda**

Na análise univariada, comparamos a intensidade e frequência de vasculites, efeito Quilty, eosinófilos no infiltrado inflamatório e lesões isquêmicas entre as biópsias que antecederam episódios de rejeição aguda (preditoras), e biópsias que não precederam esta complicação clínica (não preditoras). A tabela 3 resume os resultados da análise univariada para o desfecho clínico rejeição aguda.

Tabela 8 - análise univariada para o desfecho clínico rejeição aguda

Achados histopatológicos	Biópsias não preditoras	Biópsias preditoras	Significância
Vasculites ausentes	463(51,4%)	11 (21,2%)	
Vasculites discretas	239 (26,5%)	24 (46,2%)	
Vasculites moderadas	163 (18,1%)	12 (23,1%)	
Vasculites graves	36 (4,0%)	5 (9,6%)	< 0, 001 entre os grupos estudados
Lesões isquêmicas	190 (21,1%)	14 (26,9%)	0,319
Efeito Quilty	371 (41,2%)	29 (55,8%)	0,038
Eosinófilos	47 (5,2%)	11 (21,2%)	< 0, 001
Frequência média de vasculites por fragmento (IC95%)	0,15 (0,13-0,16)	0,28 (0,20-0,36)	< 0, 001

Na análise univariada, com exceção das lesões isquêmicas, todos os outros achados histopatológicos estudados ocorreram mais frequentemente no grupo de biópsias preditoras em comparação às não preditoras, sendo selecionados para análise multivariada.

### 5.2.2 - Análise univariada para o desfecho clínico rejeição aguda associada ao comprometimento hemodinâmico.

Na análise univariada para o desfecho clínico rejeição aguda associada ao comprometimento hemodinâmico, comparamos a incidência da frequência e intensidade das vasculites, efeito Quilty, lesões isquêmicas e eosinófilos no infiltrado inflamatório intersticial entre os grupos preditor e não preditor. A tabela 4 mostra os resultados encontrados.

Tabela 9 - análise univariável desfecho clínico rejeição aguda com grave comprometimento hemodinâmico

Achados histopatológicos	Biópsias não	Biópsias preditoras	Significância
	preditoras		
Vasculites ausentes	468 (50,5%)	6 (22,2%)	0,009 entre os grupos estudados
Vasculites discretas	249 (26,9%)	14 (51,9%)	
Vasculites moderadas	170 (18,4%)	5 (18,5%)	
Vasculites graves	39 (4,2%)	2 (7,4%)	
Lesões isquêmicas	198 (21,4%)	6 (22,2%)	0,916
Efeito Quilty	382 (41,3%)	18 (66,7%)	0,008
Eosinófilos	53 (5,7%)	5 (18,5%)	0,006
Frequência média de vasculites por fragmento	0,15 (0,14 -0,16)	0,25 (0,14 – 0,36)	0,006

(IC95%)			
---------	--	--	--

Realizada a análise univariada, verificou-se que somente as lesões isquêmicas não foram mais frequentes no grupo de biópsias predictoras, intensidade e frequência de vasculites, efeito Quilty e eosinófilos presentes no infiltrado inflamatório foram selecionados para integrarem a análise multivariada.

### 5.2.3 - Análise univariada desfecho clínico morte devido à rejeição aguda:

Todas as lesões histológicas estudadas (intensidade e frequência de vasculites, lesões isquêmicas, eosinófilos no infiltrado inflamatório e efeito Quilty) foram submetidas à análise univariada. A tabela 5 sumariza seus resultados.

TABELA 10 - análise univariável para o desfecho clínico morte devido à rejeição aguda

Achados histopatológicos	Biópsias não predictoras	Biópsias predictoras	Significância
Vasculites ausentes	471 (50,2%)	3 (21,4%)	0,013 entre os grupos estudados
Vasculites discretas	260 (27,7%)	3 (21,4%)	
Vasculites moderadas	169 (18,0%)	6 (42,9%)	
Vasculites graves	39 (4,2%)	2 (14,3%)	
Lesões isquêmicas	197 (21%)	7 (50%)	0,009
Efeito Quilty	393 (41,9%)	7 (50%)	0,734
Eosinófilos	52 (5,2%)	6 (42,9%)	< 0,001
Frequência média de vasculites por	0,15 (0,14-0,16)	0,32 (0,14-0,49)	< 0,001

fragmento (IC95%)			
----------------------	--	--	--

Todas as variáveis estudadas, com exceção do efeito Quilty, foram eleitas para participarem da análise multivariada deste desfecho clínico morte devido à rejeição aguda.

### **5.3- Análise multivariada:**

As variáveis que na análise univariada apresentaram  $p \leq 0,10$  foram incluídas no cálculo da análise multivariada. Para cada desfecho clínico estudado (rejeição aguda, rejeição aguda com comprometimento hemodinâmico e morte em decorrência à rejeição aguda), foi calculada uma equação de regressão diferente.

O decorrer do tempo após o transplante cardíaco relaciona-se com a ocorrência de rejeições agudas, pois elas são mais frequentes nos primeiros seis meses após transplante cardíaco, e raras após o segundo ano da cirurgia. Optamos por utilizar o método de regressão proporcional de Cox. Consideramos significativos os resultados obtidos onde o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

#### **5.3.1 - Regressão proporcional de Cox para o desfecho clínico rejeição aguda**

De todas as variáveis estudadas, apenas a frequência de vasculites por fragmento não se correlacionou com rejeição aguda apresentando razão de chance de 1,174 (IC95%: 0,357 – 3,861.  $p = 0,792$ ). Retirada esta variável da equação, obtivemos a vasculite intensa e a presença de eosinófilos como maiores preditores de rejeição futura, apresentando respectivamente as seguintes razões de chance: 10,60 (IC95%: 3,62 – 31,06.  $p < 0,001$ ) e 6,26 (IC95%: 3,16 – 12,43.  $p < 0,001$ ). O gráfico 1 sumariza os resultados da análise multivariada para o desfecho clínico rejeição aguda.

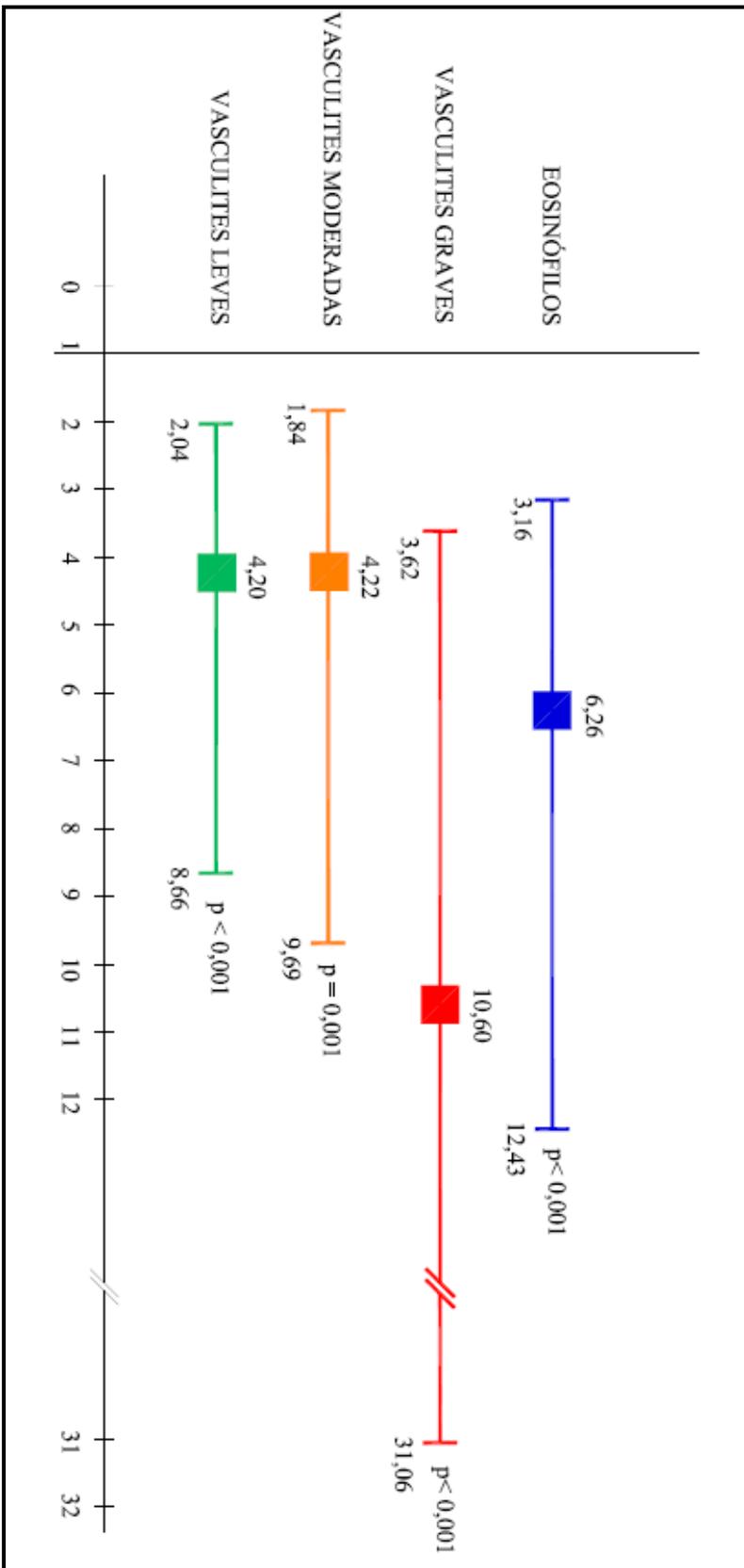


Gráfico 12 - resultados da análise multivariada para o desfecho clínico rejeição aguda

O grupo de pacientes que não apresentava vasculites em suas biópsias apresentou sobrevida livre de rejeição aguda de  $96,3 \pm 0,13\%$  no primeiro ano após o transplante cardíaco. Entretanto, notamos nos pacientes com vasculites leves ou moderadas uma redução semelhante de sobrevida livre de rejeição aguda, no mesmo período, de  $86,2 \pm 0,32\%$  e  $86,4 \pm 0,45\%$ , respectivamente. Os pacientes com vasculites graves apresentaram menor sobrevida livre de rejeição no final do primeiro ano pós-transplante, com apenas  $65,9 \pm 16,8\%$ , sem experimentarem esta complicação. As diferenças entre os grupos aumentam no decorrer do tempo e, aos cinco anos de seguimento, os pacientes sem vasculites apresentam  $91,7 \pm 0,3\%$  de sobrevida livres de rejeição aguda. Já nos pacientes com vasculites graves, apenas  $49,4 \pm 19\%$  não apresentaram esta complicação após o transplante cardíaco

Pacientes que não apresentam eosinófilos compondo o infiltrado intersticial tem sobrevida livre de rejeição aguda no primeiro ano após o transplante cardíaco de  $98,5\% \pm 0,05\%$ . Entretanto, no grupo em que notamos a presença desta célula no infiltrado inflamatório intersticial miocárdico, a sobrevida livre de rejeição neste período foi muito reduzida, de apenas  $61,6\% \pm 10,2\%$ . Os gráficos 2 e 3 ilustram a sobrevida livre de rejeição dos pacientes com e sem vasculites e eosinófilos no infiltrado inflamatório respectivamente.

