



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Gizella da Cunha Rodrigues Garcia

**Implicações farmacogenéticas na resposta ao tratamento com
Sacubitril/Valsartan ou terapias convencionais em pacientes com
insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida**

Rio de Janeiro

2025

Gizella da Cunha Rodrigues Garcia

Implicações farmacogenéticas na resposta ao tratamento com Sacubitril/Valsartan ou terapias convencionais em pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Mourilhe Rocha

Rio de Janeiro

2025

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R696 Rodrigues, Gizella da Cunha

Implicações farmacogenéticas na resposta ao tratamento com Sacubitril/Valsartan ou terapias convencionais em pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida / Gizella da Cunha Rodrigues. - 2025.

93 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Mourilhe Rocha

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Insuficiência cardíaca sistólica – Tratamento farmacológico. 2. Combinação de medicamentos – Teses. 3. Biomarcadores – Teses. I. Silva, Dayse Aparecida da. II. Rocha, Ricardo Mourilhe. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.12-085

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Gizella da Cunha Rodrigues Garcia

Implicações farmacogenéticas na resposta ao tratamento com Sacubitril/Valsartan ou terapias convencionais em pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 13 de março de 2025.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Mourilhe Rocha
Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ

▪ Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Marcelo Bittencourt Imbroinise
Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ

Prof.^a Dra. Teresa de Souza Fernandez
Instituto Nacional do Câncer

Rio de Janeiro

2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem Ele eu não seria ninguém. Ele quem me concede o fôlego de vida e quem abriu todos os caminhos e oportunidades que me trouxeram até aqui.

Agradeço aos meus orientadores Prof.^a Dr.^a. Dayse Aparecida da Silva e Dr. Ricardo Mourilhe Rocha, pelo papel fundamental na elaboração desse trabalho e pelo apoio excepcional.

Aos meus valiosos e muito amados pais Sueli Maria da Cunha Rodrigues e José Carlos Russo Rodrigues, que sempre me apoiaram em cada escolha e momento de conflito, eu também dedico todo a minha gratidão.

De igual modo dedico meu agradecimento ao meu amado marido Bruno Pereira Garcia, por ter estado sempre ao meu lado, com muito carinho e compreensão e à minha preciosa filha, Elisa, por ser a minha força diária e o meu maior motivo para continuar.

De igual modo, gostaria de dedicar minha gratidão à equipe excepcional do Laboratório de Diagnóstico por DNA da UERJ e do ambulatório de Insuficiência cardíaca do Hospital Universitário Pedro Ernesto que já me ajudaram direta ou indiretamente durante esse período.

Por fim, também gostaria de demonstrar minha gratidão ao Programa de Pós-graduação em Biociências da UERJ pela oportunidade de doutoramento e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro que me proporcionou a possibilidade de concluir os meus estudos.

Muito obrigada a todos que contribuíram para minha formação.

RESUMO

RODRIGUES, Gizella da Cunha. **Implicações farmacogenéticas na resposta ao tratamento com Sacubitril/Valsartan ou terapias convencionais em pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida.** 93 f. 2025. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

A insuficiência cardíaca (IC) é uma doença crônica e multifatorial que acomete milhões de pessoas em todo o mundo, representando um dos principais desafios à saúde pública global. A IC é classificada em quatro grupos principais: IC com fração de ejeção reduzida (IC-FEr), IC com FE ligeiramente reduzida (IC-FElr), IC com FE preservada (IC-FEp) e IC com FE melhorada (IC-FEm). Este estudo buscou investigar as bases genéticas das respostas farmacoterapêuticas ao Sacubitril/Valsartan em pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida (IC-FEr). Participaram do estudo 65 pacientes acompanhados do Serviço de Cardiologia do HUPE-UERJ, com idade entre 40 e 89 anos. Os dados clínicos e demográficos foram obtidos nos prontuários médicos. As amostras biológicas de 22 pacientes foram coletadas para a realização de análises transcriptômicas utilizando RNA-Seq, com o objetivo de identificar biomarcadores associados à eficácia do Sacubitril/Valsartan em comparação com terapias convencionais, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e bloqueadores dos receptores de angiotensina II (BRA). A análise envolveu a determinação de perfis de expressão gênica diferencial, o que permitiu a investigação das vias biológicas enriquecidas, contribuindo para a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à resposta ao tratamento. Também foram considerados outros grupos de medicamentos, a fim de eliminar possíveis interações farmacológicas que pudessem influenciar os resultados obtidos. A ancestralidade genômica dos 65 pacientes foi determinada com o uso de 46 marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) para a avaliação do perfil ancestral da amostra, corrigindo possíveis vieses que poderiam afetar a interpretação dos dados. Os resultados demonstraram diferenças significativas na expressão de genes envolvidos em processos de sinalização e regulação da tradução proteica, especialmente em vias como formação de redes extracelulares de neutrófilos, síntese de selenocisteína e resposta à deficiência de aminoácidos. Além disso, a análise de ancestralidade indicou homogeneidade entre os grupos em relação às proporções de ancestralidade europeia, africana e nativo-americana, eliminando potenciais vieses de subestrutura populacional. Conclui-se que o Sacubitril/Valsartan promove mudanças moleculares específicas, correlacionadas com um perfil de melhora clínica superior em pacientes com IC-Fer tratados com este medicamento, quando comparados àqueles tratados com iECA ou BRAs. Sugere-se a validação futura dos biomarcadores identificados para o avanço da medicina personalizada em insuficiência cardíaca.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca; farmacogenômica; Sacubitril/Valsartan; transcriptoma; RNAseq; ancestralidade genômica.

ABSTRACT

RODRIGUES, Gizella da Cunha. **Pharmacogenetic implications in the response to treatment with Sacubitril/Valsartan or conventional therapies in patients with heart failure with reduced ejection fraction.** 93 f. 2025. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Heart failure (HF) is a chronic and multifactorial disease that affects millions of people worldwide, representing one of the main challenges to global public health. HF is classified into four main groups: HF with reduced ejection fraction (HFrEF), HF with mildly reduced ejection fraction (HFmrEF), HF with preserved ejection fraction (HFpEF), and HF with improved ejection fraction (HFief). This study aimed to investigate the genetic basis of pharmacotherapeutic responses to Sacubitril/Valsartan in patients with heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF). A total of 65 patients, aged between 40 and 89 years, were included in the study and followed at the Cardiology Service of HUPE-UERJ. Clinical and demographic data were obtained from medical records. Biological samples from 22 patients were collected for transcriptomic analyses using RNA-Seq to identify biomarkers associated with the efficacy of Sacubitril/Valsartan compared to conventional therapies, such as angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) and angiotensin II receptor blockers (ARBs). The analysis involved determining differential gene expression profiles, enabling the investigation of enriched biological pathways and contributing to the understanding of the molecular mechanisms related to treatment response. Other medication groups were also considered to rule out potential pharmacological interactions that could influence the results. The genomic ancestry of the 65 patients was determined using 46 ancestry-informative markers (AIMs) to assess the ancestral profile of the sample, correcting for potential biases that could affect data interpretation. The results demonstrated significant differences in the expression of genes involved in signaling processes and protein translation regulation, particularly in pathways such as neutrophil extracellular trap formation, selenocysteine synthesis, and response to amino acid deficiency. Additionally, ancestry analysis indicated homogeneity among the groups regarding the proportions of European, African, and Native American ancestry, eliminating potential biases due to population substructure. It was concluded that Sacubitril/Valsartan promotes specific molecular changes correlated with a superior clinical improvement profile in HFrEF patients treated with this drug compared to those treated with ACEIs or ARBs. Future validation of the identified biomarkers is suggested to advance personalized medicine in heart failure treatment.

Keywords: Heart failure; pharmacogenomics; Sacubitril/Valsartan; transcriptome; RNA-Seq; genomic ancestry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Mecanismo de ação da neprilisina e dos peptídeos natriuréticos, em paralelo com o sistema renina-angiotensina (e receptor AT1).....	18
Figura 2:	Mecanismo de ação farmacológica do LCZ696.....	22
Figura 3:	Fluxograma das análises de bioinformática.....	36
Figura 4:	Gráfico de componentes principais dos grupos E (Sacubitril/Valsartan) e C (Controle).....	47
Figura 5:	VolcanoPlot dos 75 genes diferencialmente expressos entre os grupos, incluindo os super e subexpressos.....	48
Figura 6:	Processos biológicos associados aos genes diferencialmente expressos, anotados por nível de significância.....	52
Figura 7:	Componentes celulares associados aos genes diferencialmente expressos, anotados por nível de significância	55
Figura 8:	Análise de Enriquecimento de vias do banco de dados KEGG.....	58
Figura 9:	Análise de Enriquecimento de vias do banco de dados Reactome.....	61
Figura 10:	Perfil de ancestralidade dos grupos S/V e controle.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Informações sobre os genes e implicações clínicas de polimorfismos presentes nos mesmos.....	24
Tabela 2:	<i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos AIM-InDels.....	42
Tabela 3:	Dados demográficos e clínicos dos pacientes.....	45
Tabela 4:	Grupos de genes diferencialmente expressos classificados quanto ao nível de expressão.....	49
Tabela 5:	Análise de enriquecimento funcional de processos biológicos identificados.....	51
Tabela 6:	Análise de enriquecimento funcional de componentes celulares identificados.....	54
Tabela 7:	Análise de enriquecimento funcional de componentes celulares identificadas.....	56
Tabela 8:	Análise de enriquecimento de vias do banco de dados KEGG.....	58
Tabela 9:	Análise de enriquecimento de vias do Reactome.....	60
Tabela 10:	Perfil de ancestralidade dos grupos S/V e controle.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM	<i>AncestryInformativeMarker</i> - Marcador informativo de ancestralidade
ANP	<i>A-typenatriureticpeptides</i> - Peptídeos natriuréticos tipo A
AHU377	Nome do composto original do Sacubitril
ARNIs	Inibidores do receptor de angiotensina-neprilisina
AT1	<i>Angiotensin II type 1 receptor</i> – Receptor de angiotensina II tipo 1
BNP	<i>B-typenatriureticpeptide</i> – Peptídeos natriuréticos tipo B
BRA	Antagonistas de receptores de angiotensina II
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNP	<i>C-typenatriureticpeptide</i> – Peptídeos natriuréticos tipo C
CYP4A11	<i>Cytochrome p450 family 4 subfamily a member 11</i> – gene codificante do Citocromo P450 família 4 subfamília A membro 11.
DAC	Doença arterial coronariana
DEGs	<i>Differential expressed genes</i> – genes diferencialmente expressos
DNA	<i>Desoxyribonucleicacid</i> - Ácido desoxirribonucleico
EIF2AK4	<i>Eucaryotic translation initiation factor2 alpha kinase 4</i>
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
FE	Fração de ejeção
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i> – Estudo de associação genômica ampla
IC	Insuficiência cardíaca
ICFEr	Insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida
iECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina