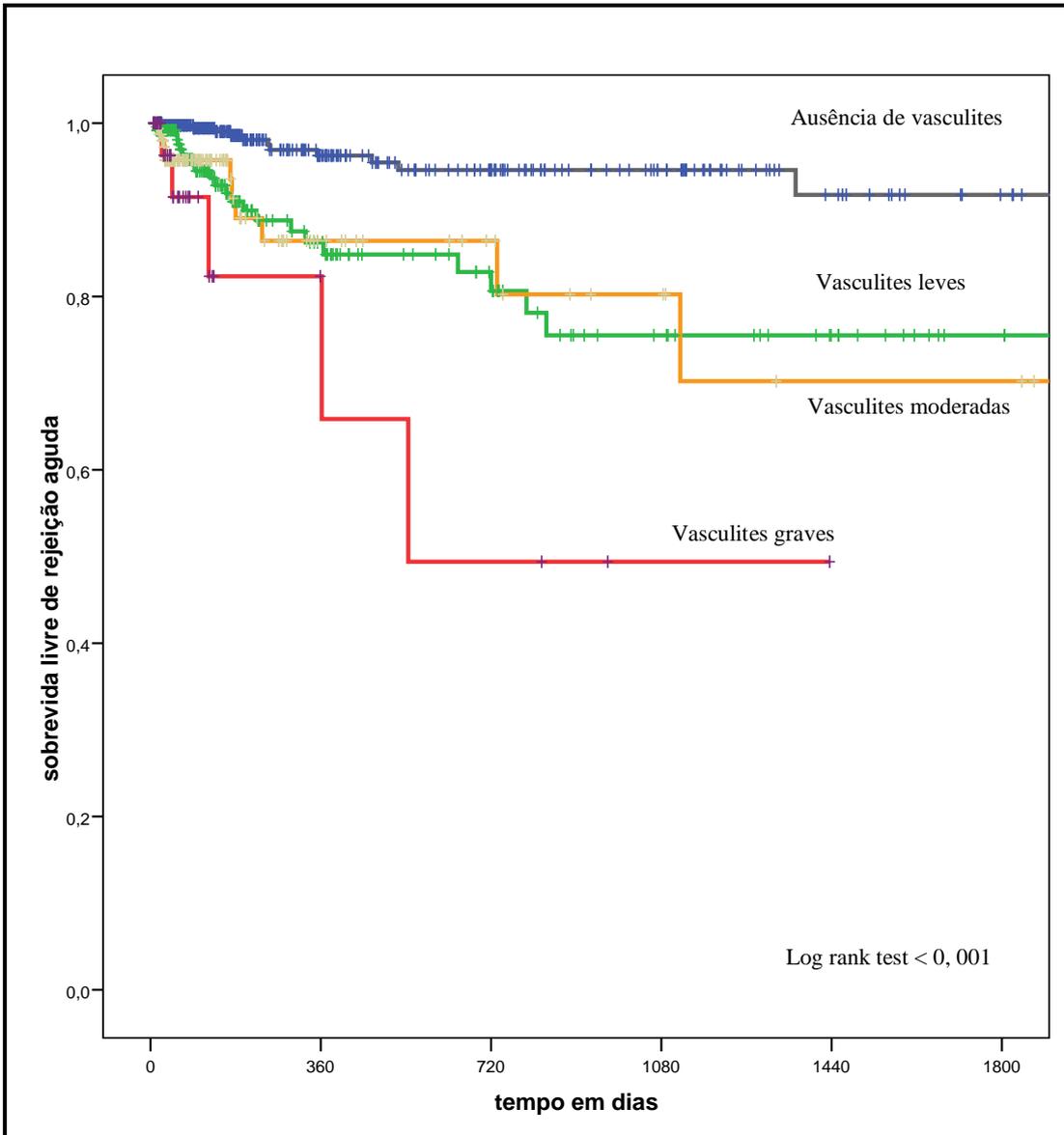


Gráfico 13 - sobrevivida livre de rejeição em pacientes com vasculites em biópsia endomiocárdica

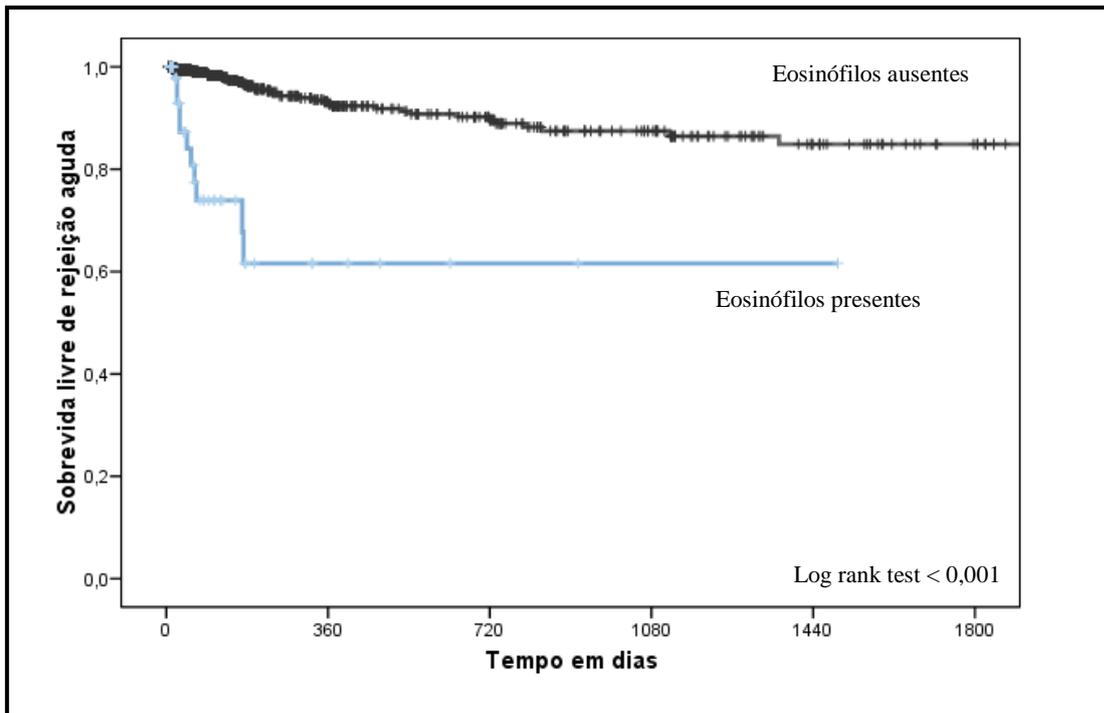


Gráfico 14- sobrevida livre de rejeição aguda em pacientes com eosinófilos no infiltrado intersticial

### 5.3.2 - Regressão proporcional de Cox para o desfecho rejeição aguda associada com grave comprometimento hemodinâmico.

Após análise univariada, selecionamos para o cálculo da regressão proporcional de Cox as seguintes variáveis: intensidade e frequência das vasculites, presença de eosinófilos no infiltrado intersticial miocárdico e efeito Quilty.

Realizada a equação de regressão, identificamos como variáveis não correlacionadas significativamente com rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico, a frequência de vasculites e vasculites moderadas, que apresentaram razões de chance de: 0,796 (IC 95%: 0,14-4,94.  $p = 0,79$ ) e 2,95 (IC95%:0,78 – 11,13.  $p=0,111$ ).

Retiradas da equação as variáveis descritas acima, obtivemos as vasculites intensas e eosinófilos como principais fatores de risco para rejeição aguda associada à

grave comprometimento hemodinâmico, com razões de chance de 7,52 (IC95%: 1,45-38,93.  $p=0,016$ ) e 6,61 (IC95%: 2,38 – 18,31.  $p<0,001$ ). O gráfico 4 resume os resultados obtidos na análise multivariada para o desfecho clínico rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico.

Os pacientes sem vasculites em suas biópsias apresentaram sobrevida livre de rejeição associada à disfunção ventricular de  $98 \pm 0,9\%$  em um ano. Já os pacientes que apresentaram vasculites leves ou graves apresentaram 86% de sobrevida livre de rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico.

Os pacientes em que encontramos eosinófilos no infiltrado inflamatório apresentaram menor sobrevida livre de rejeição com grave comprometimento hemodinâmico ao final do primeiro ano de transplante em comparação com o restante da população do estudo ( $75,8 \pm 10\%$  e  $96,7 \pm 0,9\%$ , respectivamente). Os gráficos 5 e 6 demonstram os resultados citados acima.

Os pacientes portadores de efeito Quilty apresentaram menor sobrevida livre de rejeição aguda com grave comprometimento hemodinâmico, em comparação com os pacientes que não apresentaram esta lesão histológica. Ao final de um ano de seguimento, os pacientes sem efeito Quilty apresentavam  $97,9 \pm 0,1\%$ , e os pacientes que possuíam infiltrado endocárdio em suas biópsias apresentavam  $93,2 \pm 0,2\%$  de sobrevida livre desta grave complicação pós - transplante cardíaco. O gráfico 7 ilustra estes resultados.