InDel	Polimorfismo de inserção / deleção
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> – Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas
LBQ657	Forma ativa do sacubitril
LCZ696	Nome do complexo Scubitril/Valsartan
miRNA	MicroRNA
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucleico mensageiro
NGS	<i>Next-Generation sequencing</i> – Sequenciamento de nova geração
NEP	Neprisilina
<i>NPPA</i>	<i>Natriuretic peptide precursor A gene</i> – gene codificante do precursor do peptídeo natriurético tipo A
<i>NPPB</i>	<i>Natriuretic peptide precursor B gene</i> – gene codificante do precursor do peptídeo natriurético tipo B
<i>NPR1</i>	<i>Natriuretic peptide receptor 1</i> – gene codificante do receptor do tipo 1 de peptídeos natriuréticos
<i>NR3C2</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 3 group C member 2</i> – gene que codifica o Receptor nuclear subfamília 3 grupo C membro 2.
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucleico
RNA-seq	<i>Ribonucleic acid sequencing</i> – Sequenciamento de RNA
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SRP	<i>Signal recognition particle</i> – Partícula de reconhecimento de sinal
TRIZol	<i>Tri-reagent</i> – tri-reagente
U7 snRNP	<i>U7 small nuclear ribonucleoprotein</i> – ribonucleoproteína pequena nuclear
SRP	<i>Signal recognition particle</i> – Partícula de reconhecimento de sinal

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
\geq	Maior ou igual a
\leq	Menor ou igual a
mL	Mililitro
G	Força relativa de campo gravitacional
μ L	Microlitro
mg	Miligrama
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
M	Molar
μ g	Micrograma
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
pb	Pares de base
<i>p</i>	“p” valor
\pm	Mais ou menos
=	Igual a

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 OBJETIVOS	29
1.1 Objetivo geral.....	29
1.2 Objetivos específicos	29
2 MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1 Considerações éticas.....	30
2.2 Amostras e características dos grupos selecionados.....	30
2.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	31
2.4 Coleta de material biológico e extração de DNA e RNA.....	31
2.5 Controle de qualidade das amostras de RNA.....	33
2.6 Construção das bibliotecas de cDNA.....	34
2.7 Sequenciamento.....	34
2.8 Bioinformática.....	35
2.9 Controle de qualidade das leituras de sequenciamento.....	36
2.10 Alinhamento das leituras contra o genoma de referência.....	38
2.11 Quantificação dos transcritos.....	38
2.12 Análise funcional dos genes diferencialmente expressos.....	39
2.13 Análises de enriquecimento.....	39
2.14 Análise de marcadores de ancestralidade de inserção/deleção (indels).....	40
2.15 Análises estatísticas para verificar a homogeneidade das amostras.....	43
3. RESULTADOS	44
3.1 Análises demográficas e clínicas dos pacientes.....	44
3.2 Análise de Componentes Principais.....	46
3.3 Análise de expressão diferencial.....	48
3.4 Análise de enriquecimento funcional de processos biológicos pelo banco de dados Gene Ontology.....	50
3.5 Análise de enriquecimento funcional de componentes celulares pelo banco de dados Gene Ontology.....	53
3.6 Análise de enriquecimento funcional de funções moleculares pelo banco de dados Gene Ontology.....	56
3.7 Análise de enriquecimento funcional de processos biológicos pelo banco de dados KEGG	57
3.8 Análise de enriquecimento funcional de vias de Reactome.....	59

3.9 Identificação dos perfis de AIMS-InDels.....	62
4. DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto.....	90
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	92

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma doença crônica e multifatorial que acomete milhões de pessoas em todo o mundo, representando um dos principais desafios à saúde pública global. Caracteriza-se por disfunções na capacidade do coração de bombear sangue de forma eficaz para atender às demandas metabólicas do organismo. Essa disfunção, geralmente associada à redução da fração de ejeção ventricular esquerda, é acompanhada por alterações estruturais e funcionais que comprometem a qualidade de vida dos pacientes e aumentam substancialmente o risco de mortalidade (MANN *et al.*, 2014). Segundo Wielenga *et al.* (1997), a IC é um dos diagnósticos mais frequentes em unidades de emergência e hospitalizações, destacando-se como um problema crônico e progressivo que exige atenção terapêutica multidisciplinar.

O impacto epidemiológico da IC é notável. Dados recentes revelam que, entre 2008 e 2017, ocorreram 2.380.133 hospitalizações com diagnóstico de IC no Brasil, sendo responsável por 2,25% de todas as causas de internação durante esse período. Além disso, a prevalência da IC aumenta significativamente com a idade, afetando até 10% das pessoas acima de 70 anos, o que reflete o impacto do envelhecimento populacional na carga da doença. Em termos de mortalidade, as doenças cardiovasculares, incluindo a IC, continuam sendo a principal causa de óbito no país. De acordo com dados do Ministério da Saúde, aproximadamente 400 mil pessoas morreram em 2022 no Brasil, devido a problemas cardiovasculares. Por fim, fatores de risco como hipertensão arterial, diabetes mellitus e doenças coronarianas contribuem para o desenvolvimento e a progressão da IC, tornando a prevenção e o manejo dessas condições essenciais para reduzir sua incidência (BRASIL, 2023; FERNANDES *et al.*, 2020).

Principais etiologias relacionadas à IC

A IC é uma síndrome clínica complexa com etiologias multifatoriais que incluem doenças do miocárdio, valvulopatias, hipertensão arterial e doenças congênitas. Essa

complexidade é amplificada pela interação de fatores genéticos e ambientais que influenciam sua fisiopatologia e manifestações clínicas. Em função disso, a definição de IC evoluiu ao longo do tempo, com as classificações mais recentes baseando-se na fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo. Conforme as Diretrizes Brasileiras para Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida (2020) e Bozkurt *et al.* (2021), a IC é classificada em quatro grupos principais:

- IC com fração de ejeção reduzida (IC-FEr): $FE \leq 40\%$;
- IC com FE ligeiramente reduzida (IC-FElr): FE entre 41-49%;
- IC com FE preservada (IC-FEp): $FE \geq 50\%$;
- IC com FE melhorada (IC-FEm): casos nos quais a FE basal de 40% apresenta um aumento de 10 pontos após tratamento.

Essa classificação reflete não apenas a diversidade das manifestações clínicas, mas também as diferentes abordagens terapêuticas necessárias para cada grupo. Por exemplo, pacientes com IC-FEr apresentam maior benefício com terapias farmacológicas que modulam o sistema renina-angiotensina-aldosterona, enquanto os pacientes com IC-FEp frequentemente requerem intervenções voltadas para o controle de comorbidades subjacentes (STUMPF; ALMEIDA, 2023)

Principais classes medicamentosas usadas no tratamento da IC

O tratamento da IC tem evoluído significativamente nas últimas décadas, com o desenvolvimento de terapias farmacológicas que não apenas aliviam os sintomas, mas também melhoram a sobrevida dos pacientes. De acordo com a *American Heart Association* (2021), as principais classes de medicamentos empregadas no manejo da IC incluem:

- Inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA);
- Inibidores do receptor da angiotensina II;
- Inibidores do receptor da angiotensina-neprilisina;
- Betabloqueadores;
- Antagonistas da aldosterona;

- Diuréticos tiazídicos;
- Diuréticos de alça
- Inibidores do co-transportador de sódio-glicose 2 (SGLT2).

Dentre essas classes, merecem destaque os inibidores do receptor de angiotensina-neprilisina (ARNIs), representados pelo Sacubitril/Valsartan. Estudos clínicos como o PARADIGM-HF demonstraram que essa classe proporciona reduções significativas na mortalidade e nas hospitalizações em comparação com os inibidores da ECA tradicionais, como o enalapril (MCMURRAY *et al.*, 2014; GUHA *et al.*, 2016). Essa superioridade terapêutica está relacionada ao duplo mecanismo de ação do Sacubitril/Valsartan, que combina o bloqueio dos efeitos deletérios da angiotensina II com a potencialização dos benefícios dos peptídeos natriuréticos.

A relevância dos ARNIs na prática clínica também está associada à sua capacidade de promover a remodelação cardíaca positiva, reduzindo a sobrecarga hemodinâmica e melhorando a função ventricular. Além disso, avanços na farmacogenética têm permitido identificar fatores genéticos que influenciam a resposta às terapias com ARNIs, contribuindo para a personalização do tratamento e a otimização dos resultados clínicos (POZZI *et al.*, 2023).

O papel da neprililina e dos peptídeos natriuréticos atriais no desenvolvimento da IC

O papel da neprililina e dos peptídeos natriuréticos atriais no desenvolvimento da IC é uma área de estudo que ilustra a complexidade das interações entre sistemas reguladores do organismo, como o sistema de peptídeos natriuréticos (NP) e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Esses sistemas desempenham funções cruciais na regulação da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrólítico, tanto em condições fisiológicas normais quanto em cenários patológicos, como a IC (BAYES-GENIS *et al.*, 2016; SILVA E AGUIAR, 2017).