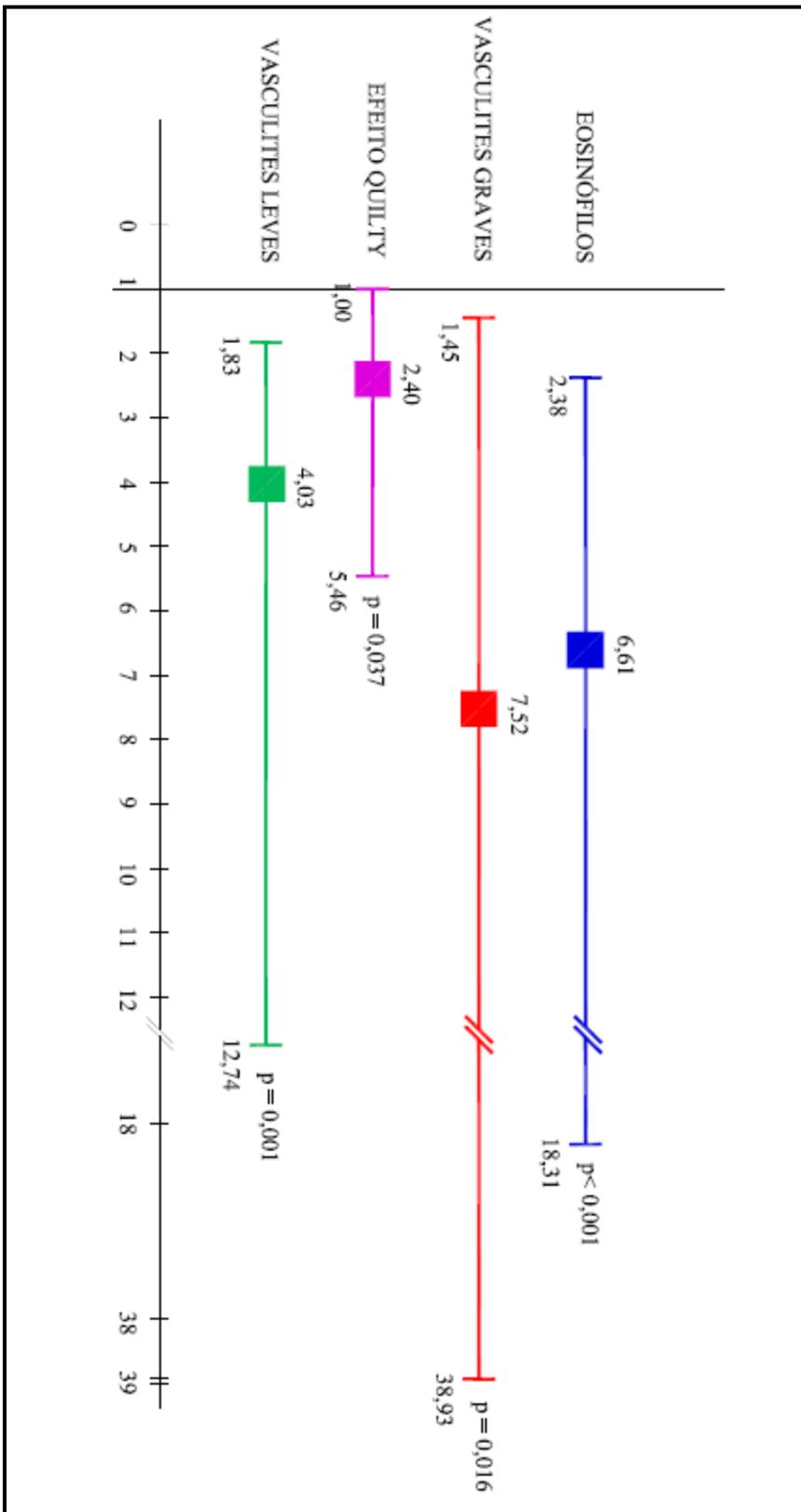


Gráfico 15 - regressão de Cox para o desfecho clínico rejeição aguda associada com grave comprometimento hemodinâmico

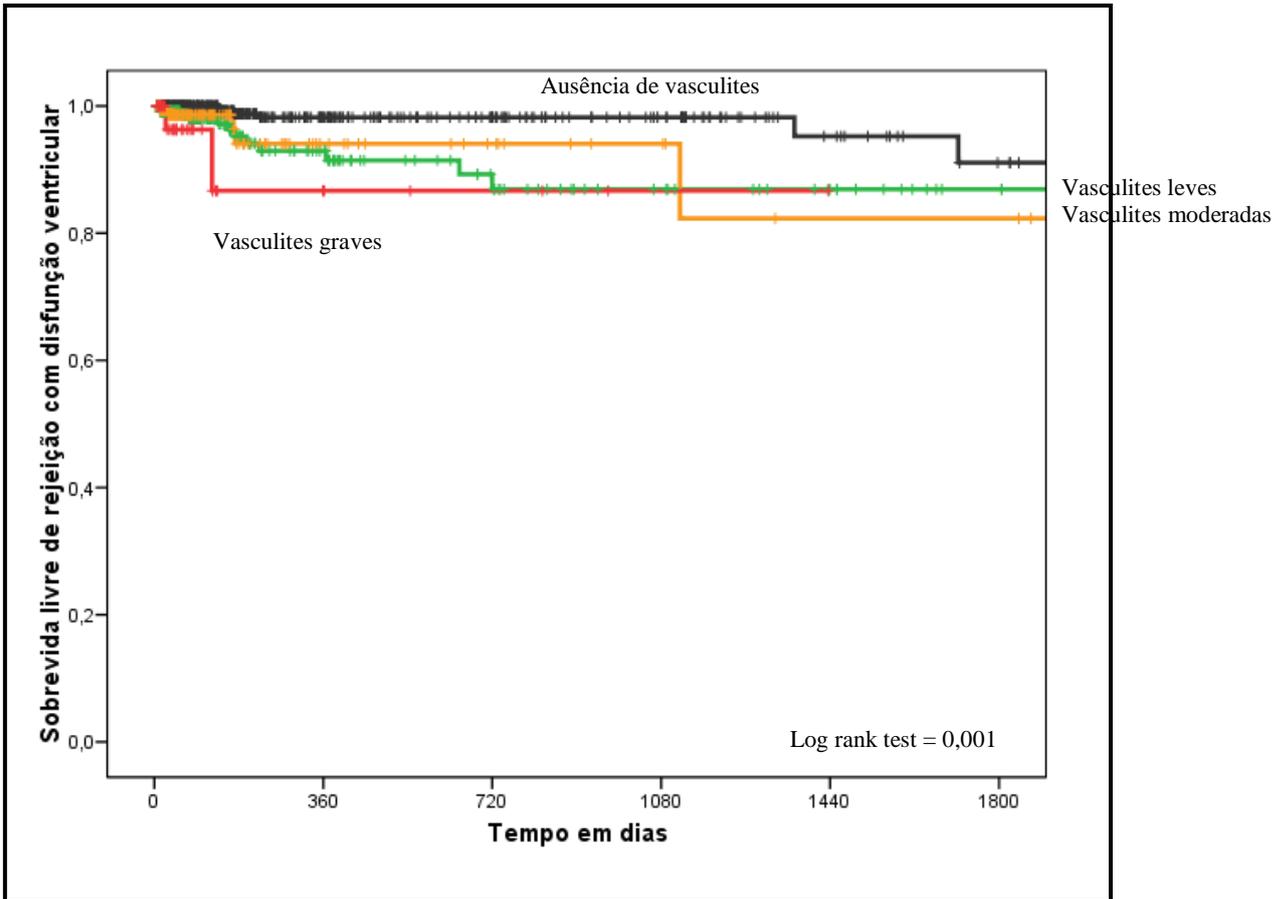


Gráfico 16 - sobrevida livre de rejeição associada à grave comprometimento hemodinâmico em pacientes com vasculites em suas biópsias endomiocárdicas

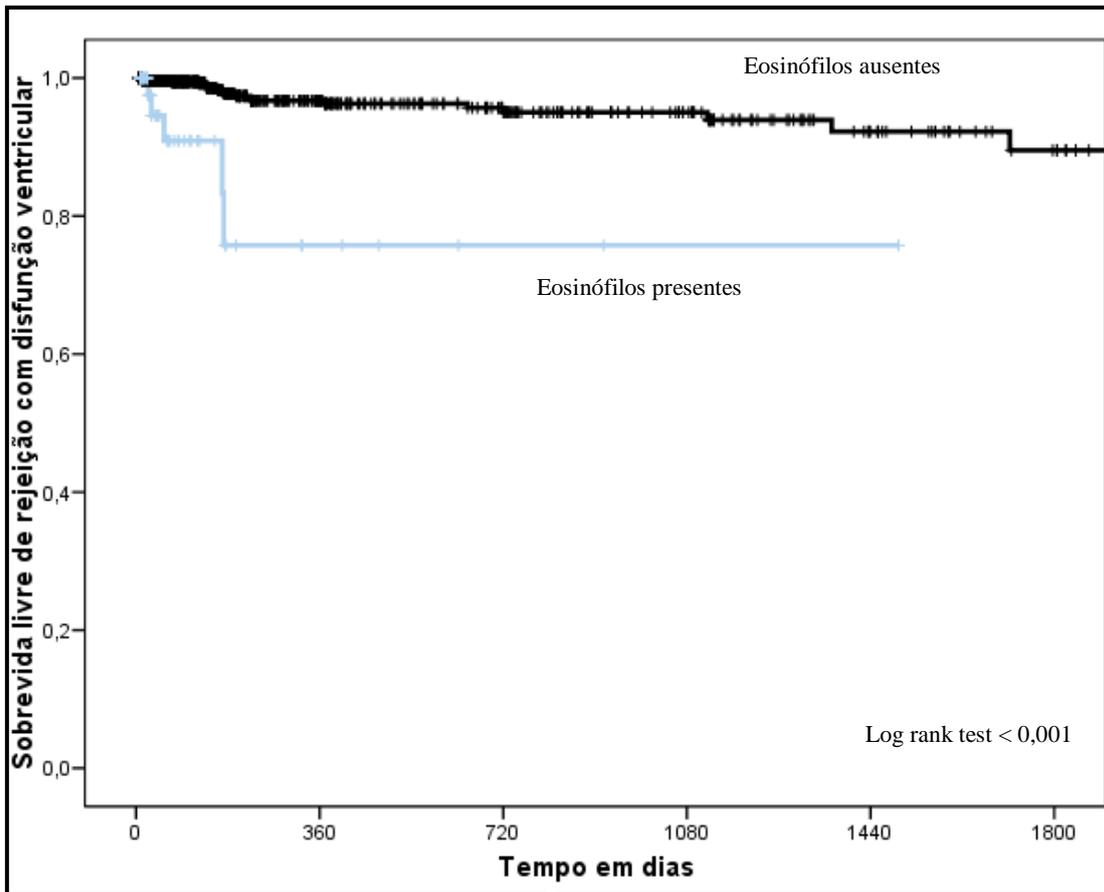


Gráfico 17 – sobrevida livre de rejeição aguda à grave comprometimento hemodinâmico