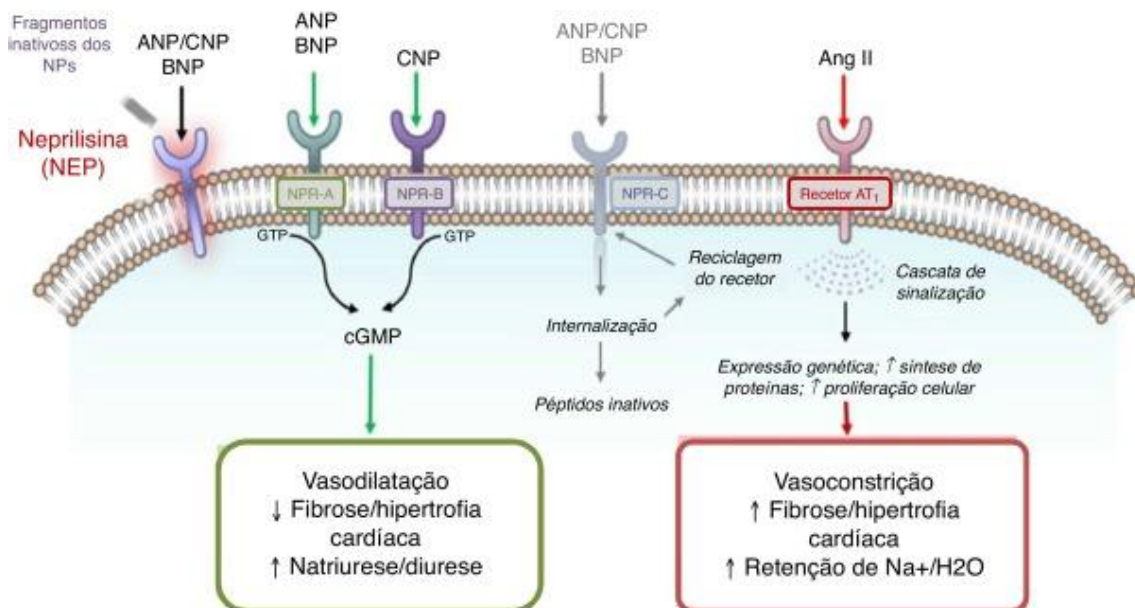
A compreensão detalhada dessas interações resultou em avanços significativos no tratamento da IC, com destaque para o desenvolvimento e a introdução do Sacubitril/Valsartan, um fármaco inovador que combina um inibidor da neprililina (Sacubitril) com um antagonista do receptor de angiotensina II (Valsartan). Esse

medicamento representa uma aplicação prática do conhecimento acumulado sobre o papel desses sistemas na fisiopatologia da IC.

A neprilisina (NEP) é uma enzima chave responsável pela degradação de vários peptídeos, incluindo os peptídeos natriuréticos atrial (ANP), cerebral (BNP) e do tipo C (CNP). Esses peptídeos desempenham funções essenciais na promoção da vasodilatação, redução da sobrecarga de sódio e inibição da fibrose cardíaca, contribuindo para efeitos benéficos no sistema cardiovascular. Por outro lado, a neprilisina também participa da degradação de outros substratos, como a angiotensina II (Ang II), cujos efeitos vasoconstritores são contrabalançados pelas ações vasodilatadoras dos peptídeos natriuréticos (BAYES-GENIS *et al.*, 2016; SILVA; AGUIAR, 2017).

A Figura 1 ilustra de forma detalhada os mecanismos de sinalização dos peptídeos natriuréticos (ANP, BNP e CNP) e do sistema da angiotensina II, destacando as vias envolvidas na vasodilatação e vasoconstrição e os respectivos impactos no sistema cardiovascular. Essa interação complexa entre os sistemas evidencia a importância de intervenções terapêuticas que aperfeiçoem os efeitos benéficos dos peptídeos natriuréticos enquanto minimizam os efeitos deletérios do RAAS, oferecendo uma abordagem mais eficaz para o manejo da IC.

Figura 1: Mecanismo de ação da neprilisina e dos peptídeos natriuréticos, em paralelo com o sistema renina-angiotensina (e receptor AT1)



Fonte: Bayes-Genis *et al* (2016).

Legenda: Os peptídeos natriuréticos ativam os receptores NPR-A e NPR-B, estimulando a produção de cGMP, o que resulta em vasodilatação, inibição da fibrose/hipertrofia cardíaca e aumento da natriurese/diurese. O receptor NPR-C promove a internalização e degradação dos peptídeos. A neprilisina (NEP) também contribui para sua degradação. Em contrapartida, a Ang II ativa o receptor AT₁, desencadeando vasoconstrição, aumento da fibrose/hipertrofia cardíaca e retenção de sódio e água, favorecendo a progressão da IC (adaptado de SILVA; AGUIAR, 2017).

Os peptídeos natriuréticos (ANP, BNP e CNP) possuem funções semelhantes, mas são produzidos e atuam em diferentes locais do corpo. O ANP (Peptídeo Natriurético Atrial) é produzido principalmente nos átrios cardíacos, em resposta ao estiramento das paredes atriais. O ANP promove vasodilatação, aumento da natriurese (eliminação de sódio) e diurese, reduzindo o volume sanguíneo e a pressão arterial. Ele atua principalmente nos rins, vasos sanguíneos e glândulas adrenais, exercendo como efeito geral a redução da sobrecarga cardíaca. O BNP (Peptídeo Natriurético do Tipo B), por sua vez, é produzido principalmente nos ventrículos cardíacos e secretado quando há aumento na pressão ou volume ventricular. Sua ação é semelhante ao ANP, exercendo um papel crucial na redução da pressão e do volume sanguíneo, além de ajudar no manejo da IC. O Peptídeo Natriurético do Tipo C (CNP), por fim, é produzido principalmente nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, embora possa ser encontrado em vários outros

tecidos. Sua ação é voltada para a vasodilatação e proteção vascular, não possuindo efeitos diuréticos e natriuréticos tão pronunciados quanto o ANP e o BNP (BAYES-GENIS *et al.*, 2016; SILVA E AGUIAR, 2017).

Mecanismo de ação detalhado do Sacubitril/Valsartan

O Sacubitril/Valsartan é um medicamento desenvolvido especificamente para o tratamento da IC, representando uma abordagem inovadora e eficaz. Essa formulação combina duas substâncias ativas: o pró-fármaco Sacubitril (também conhecido como AHU377) e o Valsartan, em uma proporção molecular de 1:1, formando um complexo supramolecular de sal de sódio. Cada componente tem um mecanismo de ação complementar que aborda diferentes aspectos da fisiopatologia da IC (MCCORMACK, 2016).

Componente Sacubitril e Inibição da Neprilisina (NEP)

O Sacubitril, após ser metabolizado em sua forma ativa (LBQ657), exerce seu efeito principal através da inibição da neprilisina (NEP), uma enzima endopeptidase responsável pela degradação de peptídeos bioativos, incluindo os peptídeos natriuréticos atrial (ANP), cerebral (BNP), e do tipo C (CNP), além de outros substratos como bradicinina e adrenomedulina (MCCORMACK, 2016).

Segundo McCormack (2016), a inibição da neprilisina pelo Sacubitril leva ao aumento das concentrações circulantes desses peptídeos, amplificando seus efeitos benéficos no sistema cardiovascular, como:

- Vasodilatação: Redução da resistência vascular periférica;
- Natriurese e diurese: Aumento da excreção de sódio e água pelos rins, aliviando a sobrecarga de volume;
- Redução da pressão arterial: Alívio da carga sobre o coração;
- Diminuição do tônus simpático: Atuação nos centros neurais que regulam a resposta cardiovascular;
- Prevenção da fibrose e remodelação cardíaca: Proteção contra alterações estruturais prejudiciais ao miocárdio.

Componente Valsartan e Bloqueio do Sistema Renina-Angiotensina

De acordo com Webb e Gasparo (2001), o Valsartan é um bloqueador seletivo do receptor AT1 da angiotensina II, antagonizando diretamente os efeitos dessa molécula no sistema cardiovascular. A angiotensina II é um potente vasoconstritor e desempenha papel central na fisiopatologia da IC ao promover:

- Vasoconstrição: Aumento da pressão arterial e sobrecarga cardíaca;
- Retenção de sódio e água: Estímulo à liberação de aldosterona;
- Fibrose e hipertrofia ventricular: Contribuindo para o remodelamento adverso do coração.

Ao bloquear o receptor AT1, o Valsartan:

- Reduz a vasoconstrição, diminuindo a pós-carga.
- Inibe a secreção de aldosterona, favorecendo a natriurese.
- Previne a progressão da fibrose e hipertrofia ventricular.
- Sinergia entre Sacubitril e Valsartan

O Sacubitril/Valsartan combina a ação do Sacubitril no sistema de peptídeos natriuréticos com o bloqueio dos efeitos deletérios do sistema renina-angiotensina pelo Valsartan. De acordo com Beck-da-silva *et al.* (2019), essa abordagem dupla é particularmente eficaz porque:

- Amplifica os efeitos vasodilatadores e natriuréticos dos peptídeos natriuréticos;
- Suprime os efeitos vasoconstritores e pró-fibróticos da angiotensina II, criando um balanço hemodinâmico favorável;
- Reduz a pressão arterial e o estresse sobre o coração, promovendo melhor desempenho cardíaco.

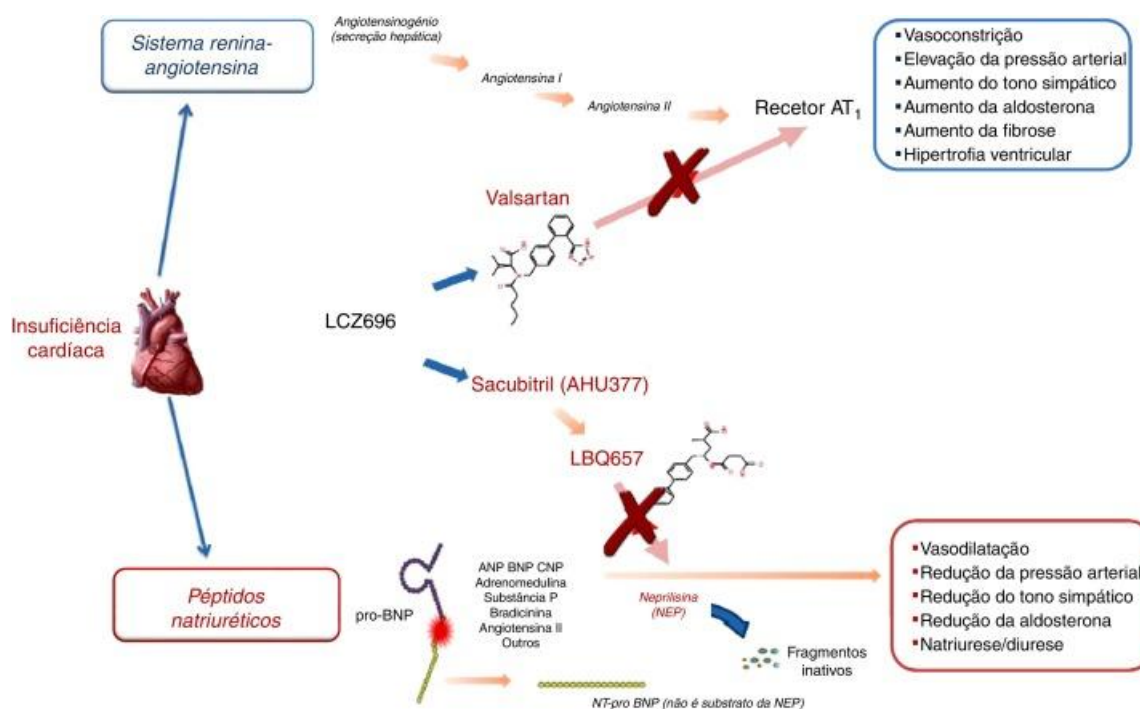
Impacto Clínico e Benefícios Terapêuticos

Estudos clínicos demonstram que o Sacubitril/Valsartan reduz significativamente a morbimortalidade em pacientes com IC de fração de ejeção reduzida (ICFEr) (MCMURRAY *et al.*, 2014; GUHA *et al.*, 2016). Seus benefícios incluem:

- Melhora da função cardíaca e da qualidade de vida;
- Redução de hospitalizações por IC;
- Diminuição da mortalidade cardiovascular e geral.

A Figura 2 ilustra os mecanismos de ação do Sacubitril/Valsartan, destacando sua interação com o sistema renina-angiotensina e o sistema de peptídeos natriuréticos, evidenciando as vias responsáveis pela melhora dos parâmetros hemodinâmicos e clínicos em pacientes com IC.

Figura 2: Mecanismo de ação farmacológica do LCZ696.



Fonte: MILLS; VARDENY, 2015.

Legenda: O sistema renina-angiotensina promove vasoconstrição, aumento da pressão arterial, ativação simpática, liberação de aldosterona, fibrose e hipertrofia ventricular via ativação do receptor AT₁ pela angiotensina II. O valsartan bloqueia esse receptor, reduzindo seus efeitos deletérios. Os peptídeos natriuréticos exercem efeitos benéficos, como vasodilatação e natriurese, mas são degradados pela neprilisina. O sacubitril (AHU377) inibe essa enzima, aumentando a disponibilidade dos peptídeos natriuréticos e potencializando seus efeitos. O fármaco LCZ696 (Sacubitril/Valsartan) combina essas ações, sendo uma estratégia eficaz no manejo da IC.

A importância da farmacogenética na compreensão e tratamento de condições como a IC

A farmacogenética, campo dedicado ao estudo da influência das variações genéticas na resposta a medicamentos, desempenha um papel fundamental na personalização do tratamento de condições complexas como a IC. Essa abordagem permite compreender melhor a variabilidade individual na eficácia e segurança das terapias, potencializando os benefícios clínicos e reduzindo os riscos associados (STEIN *et al.*, 2020).

A IC é uma condição multifatorial, caracterizada por alterações hemodinâmicas e neuro-hormonais que afetam o desempenho cardíaco. O tratamento farmacológico visa aliviar os sintomas, melhorar a qualidade de vida e reduzir a morbimortalidade. Nesse

contexto, medicamentos como o Sacubitril/Valsartan, amplamente indicados para pacientes com IC com fração de ejeção reduzida (ICFEr), destacam-se pela sua eficácia (MCMURRAY *et al.*, 2014; GUHA *et al.*, 2016).

O Sacubitril/Valsartan combina a inibição da neprilisina (Sacubitril) com o bloqueio do receptor AT1 da angiotensina II (Valsartan), oferecendo um mecanismo de ação duplo que proporciona superioridade clínica em relação às terapias tradicionais, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e os betabloqueadores administrados isoladamente (ALENCAR, 2023). Entretanto, a eficácia e a segurança dessa terapia podem variar amplamente entre os pacientes, devido à influência de fatores genéticos.

Influência da Variabilidade Genética no Tratamento com Sacubitril/Valsartan

Estudos mostram que polimorfismos genéticos podem modular a resposta ao tratamento com Sacubitril/Valsartan. Por exemplo:

- **Gene ACE (Enzima Conversora de Angiotensina):** Polimorfismos nesse gene podem influenciar a eficácia do bloqueio do sistema renina-angiotensina, impactando a resposta terapêutica ao Valsartan. Variantes específicas estão associadas à redução da pressão arterial e à modulação do remodelamento cardíaco (da AGOSTINI *et al.*, 2023).
- **Gene NPPA e NPPB (Peptídeos Natriuréticos A e B):** Alterações nesses genes podem afetar os níveis basais e a degradação dos peptídeos natriuréticos, modulando a ação do Sacubitril. Pacientes com variantes genéticas que aumentam a atividade desses peptídeos podem apresentar maior benefício clínico com o uso do Sacubitril/Valsartan (ABUZAANONA *et al.*, 2017; SEIDELMANN, 2017; MURPHY *et al.*, 2021)
- **Polimorfismos Relacionados à Hipercalcemia:** Alguns estudos identificaram associações entre variantes genéticas em genes como *NR3C2* e *CYP4A11* e o risco de hipercalcemia, especialmente em indivíduos com disfunção renal ou comorbidades associadas (GELLER *et al.*, 2000; GAINER *et al.*, 2005).

A tabela 1 descreve, com mais detalhes o mecanismo de ação e as implicações clínicas de polimorfismos detectados nesses genes.

Tabela 1: Informações sobre os genes e implicações clínicas de polimorfismos presentes nos mesmos

Gene	Ano do Estudo	Localização Cromossômica	Tipo de Herança (OMIM)	Função do Gene	Mecanismo de Ação	Implicações Clínicas
<i>ACE</i>	2023 (da AGOSTINI <i>et al.</i>)	17q23.3	Autossômica	Regula a conversão de angiotensina I em angiotensina II	Polimorfismos podem levar a ganho de função ou superexpressão.	Influencia a resposta ao valsartan, impactando a redução da pressão arterial e o remodelamento cardíaco.
<i>NPPA/NPPB</i>	2017 (ABUZAANONA <i>et al.</i>), 2017 (SEIDELMANN), 2021 (MURPHY <i>et al.</i>)	<i>NPPA</i> : 1p36.22, <i>NPPB</i> : 1p36.22	Autossômica	Codifica os peptídeos natriuréticos ANP e BNP	Polimorfismos podem resultar em aumento ou redução da expressão dos peptídeos.	Pacientes com variantes que aumentam a expressão dos peptídeos natriuréticos podem ter maior benefício com sacubitril.
<i>NR3C2/CYP4A11</i>	2000 (GELLER <i>et al.</i>), 2005 (GAINER <i>et al.</i>)	<i>NR3C2</i> : 4q31.23, <i>CYP4A11</i> : 1p33	Autossômica	Regula a resposta à aldosterona e a excreção de potássio	Algumas variantes levam à redução da excreção de potássio, aumentando o risco de hipercalemia.	Pode aumentar o risco de hipercalemia em pacientes com disfunção renal.

Fonte: A autora.

A farmacogenética também permite identificar indivíduos que se beneficiam mais de terapias avançadas, como o Sacubitril/Valsartan, em comparação com tratamentos tradicionais. Por exemplo, pacientes com polimorfismos que favorecem o metabolismo dos peptídeos natriuréticos tendem a responder melhor ao Sacubitril/Valsartan, enquanto variantes genéticas específicas podem indicar maior predisposição a efeitos adversos com o uso de inibidores da ECA ou betabloqueadores isolados.

Avanços e Perspectivas na Personalização do Tratamento

Embora o Sacubitril/Valsartan represente um avanço significativo no manejo da IC, a variabilidade genética individual ressalta a necessidade de uma abordagem personalizada. Estudos recentes, como os de Pozzi *et al.* (2023), destacam o potencial da farmacogenética em identificar variantes genéticas que influenciam diretamente a resposta terapêutica. Esses achados podem levar ao desenvolvimento de testes genéticos que orientem a seleção do tratamento mais adequado para cada paciente.

Em resumo, a farmacogenética não apenas amplia o entendimento sobre a fisiopatologia da IC, mas também oferece ferramentas promissoras para otimizar o manejo terapêutico. Ao integrar informações genéticas no cuidado clínico, é possível melhorar a eficácia dos tratamentos, reduzir os efeitos adversos e, em última instância, oferecer uma abordagem mais precisa e personalizada para os pacientes com IC (STEIN *et al.*, 2020).

Aplicação de ferramentas de biologia molecular no estudo de doenças genéticas

O avanço contínuo nas ferramentas de biologia molecular tem transformado profundamente a compreensão sobre doenças genéticas, proporcionando *insights* detalhados sobre as variações individuais na resposta a tratamentos médicos. Técnicas de ponta, como o sequenciamento de nova geração (NGS) e a genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), têm sido amplamente utilizadas para identificar variantes genéticas associadas a condições como a IC (LAMOUNIER *et al.*, 2019). Essas ferramentas não apenas auxiliam na identificação de fatores genéticos que influenciam a resposta a medicamentos, como o Sacubitril/Valsartan, mas também possibilitam abordagens mais personalizadas no tratamento.

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) destacam-se como um recurso valioso na identificação de *loci* genéticos envolvidos na suscetibilidade a doenças complexas e nas variações interindividuais às terapias farmacológicas. Por exemplo, variantes nos genes *NPPA* e *NPR1*, que codificam proteínas relacionadas aos peptídeos natriuréticos, demonstraram estar diretamente ligadas à eficácia do Sacubitril/Valsartan. Esses avanços contribuem para explicar por que alguns pacientes respondem melhor a esta terapia em comparação com tratamentos convencionais, como inibidores da ECA ou betabloqueadores (KUMAR *et al.*, 2021; LUO *et al.*, 2023).