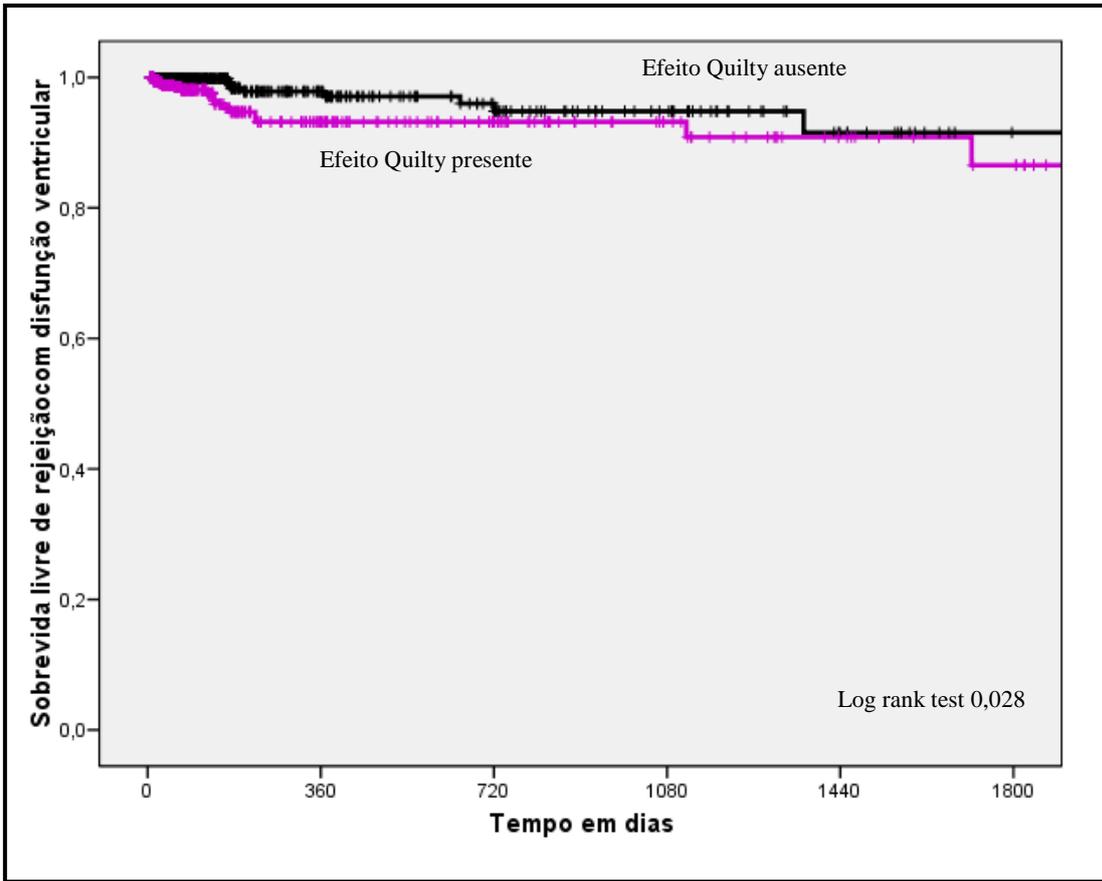


Gráfico 18- sobrevida livre de rejeição aguda com grave comprometimento hemodinâmico em pacientes com efeito Quilty

### **5.3.3 - Regressão proporcional de Cox para o desfecho clínico morte devido à rejeição aguda.**

As variáveis frequência e intensidade das vasculites, presença de lesões isquêmicas e eosinófilos na biópsia endomiocárdica foram elegíveis para participarem da análise multivariada para o desfecho clínico morte devido à rejeição aguda. Apenas a variável frequência de vasculites e vasculites de intensidade leve não demonstraram correlações significativas com o desfecho estudado, com razões de chances de 2,10 (IC95%: 0,125-35,3.  $p = 0,606$ ) e 1,95 (IC95%: 0,386 – 9,802).  $p = 0,42$ ). Retiradas estas variáveis da equação, encontramos a presença de eosinófilos no infiltrado intersticial e vasculites intensas como os principais fatores de risco para morte devido à rejeição aguda com razões de chances de 11,20 (IC95%: 3,53 – 36,17.  $p < 0,001$ ) e 14,50 (IC95%: 2,19 – 36,17.  $p = 0,006$ ). O gráfico 8 demonstra os resultados encontrados na equação de regressão.

No final do primeiro ano após o transplante cardíaco, 23% dos receptores portadores de vasculites intensas faleceram devido à rejeição aguda. A mortalidade deste grupo, devido à rejeição, foi muito superior ao encontrado nos outros grupos que apresentaram mortalidade devido à rejeição aguda entre 0,8% nos pacientes sem vasculites e 7,7% nos pacientes com vasculites moderadas. O gráfico 9 demonstra a mortalidade por rejeição aguda nos pacientes com vasculites.

O grupo de pacientes com eosinófilos em sua biópsia do miocárdio apresentou mortalidade devido à rejeição aguda, no final do primeiro ano, de 28,4%; já nos pacientes em que estas células não foram observadas, a mortalidade devido à rejeição aguda no mesmo período foi de apenas 1,8%. O gráfico 10 ilustra a mortalidade devido

à rejeição aguda nos pacientes portadores de eosinófilos, compondo o infiltrado inflamatório endomiocárdico.

A presença de lesão isquêmica nas biópsias endomiocárdicas foi associada a um discreto aumento na mortalidade por rejeição aguda. Os pacientes que não apresentavam estas lesões possuíam mortalidade ao final do primeiro ano de 1,8%. Já nos pacientes onde encontramos micro infartos e outras lesões isquêmicas, a mortalidade foi de 7,3%. O gráfico 11 sumariza estes achados.

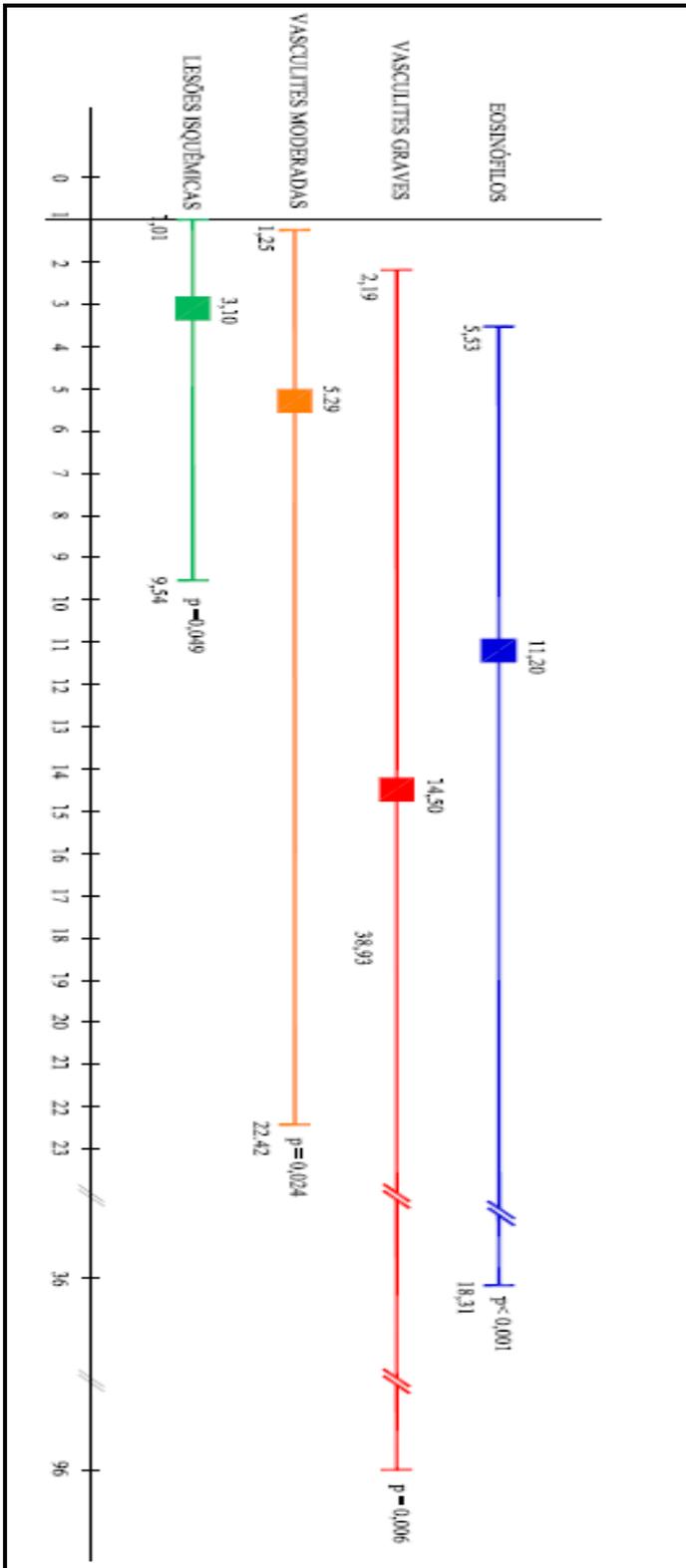


Gráfico 19 - regressão proporcional de Cox para o desfecho clínico morte devido à rejeição aguda