Além disso, o uso de ferramentas moleculares modernas permite explorar fatores não genéticos que modulam a resposta terapêutica. Tecnologias avançadas como a análise de microRNAs e o estudo de alterações epigenéticas ampliam a visão sobre as interações entre o genoma e os medicamentos. Essas descobertas têm sido fundamentais para consolidar a medicina personalizada como uma abordagem eficaz no manejo de doenças como a IC (SWATHY e BANERJEE, 2022; NALBANT e AKKAYA-ULUM, 2024).

Nos últimos anos, a tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) destacou-se como uma das mais importantes inovações no diagnóstico e tratamento de doenças genéticas. Com sua capacidade de paralelização massiva, o NGS realiza o sequenciamento simultâneo de milhares de fragmentos de DNA, permitindo a montagem e o alinhamento das sequências ao genoma de referência. Essa abordagem possibilita a identificação de mutações genéticas em alta resolução e com custo reduzido. Além das mutações pontuais, o NGS também detecta inserções, deleções, rearranjos cromossômicos e alterações epigenéticas, tornando-se uma ferramenta indispensável para estudos em larga escala de alterações somáticas no genoma (CHEN *et al.*, 2013; SATAM *et al.*, 2023).

Outra ferramenta molecular de grande relevância no estudo de doenças genéticas é o transcriptoma, que compreende o conjunto de moléculas de RNA presentes nas células, incluindo mRNA e RNAs não codificantes. Como o mRNA é traduzido em proteínas, o transcriptoma pode ser considerado um precursor do proteoma, oferecendo insights críticos sobre a atividade gênica e os processos celulares envolvidos em estados normais e patológicos (KAUR, 2013; SHI *et al.*, 2022).

Técnicas de análise do transcriptoma, como o RNA-Seq, têm revolucionado o campo da biologia molecular ao permitir a caracterização detalhada dos perfis de expressão gênica. O RNA-Seq oferece vantagens significativas em relação aos *microarrays* tradicionais, como a capacidade de identificar novos transcritos, analisar

splicing alternativo e quantificar com precisão a expressão gênica em diferentes condições biológicas. Essas características tornam o RNA-Seq uma ferramenta essencial, tanto para o diagnóstico, quanto para o desenvolvimento de terapias personalizadas (VAN DER KLOET *et al.*, 2020; NEGI *et al.*, 2022).

Em suma, as ferramentas modernas de biologia molecular, como o NGS e o RNA-Seq, estão redefinindo os limites da pesquisa em genética médica. Elas não apenas oferecem uma visão detalhada sobre as bases moleculares das doenças, mas também abrem caminho para o desenvolvimento de terapias altamente direcionadas, ajustadas às necessidades individuais de cada paciente. Esses avanços representam um passo significativo na consolidação da medicina personalizada como o futuro do cuidado em saúde.

Importância da análise ancestralidade genômica

Apesar de as principais pesquisas em genética clínica envolverem o estudo da associação entre um gene suspeito e uma determinada doença através de uma estratégia denominada estudo caso-controle, nem sempre as diferenças entre as amostras são causadas pelo fenótipo investigado e sim por estratificações populacionais (TIAN *et al.*, 2006). Associações espúrias podem ser resultantes da estrutura genética da amostra que, na maioria dos casos, não são detectadas com base nas informações obtidas no objeto de estudo (TIAN *et al.*, 2006). Estimativas das proporções ancestrais, com base no uso de marcadores moleculares de ancestralidade, vêm sendo investigadas para responder questões relacionadas à colonização, migração e padrão ancestral da população brasileira, além de ser fundamental para o controle de um possível efeito na subestrutura populacional em estudos de associação (PEREIRA; PENA, 2006).

Em resumo, as implicações farmacogenéticas na resposta ao tratamento com Sacubitril/Valsartan ou terapias convencionais em pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida (IC-FEr) têm grande relevância para a medicina personalizada, pois ajudam a compreender como as diferenças genéticas podem afetar a eficácia e a segurança dos medicamentos. Com os avanços na genômica e transcriptômica, torna-se possível identificar biomarcadores que podem aprimorar os tratamentos, ajustando a abordagem terapêutica conforme as características genéticas de cada paciente. Este tópico é especialmente relevante, visto que a insuficiência cardíaca

permanece como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A integração de novas opções terapêuticas, como o Sacubitril/Valsartan, com a análise genética, tem o potencial de melhorar significativamente os desfechos clínicos.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Realizar análises transcriptômicas e de ancestralidade, a fim de compreender quais são as bases genéticas para as diferentes respostas farmacoterapêuticas ao Sacubitril/Valsartan e outras classes de medicamentos convencionais (betabloqueadores, IECA/BRA, diuréticos, inibidores do co-transportador de sódio-glicose 2, antagonistas dos receptores de aldosterona) observadas na prática clínica, em pacientes com IC-FER.

1.2 Objetivos específicos

- a) Obter o perfil de expressão gênica diferencial entre os pacientes com IC-Fer tratados com Sacubitril/Valsartan e pacientes tratados com iECAs ou BRAs, bem como com demais classes de medicamentos convencionais, e realizar o estudo de enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos;
- b) Identificar biomarcadores que possam ter relação com a resposta farmacoterapêutica por meio do sequenciamento de RNA de células do sangue periférico de pacientes com IC-Fer de etiologia isquêmica submetidos ao tratamento com diferentes fármacos, incluindo o Sacubitril/Valsartan;
- c) Estimar a contribuição das populações ancestrais africanas, ameríndias e européias das amostras pertencentes ao estudo, utilizando marcadores informativos de ancestralidade de inserção e deleção (AIM-Indels).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Considerações éticas

Esse projeto recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, conforme registrado no protocolo CAAE: 47609121.0.0000.5259 (ANEXOS A e B) e todos os procedimentos adotados seguiram as normas éticas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Antes de serem incluídos na pesquisa, todos os indivíduos receberam informações detalhadas sobre os objetivos, procedimentos, benefícios e possíveis riscos associados ao estudo clínico. Apenas aqueles que demonstraram compreensão total e consentimento voluntário ao assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXOS C e D) foram incorporados como participantes.

O estudo envolveu pacientes com IC acompanhados no Ambulatório de Insuficiência Cardíaca, vinculado ao Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os pacientes foram acompanhados nesse Serviço, com avaliação clínica a cada seis meses. As etapas laboratoriais e analíticas do estudo foram procedidas no Laboratório de Diagnóstico por DNA (LDD) e no Serviço de Genética Humana (SERVGEN), pertencentes à Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

2.2 Amostras e características dos grupos selecionados

Foram recrutados 65 pacientes (28 mulheres e 37 homens) com IC-FER de etiologia isquêmica, com idades entre 40 e 89 anos.

Do total, 22 amostras foram selecionadas para análise transcriptômica, dos quais 12 pacientes foram tratados com inibidor da neprilisina e dos receptores de angiotensina (INRA) (Sacubitril/Valsartana) e 10 pacientes foram tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) ou bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA), para comporem o grupo controle.

Os grupos foram pareados de acordo com critérios de sexo e idade, garantindo maior consistência nas comparações. Entre os 22 pacientes selecionados, 12 eram homens e 10 mulheres, com idades variando de 55 a 85 anos.

Foi requisitada a realização de ecocardiogramas para avaliar a fração de ejeção ventricular. Tanto os exames laboratoriais quanto o ecocardiograma foram realizados após, no mínimo, seis meses do início das terapias medicamentosas, assegurando que os resultados refletissem os efeitos dos tratamentos propostos. Também foram coletados e analisados os resultados de exames realizados antes do início do tratamento em estudo, permitindo uma comparação direta com os resultados subsequentes. Esse procedimento foi fundamental para avaliar a tolerância e a resposta clínica dos pacientes às diferentes abordagens farmacoterapêuticas, fornecendo dados robustos para inferências sobre a eficácia dos tratamentos investigados.

2.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios estabelecidos para inclusão no estudo foram os seguintes: pacientes com idade superior a 18 anos, sem relação de parentesco entre si, que estivessem em acompanhamento ambulatorial regular na Clínica de Insuficiência Cardíaca do HUPE (IC-HUPE) por um período superior a um ano. Adicionalmente, os participantes deveriam ser diagnosticados com IC de etiologia isquêmica, apresentando fração de ejeção ventricular igual ou inferior a 40%.

Por outro lado, os critérios para exclusão foram claramente definidos para garantir a homogeneidade e a segurança da pesquisa. Foram excluídos indivíduos com cardiomiopatias de etiologias diferentes da isquêmica, gestantes, pacientes diagnosticados com miocardite ou portadores de neoplasias, além de indivíduos cuja expectativa de vida fosse inferior a um ano. Esses critérios visaram assegurar que a amostra selecionada fosse adequada para os objetivos do estudo, permitindo a obtenção de dados confiáveis e representativos para a análise pretendida.

2.4 Coleta de material biológico e extração de DNA e RNA

A coleta de amostras de sangue foi realizada por meio de punção venosa, por um técnico de análises clínicas, utilizando tubos do tipo vacutainer contendo solução

estabilizante de EDTA. As amostras (5 mL) foram armazenadas a -70 °C até o momento de serem processadas para a extração de DNA e RNA.

O RNA total das amostras de sangue periférico foi extraído, conjugando-se a técnica de *salting out* (MILLER *et al.*, 1988; SAMBROOK; RUSSELL, 2011) e o uso do reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (MACHADO *et al.*, 2014). A extração foi realizada de maneira imediata após a coleta do sangue periférico, com o objetivo de reduzir ao máximo o risco de degradação do RNA.

Para o procedimento de extração, foram transferidos 2,5 mL de sangue para um tubo Falcon de 15 mL, ao qual foram também adicionados 10 mL de TLH gelado. Esse tubo foi colocado em uma centrífuga refrigerada a 4 °C e centrifugado a 5000xG (Raio do rotor: 8,4 cm) por 15 minutos. Ao final do processo, observou-se a formação de um pellet no fundo do tubo, e o sobrenadante foi cuidadosamente removido com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, foi adicionado mais 10 mL de TLH gelado ao material e o pellet foi desprendido com uma agitação vigorosa. O procedimento de centrifugação foi repetido, mantendo as condições, por mais duas vezes, para garantir a máxima limpeza do material de interesse.

Após o isolamento das células no fundo do tubo Falcon, foi adicionado 1 mL de reagente TRIzol, e o pellet foi homogeneizado por meio de pipetagem. Esse homogeneizado foi transferido para um tubo de 2 mL, vortexado por 15 segundos e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após um breve spin, 200 µL de clorofórmio puro foram pipetados para o tubo, que foi novamente vortexado por 15 segundos e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 12000xG (Raio do rotor: 8,4 cm) por 15 minutos a 4°C. O processo resultou na formação de três fases distintas: a fase alcoólica, de coloração rosa clara, uma fase intermediária contendo proteínas e contaminantes celulares e, por fim, a fase transparente, que continha o DNA/RNA extraído. O sobrenadante contendo o RNA de interesse foi cuidadosamente recuperado e transferido para um novo tubo de 2 mL, e o mesmo volume de etanol absoluto foi adicionado à amostra. A mistura foi homogeneizada por inversão.

A purificação adicional do RNA foi realizada utilizando o kit PureLink RNA Mini Kit (ThermoFisher), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. O material foi transferido para a coluna de filtração, e a centrifugação foi realizada em uma minicentrífuga a 12000xG (Raio do rotor: 8,1 cm) por 1 minuto. A coluna foi então transferida para um tubo de descarte, e o processo foi repetido até que todo o volume da

amostra fosse processado, dado que a coluna possui um limite de até 700 μL por vez. Posteriormente, foram adicionados 500 μL de tampão de lavagem WB2 à coluna, que foi centrifugada novamente a 12000xG (Raio do rotor: 8,1 cm) por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo de descarte, e mais 500 μL de tampão WB2 foram adicionados, com nova centrifugação. Na etapa final, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL ou 2 mL, e 100 μL de tampão RNasefree foram pipetados para a coluna. O tubo foi incubado por 1 minuto à temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação de 2 minutos a 12000xG (Raio do rotor: 8,1 cm). Duas alíquotas de 10 μL da amostra foram retiradas para as análises subseqüentes, e o restante foi armazenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. As alíquotas para as análises foram armazenadas sob refrigeração a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Além disso, o DNA genômico foi extraído das amostras obtidas utilizando o kit BioPur Mini Spin Vírus DNA/RNA (Biometrix Diagnóstica), conforme instruções do fabricante.

2.5 Controle de qualidade das amostras de RNA

As amostras de RNA extraídas foram quantificadas por meio de fluorimetria, uma técnica sensível e precisa para medir a concentração do RNA nas amostras, utilizando o equipamento Qubit® (ThermoFisher). Para avaliar a pureza do RNA extraído, foi empregada a técnica de espectrofotometria utilizando o NanoDrop 2000 (ThermoFisher). A análise de pureza foi realizada com base nas razões das absorvâncias obtidas a 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm. Essas razões são indicativas de possíveis contaminações nas amostras. A razão 260/280 é utilizada para avaliar a presença de proteínas, enquanto a razão 260/230 fornece informações sobre a possível contaminação por solventes ou compostos orgânicos.

Além disso, o nível de integridade do RNA extraído foi analisado utilizando o ensaio ScreenTape® de RNA de alta sensibilidade, por meio de um sistema de eletroforese em *chip*, operado pelo Agilent TapeStation (Agilent Technologies, Miami, EUA). Esse método permite uma avaliação detalhada da integridade do RNA, proporcionando uma visualização precisa do perfil de degradação das amostras. Somente as amostras com um RIN (*RNA Integrity Number*) superior a 7, o que indica RNA de alta qualidade e baixa degradação, foram selecionadas para as análises subseqüentes, garantindo a confiabilidade dos dados obtidos.

2.6 Construção das bibliotecas de cDNA

O kit Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Epicentre, Madison, WI, EUA) foi utilizado para a remoção de rRNA de um total de 1,5 µg de RNA por amostra. Em seguida, as bibliotecas de sequenciamento foram geradas usando o NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit para Illumina® (NEB, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, e os códigos index foram adicionados para multiplexação das amostras. A fragmentação foi realizada usando cátions divalentes em temperatura elevada no NEB Next First Strand Synthesis Reaction Buffer (5X). A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando um *primer* hexâmero aleatório e transcriptase reversa. Em seguida, a síntese da segunda fita de cDNA foi realizada utilizando a DNA Polimerase I e RNase H. As extremidades remanescentes foram convertidas em extremidades cegas por atividades de exonuclease/polimerase. Após a adenilação das extremidades 3' dos fragmentos de DNA, o Adaptador NEB Next com estrutura de laço em gancho foi ligado para preparação da hibridização. Para selecionar fragmentos de inserção de preferência com comprimento de 150~200 pb, os fragmentos da biblioteca foram purificados com esferas AMPure XP (Beckman Coulter, Beverly, EUA). Em seguida, 3 µl da enzima USER (NEB, EUA) foram utilizados com o cDNA selecionado por tamanho e ligado ao adaptador, a 37°C por 15 minutos. Depois, a PCR foi realizada com a DNA polimerase Phusion High-Fidelity, primers PCR universais e primer indexados. Para a biblioteca construída, foi utilizado o quantificador de fluorescência Qubit 3.0 para uma quantificação preliminar, com concentração mínima exigida de 1 ng/µL. Em seguida, o sistema de análise Qsep400 de alta capacidade foi empregado para detectar os fragmentos inseridos na biblioteca. Posteriormente, o método de qPCR foi aplicado para determinar a concentração efetiva da biblioteca (concentração efetiva superior a 2 nM), garantindo uma quantificação precisa e a qualidade da biblioteca.

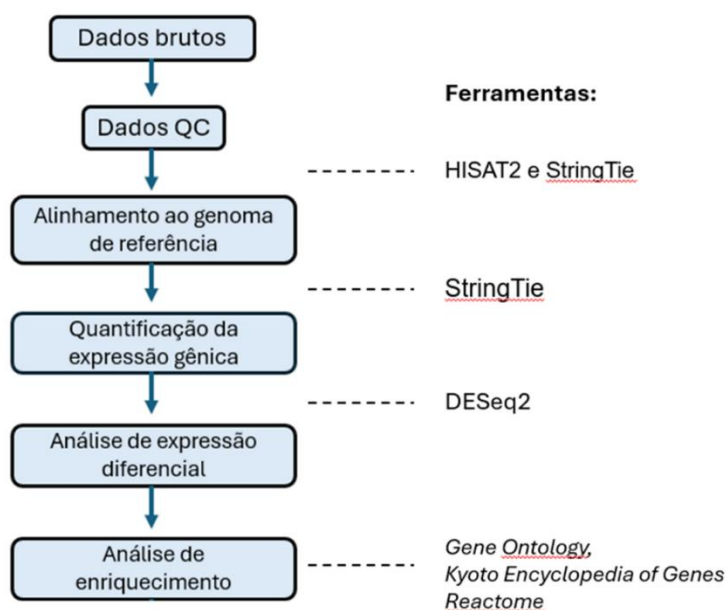
2.7 Sequenciamento

Para o sequenciamento das bibliotecas de cDNA consideradas adequadas, foi utilizada a plataforma de sequenciamento de alto rendimento da Illumina (NovaSeq6000) no modo de sequenciamento PE150.

As amostras foram agrupadas com códigos index no sistema acBot Cluster Generation usando o TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina), de acordo com as instruções do fabricante. Após a geração dos clusters, as bibliotecas foram sequenciadas na configuração *paired-end* (leitura a partir de ambas as extremidades). A escolha pelo sequenciamento *paired-end* proporciona várias vantagens, incluindo a possibilidade de obter informações mais completas sobre a sequência de cada fragmento, facilitando a montagem e o alinhamento preciso das leituras. Para garantir uma cobertura suficiente e obter dados confiáveis, cada amostra foi sequenciada com uma profundidade mínima de 20 milhões de leituras. Esse valor foi escolhido para assegurar a detecção precisa de genes de baixa e alta expressão, bem como para melhorar a qualidade dos dados na análise de expressão gênica diferencial e demais análises subsequentes.

2.8 Bioinformática

Os dados brutos obtidos a partir do sequenciamento das bibliotecas de cDNA foram filtrados para obter dados limpos. Em seguida, os dados limpos foram alinhados ao genoma de referência, gerando dados mapeados. Posteriormente, foram realizadas a análise da estrutura genética a identificação de mRNAs diferencialmente expressos, a anotação de função gênica e o enriquecimento funcional. O fluxo de trabalho da análise bioinformática de mRNA é mostrado na figura 3.

Figura 3: Fluxograma das análises de bioinformática

Fonte: A autora, 2025

2.9 Controle de qualidade das leituras de sequenciamento

É fundamental garantir a qualidade das leituras antes de prosseguir com as análises subsequentes. Os dados brutos contêm informações indesejadas, como *primers* e adaptadores, que precisam ser removidas antes da análise. Sendo assim, os dados brutos (leituras brutas) no formato FASTQ foram inicialmente processados através de scripts Perl *in house*. Nesta etapa, os dados limpos (leituras limpas) foram obtidos, removendo-se as leituras que continham adaptadores, leituras com poli-N e leituras de baixa qualidade dos dados brutos. Ao mesmo tempo, o Q20, Q30, o conteúdo GC e o nível de duplicação de sequências dos dados limpos foram calculados. Todas as análises subsequentes foram baseadas em dados limpos de alta qualidade. As etapas do controle de qualidade estão descritas abaixo:

- a. **Exclusão de leituras com baixa qualidade:** Leituras que apresentaram uma proporção de nucleotídeos desconhecidos (N) superior a 10% e com valores de $Q \leq 10$ em mais de 50% das bases foram descartadas.