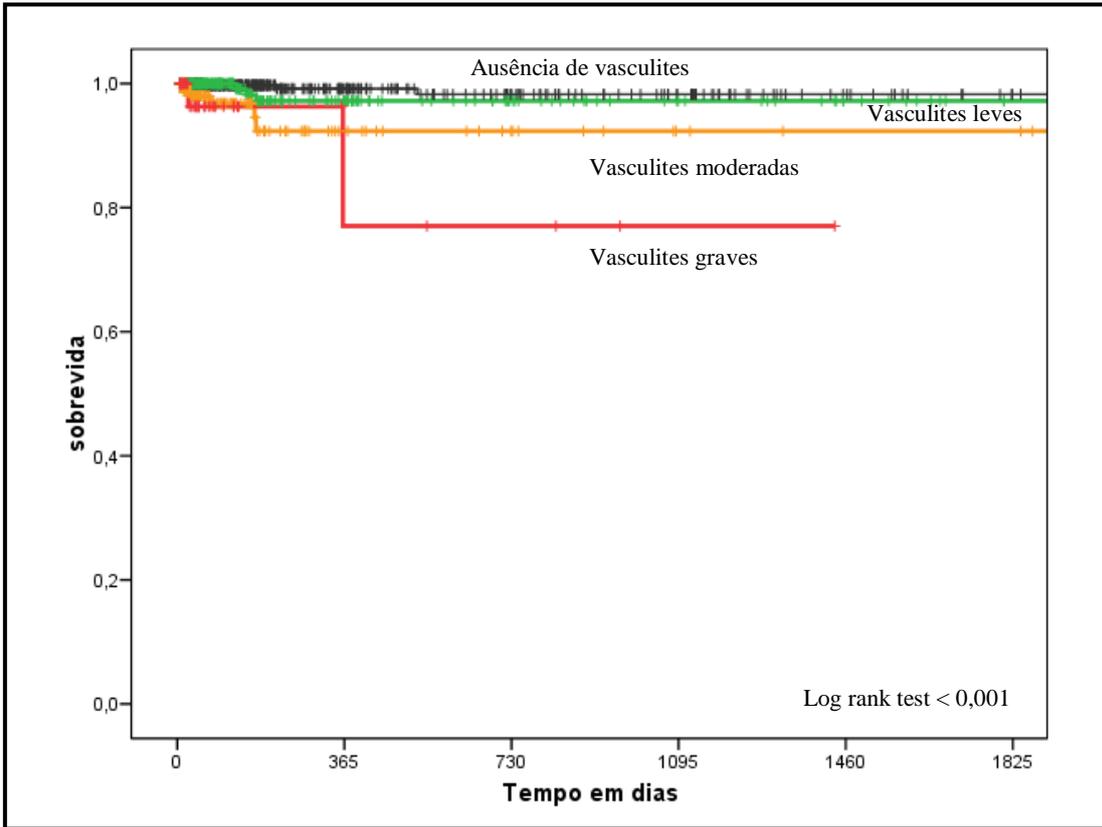


Gráfico 20 - sobrevivida em pacientes com vasculites após transplante cardíaco

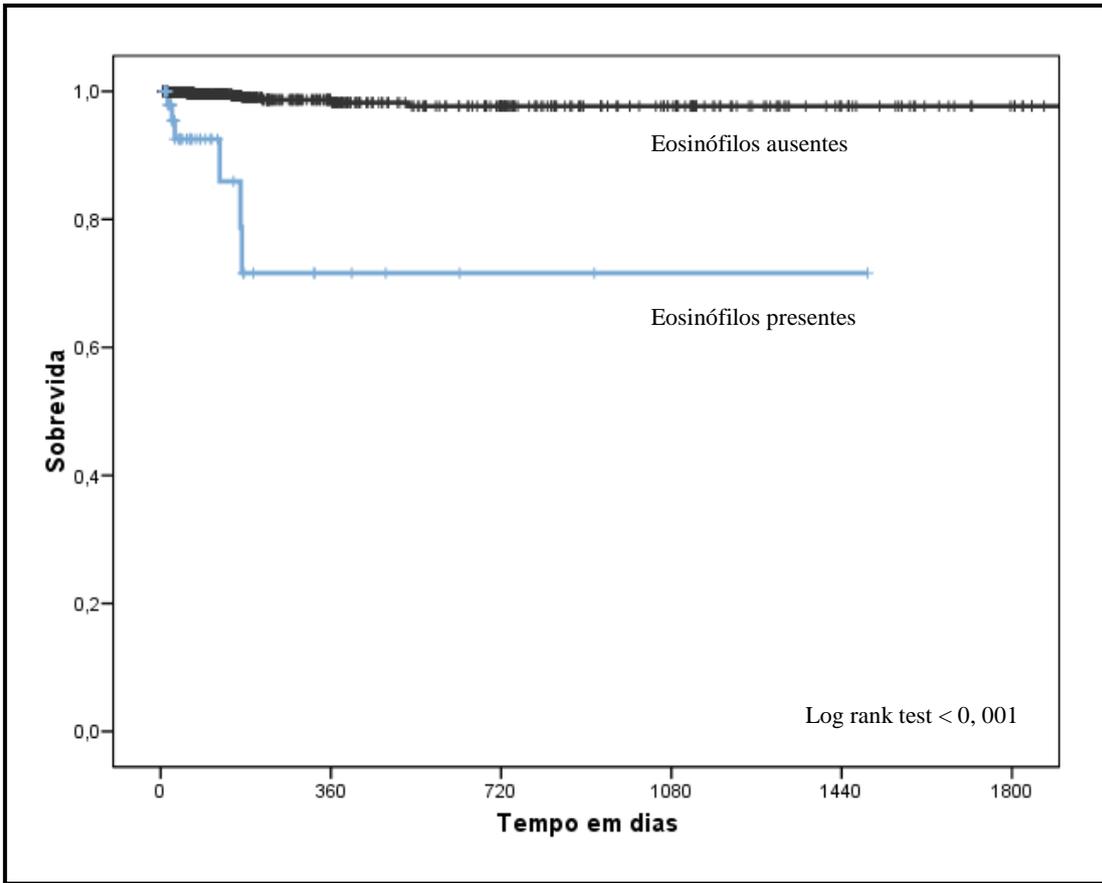


Gráfico 21 - sobrevida em pacientes com eosinófilos compondendo o infiltrado endomiocárdico

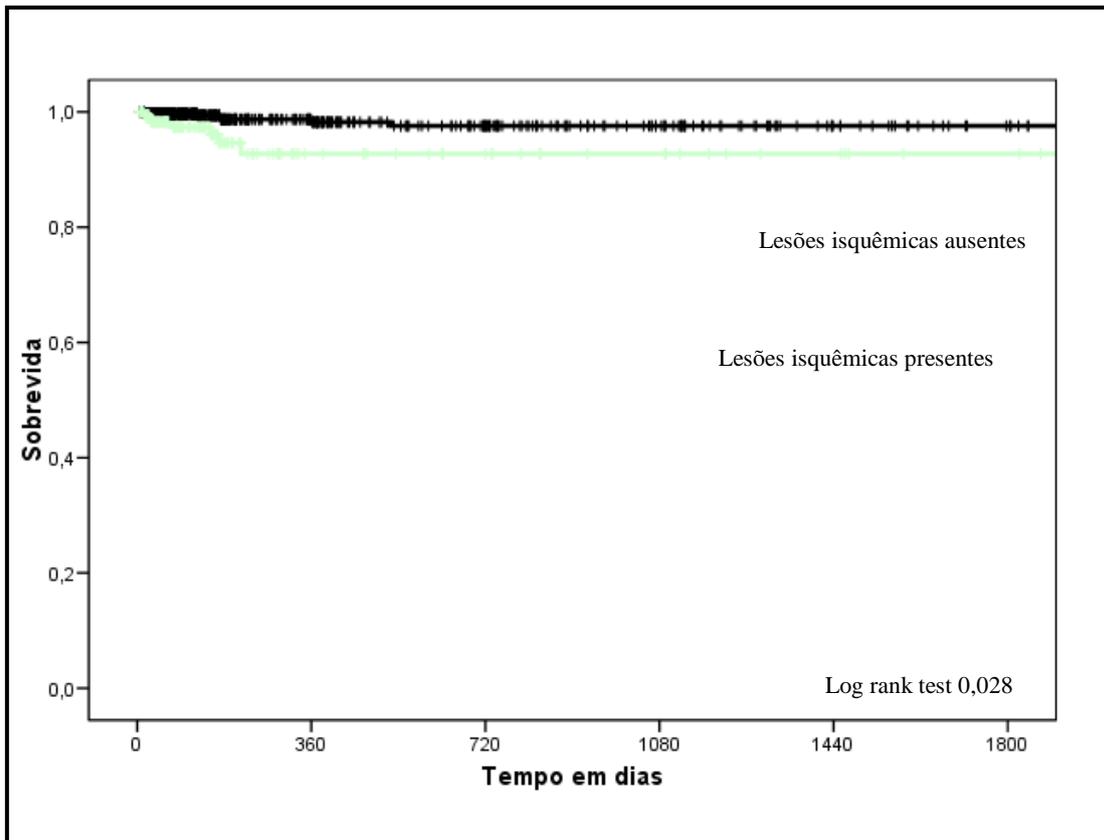


Gráfico 22- sobrevida de pacientes com lesões isquêmicas nas biópsias endomiocárdicas

## 6 – DISCUSSÃO

A análise da biópsia endomiocárdica por microscopia óptica vem sendo utilizada para o diagnóstico de rejeição há mais de 35 anos(1;7), por possuir grande sensibilidade e especificidade (33). Ainda hoje é considerada como padrão ouro para a monitorização da atividade inflamatória miocárdica após o transplante cardíaco(5;34;47;48).

A utilização da nomenclatura padronizada para o diagnóstico de rejeição cardíaca (8), foi de extrema importância para o crescimento do conhecimento médico na área de transplante cardíaco. Entretanto, com o uso rotineiro desta classificação surgiram algumas lacunas na interpretação dos achados histológicos das biópsias endomiocárdicas e sua relação com a fisiopatologia da rejeição e seu significado clínico. Entre os hiatos do conhecimento no transplante cardíaco temos: os significados clínicos das vasculites, lesões isquêmicas, efeito Quilty e eosinófilos em biópsias do miocárdio que apresentam rejeição leve.

A identificação de achados nas biópsias que possam prever o aparecimento de rejeição e má evolução se reveste de enorme importância clínica, podendo ser utilizada como uma ferramenta importante capaz de indicar em quais pacientes devemos incrementar a terapia imunossupressora a fim de evitar agressão imunológica do enxerto.

Pequenos estudos realizados entre as décadas de 80 e 90 consideraram as vasculites um sinal nefasto na interpretação das biópsias endomiocárdicas, sendo estas associadas à rejeição grave e morte (73;75;85). Porém, este sinal histológico não foi valorizado nas nomenclaturas padronizadas de rejeição de 1990(8) ou de 2005(9), necessitando até hoje de estudos capazes de elucidar seu real valor clínico.

Os achados desta pesquisa corroboram a importância das vasculites como fatores preditores independentes de rejeição aguda, rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico e morte por rejeição aguda. De maneira inédita classificamos as vasculites morfológicamente de acordo com a intensidade do fenômeno inflamatório e a integridade de suas paredes e seu endotélio.

Dentre as alterações histológicas estudadas, as vasculites e a presença de eosinófilos apresentaram significado clínico pela capacidade de prever eventos clínicos desfavoráveis, demonstrado tanto pelos fatos de que os pacientes portadores de vasculites leves e moderadas apresentaram chance de rejeição aguda cerca de quatro vezes maior que os pacientes sem inflamação encontrada na parede dos vasos, quanto pela observação que em pacientes com vasculites graves (acompanhadas de necrose da parede do vaso ou formação de trombos intravasculares) possuem probabilidade aumentada de 10 vezes de rejeição aguda, sete vezes de rejeição aguda acompanhado de comprometimento hemodinâmico grave e 14 vezes a possibilidade de morte devido à rejeição aguda do enxerto cardíaco.

Quanto à rejeição aguda, a presença de vasculites diminui significativamente a sobrevida livre desta complicação, principalmente no grupo de pacientes que apresentaram vasculites graves, onde 50% dos pacientes apresentaram rejeição até o segundo ano de transplante contra apenas 5% dos pacientes do grupo sem vasculites que experimentaram este desfecho clínico no mesmo período.

Ao analisarmos rejeição aguda com grave comprometimento hemodinâmico, que no cenário do transplante cardíaco é uma complicação importante com consequências muitas vezes nefastas, notamos que os pacientes com vasculites intensas têm cerca de sete vezes mais chances de desenvolver este grave quadro clínico, sendo que em seis

meses após o transplante cerca de 10% dos pacientes com vasculites graves haviam apresentado este desfecho clínico contra apenas 1% dos pacientes que não apresentavam vasculites.

Em relação ao desfecho clínico morte devido à rejeição aguda as vasculites moderadas e graves mostraram aumento da chance do paciente falecer em decorrência de rejeição aguda de cinco e 14 vezes, respectivamente, em relação às pessoas que não apresentaram vasculites, demonstrando assim a importância do acometimento inflamatório da microcirculação. Achado semelhante a este, porém não relacionado à doença inflamatória e sim a doença estenótica da microcirculação foi recentemente publicado(101).

Tomando como base os estudos das vasculites sistêmicas que podem ser causadas tanto por ação da imunidade celular, quanto pela deposição de imunocomplexos ou anticorpos(80), seria razoável inferir que as vasculites, no contexto do transplante cardíaco, podem ocorrer tanto na rejeição celular, quanto na rejeição mediada por anticorpos, entretanto hoje existem mais evidências clínicas e experimentais que associam a presença de vasculites à rejeição mediada por anticorpos(79;102;103). A associação entre vasculites e o aumento da expressão de HLA-DR, deposição de anticorpos IgG ou IgM no leito vascular, associados à fixação de frações C3d e C4d do complemento e o acúmulo de fibrina nas paredes capilares ou no interstício, foi recém demonstrada em receptores de transplante cardíaco e correlaciona-se com aumento da mortalidade cardiovascular(102).

Os mecanismos propostos para explicar as lesões vasculares são a fixação do complemento aos anticorpos depositados no leito vascular, sua ativação levando a lesão endotelial, trombose vascular e recrutamento de neutrófilos para o local de inflamação

vascular (82), originando desta forma isquemia tecidual, que pode ser considerada como o denominador mais decisivo de prognóstico nas vasculites, podendo levar desde a disfunção cardíaca decorrente a alterações metabólicas devido à isquemia passageira até ao infarto do miocárdio ocasionando lesões definitivas no coração (83).

As lesões endoteliais ocorridas durante a rejeição aguda parecem relacionar-se tanto com o grau de rejeição, quanto com a sobrevivência do enxerto(28). Tanto o endotélio lesado quanto as células inflamatórias presentes nas paredes dos vasos acometidos podem secretar citocinas que são também responsáveis por aumento da permeabilidade vascular, disfunção endotelial, trombose intravascular, edema intersticial e disfunção cardíaca devido a efeitos secundários à produção de óxido nítrico (6;13).

O endotélio é a primeira interface entre o tecido não próprio implantado cirurgicamente e o sistema imune do receptor. Rejeições agudas intensas podem levar a solução de continuidade do endotélio, antes mesmo que ocorra lesão nas células musculares cardíacas (42) favorecendo a formação de trombos e a inflamação do interstício miocárdico, podendo levar a disfunção cardíaca e em última instância à morte do receptor

As lesões isquêmicas reconhecidas até a sexta semana pós-transplante são associadas à isquemia sofrida pelo coração durante a captação do órgão e a realização do transplante cardíaco e podem ser exacerbadas por hipotensão do receptor(9;27). Estas lesões também se correlacionam com a tempestade de catecolaminas ocorrida no doador, após a morte encefálica (89), com aumento do tempo de isquemia sofrido entre a captação e o implante do órgão(30;92), por lesão de isquemia e reperfusão sofridas pelos miócitos e células endoteliais(104) e pelo suporte de drogas inotrópicas e vasoconstritoras administradas ao doador antes da captação do órgão(91).

O achado de lesões isquêmicas tardias não é tão facilmente explicado, podendo correlacionar a rejeição mediadas por anticorpos (84;95) e doença vascular do enxerto(27;98).

Nesta pesquisa correlacionamos a ocorrência de lesões isquêmicas a um aumento de cerca de três vezes da chance de morte por rejeição aguda. É prudente deduzir que estas mortes possam ter ocorrido durante rejeições mediadas por anticorpos ou rejeições mistas que são acompanhadas freqüentemente de disfunção ventricular e morte (36;105), visto que os pacientes que faleceram em decorrência a doença vascular do enxerto foram excluídos inicialmente desta pesquisa.

Dos achados não relacionados à rejeição, o efeito Quilty é o mais estudado e também aquele que representa maior controvérsia quanto ao seu significado. Reconhecido em 1981, já foram sugeridas como potenciais etiologias desta lesão: rejeição precoce, rejeição crônica, estágios precoces de linfoma, associado à baixa produção de interleucina 10, níveis subterapêuticos ciclosporina plasmática e ciclosporina tecidual endocárdica(55).

Algumas antigas evidências sugerem que o efeito Quilty como fator preditor de rejeição aguda(52;53;66), entretanto este papel não é claro nos dias de hoje, sendo sua relação com rejeição aguda considerada ainda indeterminada(9).

Nos últimos anos vem surgindo evidências mostrando que o efeito Quilty pode ser considerado como um marcador de atividade do sistema imune. Pacientes portadores de efeito Quilty possuem maior número de rejeições agudas (55;69), maior evidencia de apoptose celular (56) e associada com maior deposição tecidual do sistema complemento(24) e menor sobrevida do enxerto(70;71) em comparação com os pacientes que não apresentam o efeito Quilty.

Nossos resultados mostram que pacientes portadores de efeito Quilty possuem chance de desenvolver rejeição associada a comprometimento hemodinâmico grave, cerca de duas vezes maior que os pacientes sem infiltrados nodulares endocárdicos. Entretanto, para a nossa surpresa, o efeito Quilty não foi fator preditor independente de rejeição aguda não complicada e tampouco de morte devido à rejeição aguda. Não encontramos justificativas biológicas ou clínicas para este fato, sendo razoável supor que estatisticamente, o efeito Quilty foi suplantado pelo poder preditor de rejeição das vasculites e dos eosinófilos no desfecho rejeição aguda.

A presença de eosinófilos compondo o infiltrado inflamatório intersticial é associada freqüentemente a rejeições graves acompanhadas de hemorragia, vasculites intensas, necrose de fibras musculares levando à disfunção do enxerto cardíaco e muitas vezes a morte do receptor. Entretanto no final da década de 80, surge uma série de quatro casos onde a presença de eosinófilos em rejeições leves ou moderadas foi sucedida de graves repercussões hemodinâmicas(22). Não surgiram novas pesquisas desde então, capazes de elucidar o significado dos eosinófilos nas rejeições leves.

Em nossa população, a presença de infiltração eosinofílica nas biópsias cardíacas analisadas foi pouco comum, ocorrendo em apenas 6,1% dos exames reavaliados, entretanto este achado mostrou-se de grande significado clínico, pois nos pacientes que apresentavam eosinófilos fazendo parte do infiltrado inflamatório intersticial, a chance de rejeição e rejeição associada à grave comprometimento hemodinâmico aumentou cerca de seis vezes cada uma, e a probabilidade de morte devido à rejeição aguda em 11 vezes em comparação ao grupo de paciente que possuíam infiltrado inflamatório intersticial exclusivamente linfocitário.

Sabemos que os eosinófilos agem como células efetoras de rejeição quando a via do linfócito T citotóxico encontra-se bloqueada ou inoperante (17). Desencadeadas pelos linfócitos T auxiliares do tipo dois a via de rejeição dos eosinófilos é dependente de interleucinas 4, 5 e 9 acarretando em última instância aumento da permeabilidade vascular e destruição tecidual mediada por uma série de proteínas liberadas dos grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos tais como: proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica, neurotoxina eosinofílica e peroxidase eosinofílica.

Este é o primeiro estudo em humanos que correlaciona a infiltração eosinofílica em biópsias com rejeição leve, a rejeição aguda, rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico e a morte por rejeição aguda.

Uma limitação potencial do estudo é o seu caráter retrospectivo.

## 7- Conclusões

Após avaliação dos resultados obtidos na comparação dos achados histológicos encontrados nos grupos de biópsias preditoras e não preditoras concluímos que:

- 1- A presença de vasculites nas biópsias sem infiltrado inflamatório ou rejeição leve está associada a aumento do risco do paciente desenvolver rejeição aguda, rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico e morte devido à rejeição aguda. Adicionalmente encontramos relação entre a intensidade da inflamação dos vasos afetados com a evolução do pacientes (a presença de vasculite intensa na biópsia endomiocárdicas foi o fator preditor independente que mais se correlacionou com rejeição aguda, rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico e morte devido à rejeição aguda).
- 2- A presença de lesões isquêmicas foi acompanhada de aumento de risco de o paciente falecer de rejeição aguda, mas não se correlacionou com os outros eventos estudados.
- 3- O achado de eosinófilos compondo o infiltrado inflamatório de pacientes com rejeições leves correlacionou-se com aumento da chance do paciente desenvolver rejeição aguda, rejeição aguda associada à grave comprometimento hemodinâmico e morte devido à rejeição aguda.
- 4- O efeito Quilty não se correlacionou com rejeição aguda não complicada, porem mostrou-se como fator preditor independente de rejeição aguda com grave comprometimento hemodinâmico.

## 8- Referências Bibliográficas

- (1) Meine TJ, Russell SD. A history of orthotopic heart transplantation. *Cardiol Rev* 2005 Jul;13(4):190-6.
- (2) George JF, Kirklin JK, Young JB, McGiffin DC. History of cardiac transplantation. Kirklin JK, Young JB, McGiffin DC, editors. *Heart Transplantation*, 3-13. 2002. Philadelphia, Churchill Livingstone.
- (3) Rodrigues da SP. [Cardiopulmonary and heart transplantation: 100 years of history and 40 years of existence]. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2008 Mar;23(1):145-52.
- (4) DiBardino DJ. The history and development of cardiac transplantation. *Tex Heart Inst J* 1999;26(3):198-205.
- (5) Almeida DR, Carvalho AC, Pessoa C, de Sousa JA, Branco JN, Silva LC, et al. [Hemodynamic study with Swan-Ganz catheterization, concomitant to endomyocardial biopsy in heart transplantation patients. Importance in the early diagnosis of rejection]. *Arq Bras Cardiol* 1993 Sep;61(3):171-4.
- (6) Fishbein MC, Kobashigawa J. Biopsy-negative cardiac transplant rejection: etiology, diagnosis, and therapy. *Curr Opin Cardiol* 2004 Mar;19(2):166-9.
- (7) Billingham ME. Dilemma of variety of histopathologic grading systems for acute cardiac allograft rejection by endomyocardial biopsy. *J Heart Transplant* 1990 May;9(3 Pt 2):272-6.
- (8) Billingham ME, Cary NR, Hammond ME, Kemnitz J, Marboe C, McCallister HA, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. *J Heart Transplant* 1990 Nov;9(6):587-93.
- (9) Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005 Nov;24(11):1710-20.
- (10) Dec GW. Heart Failure after cardiac transplantation : diagnostic evaluation and treatment options. *ACC Current Journal Review*, 61-66. 2002.
- (11) Alegre ML, Florquin S, Goldman M. Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment. *Curr Opin Immunol* 2007 Oct;19(5):563-8.
- (12) Duquesnoy RJ, Demetris AJ. Immunopathology of cardiac transplant rejection. *Curr Opin Cardiol* 1995 Mar;10(2):193-206.