- b. Remoção de contaminações por adaptadores:** Todas as sequências de adaptadores e *primers* foram eliminadas das leituras.
- c. Qualidade das Bases de Sequenciamento:** o escore de qualidade, ou Q-escore, representa a probabilidade de uma base incorreta. Esse escore de qualidade Phred é definido pela equação $Q = -10 * \log_{10} P$, na qual P representa as probabilidades de erro na chamada de bases. As pontuações de qualidade Q20 e Q30 são parâmetros frequentemente utilizados na análise de dados de sequenciamento de DNA. Uma pontuação Q20 indica que a probabilidade de erro é de 1 em 100, ou seja, 99% de certeza na base chamada. Em termos práticos, isso significa que 90,9% das leituras com Q20 ou superior são consideradas de alta qualidade. Já uma pontuação Q30 sugere uma probabilidade de erro de 1 em 1000, refletindo 99,9% de certeza na base chamada. Portanto, leituras com Q30 ou superior são mais desejáveis. Neste estudo, utilizamos como ponto de corte o Q30, ou seja, a porcentagem de bases com um escore de qualidade igual ou superior a Q30 nos dados limpos, o que representa uma probabilidade de erro de 0.1% e uma acurácia de 99,9%.
- d. Distribuição de Bases nas Leituras:** o teste de distribuição do conteúdo de bases é projetado para detectar a separação de AT e GC. Em teoria, de acordo com o processo de fragmentação aleatória do cDNA e o princípio do pareamento de bases complementares, a frequência de A, T, G e C deveria ser uniforme e constante ao longo das leituras. No entanto, a construção de bibliotecas específicas pode gerar certas flutuações nos conteúdos de GC e AT. Além disso, na prática, flutuações na extremidade 5' são comumente observadas devido a certos vieses na ligação de *primers* hexâmeros aleatórios e *templates*. Após a aplicação desses critérios de filtragem, os dados limpos de alta qualidade foram gerados no formato FASTQ, garantindo sua adequação para as análises subsequentes.

2.10 Alinhamento das leituras contra o genoma de referência

Para o alinhamento das leituras limpas, foi utilizado o genoma de referência humano Homo_sapiens.GCF_000001405.40_GRCh38.p14_genomic.genome.fa.

A ferramenta HISAT2 foi empregada para mapear as leituras de RNA-seq, permitindo a obtenção das informações de localização das leituras no genoma de referência. Após o mapeamento, as leituras foram montadas utilizando o *software* StringTie, o que possibilitou a reconstrução do transcriptoma para as análises subsequentes. A taxa de mapeamento refere-se à porcentagem de leituras limpas mapeadas. Além da influência da qualidade dos dados de sequenciamento, a taxa de mapeamento também pode ser afetada pela qualidade da montagem do genoma de referência e pela relação de classificação biológica entre a amostra sequenciada e a de referência. A taxa de mapeamento é um parâmetro importante para verificar se o genoma de referência é adequado para as análises bioinformáticas posteriores.

Após a montagem, os transcritos foram classificados usando um *pipeline* de bioinformática que separou transcritos codificantes (mRNAs) de não codificantes (lncRNAs).

2.11 Quantificação dos transcritos

A quantificação da expressão gênica visa medir a variação nos níveis de expressão dos genes. Em geral, quanto mais transcritos um gene expressa, mais leituras (*reads*) desse gene serão obtidas. Assim, o nível de expressão do gene pode ser calculado de acordo com a contagem (*count*) da proporção de leituras sequenciadas em cada transcrito. No entanto, a contagem de leituras dos genes também depende do tamanho do gene e da profundidade do sequenciamento. Para revelar com maior precisão o nível de expressão de cada transcrito, o número de leituras mapeadas precisa ser normalizado pelo comprimento dos transcritos. O StringTie aplica o FPKM (*Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped*) para medir o nível de expressão de um gene ou transcrito.

A análise de componentes principais (PCA) foi conduzida utilizando os valores de FPKM de cada amostra. Dessa forma, a expressão gênica foi reduzida a dimensões

menores, permitindo identificar padrões de distribuição entre as amostras e avaliar a dispersão nos referidos grupos. Em resumo, essa análise permite a visualização gráfica do nível de diferença e/ou similaridade entre o grupo tratado com o Sacubitril/Valsartan e o grupo controle, tratado com IECA/BRAs. A proximidade dos pontos no gráfico de PCA indica maior semelhança na composição das amostras, geralmente associadas a grupos de tratamento semelhantes. Genes com níveis de expressão significativamente diferentes entre amostras distintas são chamados de genes diferencialmente expressos (DEGs). A ferramenta DESeq2 foi aplicada para os testes de expressão diferencial com base em um modelo que utiliza a distribuição binomial negativa sob duas condições diferentes.

2.12 Análise de genes diferencialmente expressos

Genes com níveis de expressão significativamente diferentes entre amostras distintas são chamados de genes diferencialmente expressos (DEGs). A ferramenta DESeq2 foi aplicada para os testes de expressão diferencial com base em um modelo que utiliza a distribuição binomial negativa sob duas condições diferentes. Na identificação de DEGs, o FoldChange (FC) representa a razão dos valores de expressão gênica entre dois grupos, enquanto a taxa de descoberta falsa (False Discovery Rate, FDR) representa o valor de p ajustado, denominado de q-valor. Critérios de filtragem (FoldChange $\geq 1,5$ e valor de $p < 0,01$) foram aplicados para obtenção das DEGs, que foram posteriormente anotadas.

O Volcanoplot foi utilizado para visualização das diferenças na expressão gênica entre as amostras e a significância estatística dessa diferença.

2.13 Análises de enriquecimento

Para a análise funcional dos DEGs, foi utilizada a classificação do *Gene Ontology* (GO), que fornece um padrão para a categorização das funções genéticas. O sistema de anotação GO é estruturado como um grafo acíclico direcionado, dividido em três ramos principais: processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares.

Para identificar termos GO que se encontraram significativamente enriquecidos em comparação com o transcriptoma geral, o *ClusterProfiler* foi utilizado para a análise de enriquecimento dos processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares, utilizando testes hipergeométricos para os conjuntos de DEGs. É possível prever as funções de diferentes genes neste grupo com base nas informações de enriquecimento funcional do GO. Geralmente, a significância de uma via funcional é julgada pelo valor de q , e quanto menor o valor de q , mais significativa.

A anotação de genes dentro de redes de vias metabólicas foi realizada para compreender as funções biológicas em organismos. Para isso, utilizou-se o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), que é uma das principais fontes de informação sobre vias biológicas, incluindo aquelas relacionadas a carboidratos, nucleotídeos, aminoácidos e a degradação biológica de compostos orgânicos. O processo de anotação envolveu a identificação de genes presentes nas redes de vias, permitindo uma análise mais aprofundada das funções biológicas. O KEGG também fornece uma descrição abrangente das enzimas envolvidas nas vias metabólicas, incluindo informações como sequências de aminoácidos e links para o banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), o que facilita a exploração funcional e estrutural das proteínas. Através desta metodologia, foi possível mapear e classificar os genes dentro de suas respectivas vias metabólicas, contribuindo para uma melhor compreensão dos processos biológicos subjacentes.

A análise de enriquecimento de vias biológicas também foi realizada utilizando o *Reactome Pathway Database*, um banco de dados curado que fornece informações detalhadas sobre redes de reações bioquímicas e processos celulares. Para esse fim, foram utilizadas as listas de genes diferencialmente expressos, identificadas na análise transcriptômica por RNA-Seq. As vias significativamente enriquecidas foram identificadas considerando um q -valor $< 0,05$, e os processos biológicos mais relevantes foram selecionados com base na relevância funcional e no número de genes envolvidos.

2.14 Análise de marcadores de ancestralidade de inserção/deleção (indels)

Com a finalidade de estimar o perfil de ancestralidade das amostras empregadas no presente estudo, foi utilizado o sistema multiplex AIMs descrito por Pereira *et al.*

(2012) (Tabela 2), o qual é composto por 46 marcadores com frequências alélicas significativamente diferentes entre africanos, europeus, asiáticos e ameríndios, sendo, portanto, altamente informativos para cada um dos quatro grupos populacionais. Na PCR, foi utilizado o tampão QIAGEN Multiplex PCR (QIAGEN). Essa análise foi realizada para estimar o nível de homogeneidade das amostras quanto ao fator ancestralidade e eliminar quaisquer associações espúrias em decorrência deste.

A mistura de reagentes consistiu em 2 ng de DNA genômico, 1 μ L de primer mix a 2 μ M cada primer e 5 μ L de master mix 2x concentrado num volume final de 10 μ L. As condições de temperatura incluíram uma etapa inicial de 95 °C por 15 min; uma etapa intermediária com 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 60 °C por 90 seg e 72 °C por 45 seg. E por fim, uma etapa de extensão final de 72 °C por uma hora. A reação foi realizada no termocilador Veriti (Thermo Fisher Scientific TM).

Tabela 2: *Primers* utilizados para a amplificação dos AIM-InDels

MID*	rs number	Chromosome	Position (bp)**	Alleles described in dbSNP
MID-1470	rs2307666	11	64729920	-/GTTAC
MID-777	rs1610863	16	6551830	-/GAA
MID-196	rs16635	6	99789775	-/CAT
MID-881	rs1610965	5	79746093	-/ACTT
MID-3122	rs35451359	18	45110983	-/ATCT
MID-548	rs140837	6	3708909	-/CT
MID-659	rs1160893	2	224794577	-/CT
MID-2011	rs2308203	2	109401291	-/CTAGA
MID-2929	rs33974167	8	87813725	-/TA
MID-593	rs1160852	6	137345857	-/TT
MID-798	rs1610884	5	56122323	-/GGGAAA
MID-1193	rs2067280	5	89818959	-/AT
MID-1871	rs2308067	7	127291541	-/TT
MID-17	rs4183	3	3192524	-/TAAC
MID-2538	rs3054057	15	86010538	-/AACA
MID-1644	rs2307840	1	36099090	-/GT
MID-3854	rs60612424	6	84017514	-/TCTA
MID-2275	rs3033053	14	42554496	-/TCAGCAG
MID-94	rs16384	22	42045009	-/AAC
MID-3072	rs34611875	18	67623917	-/GCCCCCA
MID-772	rs1610859	5	128317275	-/TAG
MID-2313	rs3045215	1	234740917	-/ATTATAACT
MID-397	rs25621	6	139858158	-/TTCT
MID-1636	rs2307832	1	55590789	-/AA
MID-51	rs16343	4	17635560	-/TTTAT
MID-2431	rs3031979	8	73501951	-/ATTG
MID-2264	rs34122827	13	63778778	-/AAGT
MID-2256	rs133052	22	41042364	-/CAT
MID-128	rs6490	12	108127168	-/ATT
MID-15	rs4181	2	42577803	-/AAATACACAC
MID-2241	rs3030826	6	67176774	-/GTCCAATA
MID-419	rs140708	6	170720016	-/AATGGCA
MID-943	rs1611026	5	82545545	-/TGAT
MID-159	rs16438	20	25278470	-/CCCCA
MID-2005	rs2308161	10	69800909	-/AACAAT
MID-250	rs16687	7	83887882	-/CA
MID-1802	rs2307998	5	7814345	-/GGA
MID-1607	rs2307803	3	108981031	-/TG
MID-1734	rs2307930	6	84476378	-/CCAT
MID-406	rs25630	6	14734341	-/AG
MID-1386	rs2307582	1	247768775	-/AAACTATTCATTTTTCCACCT
MID-1726	rs2307922	1	39896964	-/CAAGAACTATAAT/CACTATCTATTAT
MID-3626	rs11267926	15	45526069	-/AATATAATTTCTCCA
MID-360	rs25584	12	112145217	-/AA
MID-1603	rs2307799	5	70828427	-/TTGT
MID-2719	rs34541393	20	30701405	-/AACT

Fonte: PEREIRA *et al.*, 2012.