- (13) Delfs MW, Furukawa Y, Mitchell RN, Lichtman AH. CD8+ T cell subsets TC1 and TC2 cause different histopathologic forms of murine cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2001 Mar 15;71(5):606-10.
- (14) Poulin LF, Richard M, Le MA, Kiss R, McKenzie AN, Goldman M, et al. Interleukin-9 promotes eosinophilic rejection of mouse heart allografts. *Transplantation* 2003 Aug 15;76(3):572-7.
- (15) Trull AK, Akhlaghi F, Charman SC, Endenberg S, Majid O, Cornelissen J, et al. Immunosuppression, eotaxin and the diagnostic changes in eosinophils that precede early acute heart allograft rejection. *Transpl Immunol* 2004 Jan;12(2):159-66.
- (16) Braun MY, Desalle F, Le MA, Pretolani M, Matthys P, Kiss R, et al. IL-5 and eosinophils mediate the rejection of fully histoincompatible vascularized cardiac allografts: regulatory role of alloreactive CD8(+) T lymphocytes and IFN-gamma. *Eur J Immunol* 2000 May;30(5):1290-6.
- (17) Goldman M, Le MA, Braun M, Flamand V, Abramowicz D. A role for eosinophils in transplant rejection. *Trends Immunol* 2001 May;22(5):247-51.
- (18) Chin C, Naftel DC, Singh TP, Blume ED, Luikart H, Bernstein D, et al. Risk factors for recurrent rejection in pediatric heart transplantation: a multicenter experience. *J Heart Lung Transplant* 2004 Feb;23(2):178-85.
- (19) Almenar BL. Spanish Heart Transplantation Registry. 20th official report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Heart Failure and Heart Transplantation (1984-2008). *Rev Esp Cardiol* 2009 Nov;62(11):1286-96.
- (20) Mills RM, Naftel DC, Kirklin JK, Van Bakel AB, Jaski BE, Massin EK, et al. Heart transplant rejection with hemodynamic compromise: a multiinstitutional study of the role of endomyocardial cellular infiltrate. *Cardiac Transplant Research Database. J Heart Lung Transplant* 1997 Aug;16(8):813-21.
- (21) Pahl E, Naftel DC, Canter CE, Frazier EA, Kirklin JK, Morrow WR. Death after rejection with severe hemodynamic compromise in pediatric heart transplant recipients: a multi-institutional study. *J Heart Lung Transplant* 2001 Mar;20(3):279-87.
- (22) Gollub SB, Huntrakoon M, Dunn MI. The significance of eosinophils in mild and moderate acute cardiac allograft rejection. *Am J Cardiovasc Pathol* 1990;3(1):21-6.
- (23) McAllister HA, Jr. Endomyocardial biopsy in the evaluation of conditions leading to cardiac transplantation and in the evaluation of cardiac allograft rejection. *Tex Heart Inst J* 1995;22(1):53-66.

- (24) Cano LC, Arteta AA, Fernandez R, Garcia-Asenjo JA, Hernandez S, Fernandez D, et al. Quilty effect areas are frequently associated with endocardial C4d deposition. *J Heart Lung Transplant* 2008 Jul;27(7):775-9.
- (25) Joshi A. The Quilty Effect: current knowledge and clinical implications. *Transplant Proc* 1998 May;30(3):907-8.
- (26) Pardo-Mindan FJ, Lozano MD. "Quilty effect" in heart transplantation: is it related to acute rejection? *J Heart Lung Transplant* 1991 Nov;10(6):937-41.
- (27) Bacal F, Souza-Neto JD, Fiorelli AI, Mejia J, Marcondes Braga F G, Mangini et al. II Diretriz Brasileira de transplante cardíaco. e16-e64. 2010. Sociedade Brasileira de Cardiologia.
- (28) Wilasrusmee C, Da SM, Shah G, Kittur S, Ondocin P, Siddiqui J, et al. The effect of allo-injury in an in vitro model of allograft microvasculature. *Transpl Int* 2004 Jun;17(5):247-55.
- (29) Nিকেলেইট V, Vamvakas EC, Pascual M, Poletti BJ, Colvin RB. The prognostic significance of specific arterial lesions in acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998 Jul;9(7):1301-8.
- (30) Fyfe B, Loh E, Winters GL, Couper GS, Kartashov AI, Schoen FJ. Heart transplantation-associated perioperative ischemic myocardial injury. Morphological features and clinical significance. *Circulation* 1996 Mar 15;93(6):1133-40.
- (31) Taylor D.O., Edwards L.B., Aurora P, Christie J.D., Dobbles F, Kucheryavaya A.Y., et al. **Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-fifth Official Adult Heart Transplant Report—2008.** *J Heart Lung Transplant*. 943-956. 2010.
- (32) Chantranuwat C, Blakey JD, Kobashigawa JA, Moriguchi JD, Laks H, Vassilakis ME, et al. Sudden, unexpected death in cardiac transplant recipients: an autopsy study. *J Heart Lung Transplant* 2004 Jun;23(6):683-9.
- (33) Patel JK, Kobashigawa JA. Should we be doing routine biopsy after heart transplantation in a new era of anti-rejection? *Curr Opin Cardiol* 2006 Mar;21(2):127-31.
- (34) White JA, Guiraudon C, Pflugfelder PW, Kostuk WJ. Routine surveillance myocardial biopsies are unnecessary beyond one year after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1995 Nov;14(6 Pt 1):1052-6.
- (35) Veiga BA, Crespo LM, Domenech GN, Paniagua MJ, Vazquez ME, Gonzalez CM, et al. Severe cardiac allograft dysfunction without endomyocardial biopsy signs of cellular rejection: incidence and management. *Transplant Proc* 2004 Apr;36(3):778-9.

- (36) Hammond EH, Yowell RL, Nunoda S, Menlove RL, Renlund DG, Bristow MR, et al. Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications. *J Heart Transplant* 1989 Nov;8(6):430-43.
- (37) Hammond ME, Stehlik J, Snow G, Renlund DG, Seaman J, Dabbas B, et al. Utility of histologic parameters in screening for antibody-mediated rejection of the cardiac allograft: a study of 3,170 biopsies. *J Heart Lung Transplant* 2005 Dec;24(12):2015-21.
- (38) Trivedi HL. Immunobiology of rejection and adaptation. *Transplant Proc* 2007 Apr;39(3):647-52.
- (39) George JF, Kirklin JK, Young JB, McGiffin DC. Immunology in relation to cardiac transplantation. Kirklin JK, Young JB, McGiffin DC, editors. *Heart transplantation*. 14-51. 2002.
- (40) Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med* 1991 Apr 18;324(16):1110-8.
- (41) Gerbase -Delima M., Campos E.F., Musatti C.C. Sistema Imune. Garcia V.D., Abud Filho M, Neumann J, Pestana J.O.M., editors. *Transplante de órgãos e tecidos*. 2a. edição, 197-215. 2006. São Paulo, Segmento farma editores.
- (42) Forbes RD, Guttman RD, Gomersall M, Hibberd J. A controlled serial ultrastructural tracer study of first-set cardiac allograft rejection in the rat. Evidence that the microvascular endothelium is the primary target of graft destruction. *Am J Pathol* 1983 May;111(2):184-96.
- (43) Cunningham KS, Veinot JP, Butany J. An approach to endomyocardial biopsy interpretation. *J Clin Pathol* 2006 Feb;59(2):121-9.
- (44) Tan CD, Baldwin WM, III, Rodriguez ER. Update on cardiac transplantation pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2007 Aug;131(8):1169-91.
- (45) Stehlik J, Starling RC, Movsesian MA, Fang JC, Brown RN, Hess ML, et al. Utility of long-term surveillance endomyocardial biopsy: a multi-institutional analysis. *J Heart Lung Transplant* 2006 Dec;25(12):1402-9.
- (46) 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 May;20(5):497-502.
- (47) Kirklin JK. Is biopsy-proven cellular rejection an important clinical consideration in heart transplantation? *Curr Opin Cardiol* 2005 Mar;20(2):127-31.
- (48) Nair V, Butany J. Heart transplant biopsies: interpretation and significance. *J Clin Pathol* 2010 Jan;63(1):12-20.

- (49) Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2007 Nov 6;50(19):1914-31.
- (50) Herskowitz A, Soule LM, Mellits ED, Traill TA, Achuff SC, Reitz BA, et al. Histologic predictors of acute cardiac rejection in human endomyocardial biopsies: a multivariate analysis. *J Am Coll Cardiol* 1987 Apr;9(4):802-10.
- (51) Marboe CC, Billingham ME, Eisen HJ, Deng M C, Baron H, Mehra M, et al. Nodular endocardial infiltrates (Quilty Lesions) cause significant variability of ISLHT grade 2 and 3A rejection in cardiac allograft recipients. *J Heart Lung Transplant*. 24, s219-s226. 2010.
- (52) Smith RN, Chang Y, Houser S, Dec GW, Grazette L. Higher frequency of high-grade rejections in cardiac allograft patients after Quilty B lesions or grade 2/4 rejections. *Transplantation* 2002 Jun 27;73(12):1928-32.
- (53) Brunner-La Rocca HP, Sutsch G, Schneider J, Follath F, Kiowski W. Natural course of moderate cardiac allograft rejection (International Society for Heart Transplantation grade 2) early and late after transplantation. *Circulation* 1996 Sep 15;94(6):1334-8.
- (54) de Souza MM, Franco M, Almeida DR, Diniz RV, Mortara RA, da SS, et al. Comparative histopathology of endomyocardial biopsies in chagasic and non-chagasic heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2001 May;20(5):534-43.
- (55) Chu KE, Ho EK, de la Torre L, Vasilescu ER, Marboe CC. The relationship of nodular endocardial infiltrates (Quilty lesions) to survival, patient age, anti-HLA antibodies, and coronary artery disease following heart transplantation. *Cardiovasc Pathol* 2005 Jul;14(4):219-24.
- (56) Gopal S, Narasimhan U, Day JD, Gao R, Kasper EK, Chen CL, et al. The Quilty lesion enigma: focal apoptosis/necrosis and lymphocyte subsets in human cardiac allografts. *Pathol Int* 1998 Mar;48(3):191-8.
- (57) Freimark D, Czer LS, Aleksic I, Ruan XM, Admon D, Blanche C, et al. Pathogenesis of Quilty lesion in cardiac allografts: relationship to reduced endocardial cyclosporine A. *J Heart Lung Transplant* 1995 Nov;14(6 Pt 1):1197-203.
- (58) Suit PF, Kottke-Marchant K, Ratliff NB, Pippenger CE, Easley K. Comparison of whole-blood cyclosporine levels and the frequency of endomyocardial lymphocytic infiltrates (the Quilty lesion) in cardiac transplantation. *Transplantation* 1989 Oct;48(4):618-21.

(59) Sibley R.K., Olivari M.T., Bolman R .M., Ring W.S. Endomyocardial biopsy in cardiac allograft recipient. A review of 570 biopsies. *Ann Surg* 203[2], 177-187. 2010.

(60) Pomerance A., Stovin PGI. Heart Transplant pathology: The British experience. *J.Clin.Pathol.* 38, 146-159. 10-1-1984.

Ref Type: Generic

(61) Gokel J.M., Reichart B., Struck E. Human cardiac transplantation- Evaluation Morphological Changes in serial endomyocardial biopsies. *Pathol.Res.Pract.* 178, 354-364. 1985.

(62) Forbes RD, Rowan RA, Billingham ME. Endocardial infiltrates in human heart transplants: a serial biopsy analysis comparing four immunosuppression protocols. *Hum Pathol* 1990 Aug;21(8):850-5.

(63) Tazelaar HD. Spectrum and diagnosis of myocardial rejection. *Cardiol.Rev.* 8[1], 119-139. 2010.

Ref Type: Generic

(64) Barone J.H., Fishbein MC, Czer LS, Blanche C, Trento A, Luthringer D.J. Absence of endocardial lymphoid infiltrates (Quilty lesions) in nonheart transplant recipient treated with cyclosporine. *J.Heart Lung Transplant.* 16[6], 600-603. 1997.

(65) Stovin PG, al-Tikriti SA. The correlation of various features of rejection in myocardial biopsies after human heart transplantation. *Pathol Res Pract* 1989 Dec;185(6):836-42.

(66) Costanzo-Nordin MR, Winters GL, Fisher SG, O'Sullivan J, Heroux AL, Kao W, et al. Endocardial infiltrates in the transplanted heart: clinical significance emerging from the analysis of 5026 endomyocardial biopsy specimens. *J Heart Lung Transplant* 1993 Sep;12(5):741-7.

(67) Plaza DM, Fernandez D, Builes M, Villegas A, Garcia LF. Cytokine gene polymorphisms in heart transplantation: association of low IL-10 production genotype with Quilty effect. *J Heart Lung Transplant* 2003 Aug;22(8):851-6.

(68) Yamani MH, Ratliff NB, Starling RC, Tuzcu EM, Yu Y, Cook DJ, et al. Quilty lesion are associated with increased expression of vitronectin receptor( $\alpha v \beta 3$ ) and subsequent development of coronary vasculopathy. *J.Heart Lung Transplant.* 22[6], 687-690. 8-11-2003.

(69) Zakliczynski M, Nozynski J, Konecka-Mrowka D, Pyka L, Trybunia D, Swierad M, et al. Quilty effect correlates with biopsy-proven acute cellular rejection but does not predict transplanted heart coronary artery vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2009 Mar;28(3):255-9.

- (70) Hiemann NE, Knosalla C, Wellnhofer E, Lehmkuhl HB, Hetzer R, Meyer R. Quilty indicates increased risk for microvasculopathy and poor survival after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2008 Mar;27(3):289-96.
- (71) Hiemann NE, Knosalla C, Wellnhofer E, Lehmkuhl HB, Hetzer R, Meyer R. Quilty in biopsy is associated with poor prognosis after heart transplantation. *Transpl Immunol* 2008 Jul;19(3-4):209-14.
- (72) Davies D.J. Small vessel vasculitis. *Cardiovasc.Pathol.* 14, 335-346. 13-7-2005.
- (73) Herskowitz A, Soule LM, Ueda K, Tamura F, Baumgartner WA, Borkon AM, et al. Arteriolar vasculitis on endomyocardial biopsy: a histologic predictor of poor outcome in cyclosporine-treated heart transplant recipients. *J Heart Transplant* 1987 May;6(3):127-36.
- (74) Kemnitz J, Cohnert T, Haverich A, Choritz H, Borchert A. [Critical moments in the formal pathogenesis of the rejection reaction in the orthotopic heart transplant with prognostic significance]. *Pathologe* 1988 May;9(3):164-71.
- (75) Smith SH, Kirklin JK, Geer JC, Caulfield JB, McGiffin DC. Arteritis in cardiac rejection after transplantation. *Am J Cardiol* 1987 May 1;59(12):1171-3.
- (76) Ballester M, Obrador D, Carrio I, Bordes R, Auge JM, Crexells C, et al. Reversal of rejection-induced coronary vasculitis detected early after heart transplantation with increased immunosuppression. *J Heart Transplant* 1989 Sep;8(5):413-7.
- (77) Bocchi EA, Higuchi ML, Bellotti G, Kowabota VS, Assis RV, Stolf N, et al. Acute myocardial infarction with diffuse endarteritis, contraction bands, and distal thrombosis of the coronary arteries in a heart transplant patient. *J Heart Lung Transplant* 1992 Jan;11(1 Pt 1):31-6.
- (78) Herskowitz A, Tamura F, Ueda K, Neumann DA, Slepian M, Rose NR, et al. Induction of donor major histocompatibility complex antigens in coronary arterial vessels: mechanism of arterial vasculitis in rat allografts treated with cyclosporine. *J Heart Transplant* 1989 Jan;8(1):11-9.
- (79) Steinbruchel DA, Nielsen B, Salomon S, Kemp E. Sequential, morphological, and antidonor antibody analysis in a hamster-to-rat heart transplantation model. *Transpl Int* 1992 Mar;5(1):38-42.
- (80) Guillevin L, Dorner T. Vasculitis: mechanisms involved and clinical manifestations. *Arthritis Res Ther* 2007;9 Suppl 2:S9.
- (81) Pagnoux C, Guillevin L. Cardiac involvement in small and medium-sized vessel vasculitides. *Lupus* 2005;14(9):718-22.
- (82) Fernandes S R. Síndromes vasculíticas- classificação, patogênese e abordagem diagnóstica. *Tratado de clínica médica* 1[1], 1638-1641. 2010. São Paulo, Antônio Carlos lopes.

- (83) Somer T. Thrombo-embolic and vascular complications in vasculitis syndromes. *Eur Heart J* 1993 Dec;14 Suppl K:24-9.
- (84) Foerster A. Vascular rejection in cardiac transplantation. A morphological study of 25 human cardiac allografts. *APMIS* 100[4], 367-376. 21-10-1992.
- (85) Higuchi ML, Benvenuti LA, Demarchi LM, Libby P. Histological evidence of concomitant intramyocardial and epicardial vasculitis in necropsied heart allografts: a possible relationship with graft coronary arteriosclerosis. *Transplantation* 1999 Jun 27;67(12):1569-76.
- (86) Haas M, Kraus ES, Samaniego-Picota M, Racusen LC, Ni W, Eustace JA. Acute renal allograft rejection with intimal arteritis: histologic predictors of response to therapy and graft survival. *Kidney Int* 2002 Apr;61(4):1516-26.
- (87) Bourge RC, Rodriguez ER, Tan CD. Cardiac allograft rejection. Kirklin JK, Young JB, McGiffin DC, editors. *Heart Transplantation* , 464-520. 2002. Philadelphia, Churchill Livingstone. Kirklin, J. K., Young, J. B., and McGiffin, D. C.
- (88) Morel O, Ohlmann P, Epailly E, Bakouboula B, Zobairi F, Jesel L, et al. Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2008 Jan;27(1):38-45.
- (89) Shivalkar B, Van LJ, Wieland W, Tjandra-Maga TB, Borgers M, Plets C, et al. Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circulation* 1993 Jan;87(1):230-9.
- (90) Perez LS, Otero HJ, Vazquez MN, Escudero AD, Alvarez MF, Astudillo GA. Brain death effects on catecholamine levels and subsequent cardiac damage assessed in organ donors. *J Heart Lung Transplant* 2009 Aug;28(8):815-20.
- (91) Yamani MH, Haji SA, Starling RC, Tuzcu EM, Ratliff NB, Cook DJ, et al. Myocardial ischemic-fibrotic injury after human heart transplantation is associated with increased progression of vasculopathy, decreased cellular rejection and poor long-term outcome. *J Am Coll Cardiol* 2002 Mar 20;39(6):970-7.
- (92) Pickering JG, Boughner DR. Fibrosis in the transplanted heart and its relation to donor ischemic time. Assessment with polarized light microscopy and digital image analysis. *Circulation* 1990 Mar;81(3):949-58.
- (93) Labarrere CA, Ortiz MA, Ruzmetov N, Sosa MJ, Campana G, Terry C, et al. Microvascular thrombosis and cardiac allograft vasculopathy in rat heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006 Oct;25(10):1213-22.
- (94) Sartori TM, Maurizio PG, Sara P, Ugolino L, Annalisa A, Panagiotis T, et al. Relation between long-term steroid treatment after heart transplantation, hypofibrinolysis and myocardial microthrombi generation. *J Heart Lung Transplant* 1999 Jul;18(7):693-700.

- (95) Slootweg P.J., Schuurman H.J., Jamboroës G. Myocytolysis as result of vascular rejection: biopsy and autopsy findings- a case report. *J.Heart Transplant.* 8[6], 450-453. 1989.
- (96) Yamani MH, Starling RC, Young JB, Cook D, Yu Y, Vince DG, et al. Acute vascular rejection is associated with up-regulation of vitronectin receptor (alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub>), increased expression of tissue factor, and activation of the extracellular matrix metalloproteinase induction system. *J Heart Lung Transplant* 2002 Sep;21(9):983-9.
- (97) Hook S, Caple JF, McMahon JT, Myles JL, Ratliff NB. Comparison of myocardial cell injury in acute cellular rejection versus acute vascular rejection in cyclosporine-treated heart transplants. *J Heart Lung Transplant* 1995 Mar;14(2):351-8.
- (98) Lozano MD. Microvascular coronary arterial vasculopathy--predictive value of endomyocardial biopsy. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 9:IX/54-IX/57.
- (99) Trull A, Steel L, Cornelissen J, Smith T, Sharples L, Cary N, et al. Association between blood eosinophil counts and acute cardiac and pulmonary allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 1998 May;17(5):517-24.
- (100) Sanchez-Vegazo I, Sanz E, Anaya A. [Pathology of the heart transplant]. *Rev Esp Cardiol* 1995;48 Suppl 7:65-70.
- (101) Hiemann NE, Wellnhofer E, Knosalla C, Lehmkuhl HB, Stein J, Hetzer R, et al. Prognostic impact of microvasculopathy on survival after heart transplantation: evidence from 9713 endomyocardial biopsies. *Circulation* 2007 Sep 11;116(11):1274-82.
- (102) Kfoury AG, Renlund DG, Snow GL, Stehlik J, Folsom JW, Fisher PW, et al. A clinical correlation study of severity of antibody-mediated rejection and cardiovascular mortality in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2009 Jan;28(1):51-7.
- (103) Wang H, Jiang J, Liu W, Kubelik D, Chen G, Gies D, et al. Prevention of acute vascular rejection by a functionally blocking anti-C5 monoclonal antibody combined with cyclosporine. *Transplantation* 2005 May 15;79(9):1121-7.
- (104) Koch A, Burgschweiger A, Herpel E, Sack FU, Schirmacher P, Szabo GB, et al. Inducible NO synthase expression in endomyocardial biopsies after heart transplantation in relation to the postoperative course. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007 Oct;32(4):639-43.
- (105) Book WM, Kelley L, Gravanis MB. Fulminant mixed humoral and cellular rejection in a cardiac transplant recipient: a review of the histologic findings and literature. *J Heart Lung Transplant* 2003 May;22(5):604-7.