Legenda: rs: Código de identificação do marcador genético no banco de dados dbSNP versão 132; MID: Nomenclatura do marcador de acordo com o banco de dados *Marshfield Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms* (MID). Nota: Os *primers* marcados com fluorescência foram divididos em quatro canais (6FAM, VIC, NED e PET). As letras minúsculas dos *primers* não marcados representam sequências de caudas adicionadas aos *primers*.

2.15 Análises estatísticas para verificar a homogeneidade das amostras

Para assegurar a comparabilidade entre os grupos de amostras, foram realizadas análises para verificar a homogeneidade em relação às variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas, como sexo, idade, fração de ejeção, tempo de tratamento, presença de comorbidades e medicamentos utilizados. Para variáveis categóricas, foi utilizado o teste qui-quadrado (MCHUGH, 2013) ou o teste exato de Fisher (KIM, 2017), dependendo do tamanho da amostra e da frequência das categorias. Para variáveis contínuas, foi aplicado o teste t de Student (RUXTON, 2006) para amostras independentes ou a análise de variância (ANOVA) (SULLIVAN *et al.*, 2012).

3 RESULTADOS

3.1 Análises demográficas e clínicas dos pacientes

A tabela 3 contém os principais dados demográficos e clínicos dos pacientes selecionados para o presente estudo. Os participantes do estudo foram divididos em dois grupos: Sacubitril-Valsartan (S/V) (n=30) e Controle (n=35). A idade média dos participantes foi de $66,33 \pm 6,95$ para o grupo S/V e $61,78 \pm 9,43$ anos para o grupo Controle ($p=0,14$). A distribuição de sexo biológico foi semelhante entre os grupos, com uma prevalência de mulheres de 43,3% no grupo S/V e 42,8% no grupo Controle ($p=0,9$).

A fração de ejeção pré-tratamento (FE-pré) apresentou uma média de $28,75 \pm 7,11\%$ no grupo S/V e $33,56 \pm 7,58\%$ no grupo Controle ($p=0,27$). Após o tratamento, a fração de ejeção (FE-pós) aumentou para $39,77 \pm 12,00\%$ no grupo S/V e $38,91 \pm 10,11\%$ no grupo Controle ($p=0,24$). A variação da fração de ejeção ($\Delta FE = FE_{pós} - FE_{pré}$) foi significativamente maior no grupo S/V ($10,11 \pm 12,00\%$) em comparação ao grupo Controle ($4,54 \pm 11,16$) ($p=0,04$). O tempo médio de tratamento foi de $1,93 \pm 1,00$ anos no grupo S/V e $2,31 \pm 1,31$ anos no grupo Controle ($p=0,20$).

As prevalências de comorbidades foram semelhantes entre os grupos, sem diferenças estatisticamente significativas: diabetes (56,7% no grupo S/V *versus* 71,4% no Controle, $p=0,2$), hipertensão (70% *versus* 71,4%, $p=0,9$), obesidade (23,3% *versus* 20%, $p=0,7$), Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (13,3% *versus* 11,4% $p=0,8$), tabagismo (23,3% *versus* 22,8%, $p=0,9$) e etilismo (20% *versus* 8,6%, $p=0,2$).

Os medicamentos utilizados pelos participantes também foram analisados. Não houve diferenças significativas na proporção de uso entre os grupos para antagonistas de mineralocorticoides (80% no grupo S/V *versus* 65,7% no Controle, $p=0,2$), diuréticos tiazídicos (6,7% *versus* 22,8%, $p=0,07$), diuréticos de alça (56,7% *versus* 45,7%, $p=0,6$), nitratos (13,3% *versus* 20%, $p=0,3$), inotrópicos (6,7% *versus* 2,8%, $p=0,6$), antiagregantes plaquetários (63,3% *versus* 71,4%, $p=0,5$), betabloqueadores (93,3% *versus* 97,1%, $p=0,5$) e inibidores de SGLT-2 (36,6% *versus* 37,1%, $p=0,9$).

Em suma, a análise demonstrou que os grupos S/V e Controle eram comparáveis em relação às características basais, com exceção de variação da fração de ejeção (ΔFE), que foi significativamente maior no grupo S/V ($p=0,04$).

Tabela 3: Dados demográficos e clínicos dos pacientes

	S/V (n=30)	Controle (n=35)	p-valor
Idade (média ± dp)	66.33 ± 6.95	61.78 ± 9.43	0.14
Sexo (n(%))			
<i>Feminino</i>	13 (43,3%)	15 (42,8%)	0,9
<i>Masculino</i>	17 (56,7%)	20 (57,2%)	
FE- pré (média ± dp)	28,75 ± 7.11	33,56 ± 7,58	
FE- pós (média ± dp)	39,77 ± 12.00	38,91 ± 10,11	
Δ(FE-Pós - FE-pré)	10,11 ± 12,00	4,54 ± 11,16	0,04
Tempo de tratamento (S/V)	1,93 ± 1,00	2,31 ± 1,31	
Comorbidades (n(%))			
<i>Diabetes</i>	17 (56,7%)	25 (71,4%)	0,2
<i>Hipertensão</i>	21 (70%)	25 (71,4%)	0,9
<i>Obesidade</i>	7 (23,3%)	7 (20%)	0,7
<i>DPOC</i>	4 (13,3%)	4 (11,4%)	0,8
<i>Tabagismo</i>	7 (23,3%)	8 (22,8%)	0,9
<i>Elitismo</i>	6 (20%)	3 (8,6%)	0,2
Grupos de medicamentos			
<i>Antagonista mineralocorticoide</i>	24 (80%)	23 (65,7%)	0,2
<i>Diurético tiazídico</i>	2 (6,7%)	8 (22,8%)	0,07
<i>Diurético de alça</i>	17 (56,7%)	16 (45,7%)	0,6
<i>Nitrato</i>	4 (13,3%)	7 (20%)	0,3
<i>Inotrópico</i>	2 (6,7%)	1 (2,8%)	0,6
<i>Antiagregante plaquetário</i>	19 (63,3%)	25 (71,4%)	0,5
<i>Betabloqueador</i>	28 (93,3%)	34 (97,1%)	0,5
<i>Inibidor de SGLT-2</i>	11 (36,6%)	13 (37,1%)	0,9

Fonte: A autora, 2025

Legenda: S/V: Sacubitril/Valsartan; FE: Fração de ejeção; Δ: símbolo de diferença; n= número de indivíduos; DP: desvio padrão; DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; SGLT-2: co-transportador de sódio-glicose tipo 2.

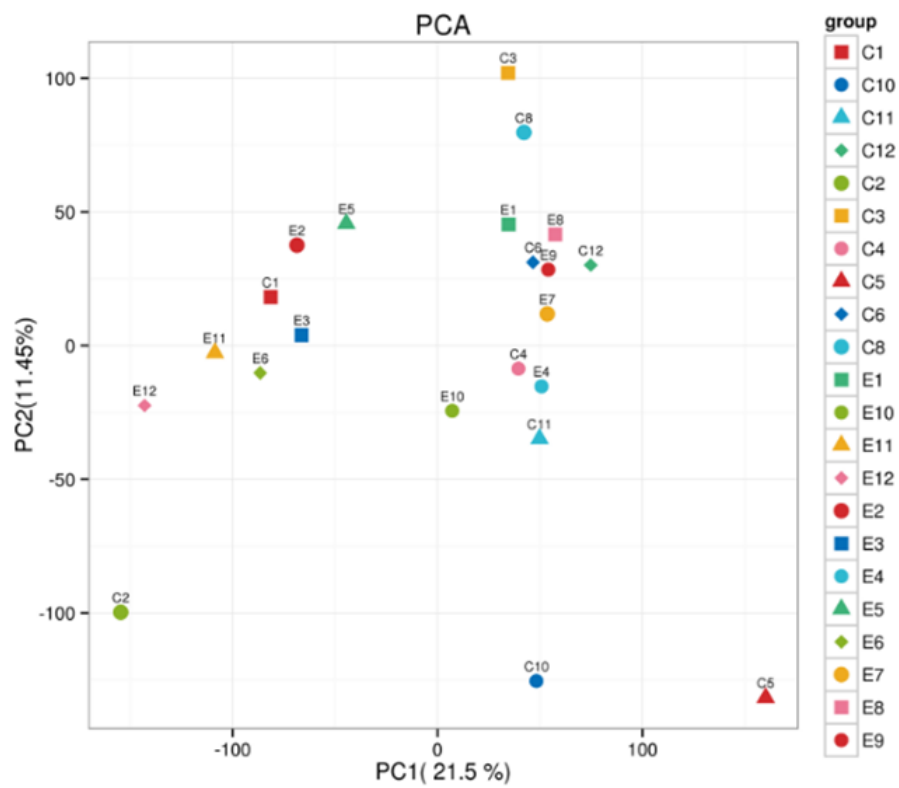
3.2 Análise de Componentes Principais

O gráfico de PCA (Análise de Componentes Principais) (Figura 4) apresenta a distribuição dos grupos experimentais, sendo o grupo E tratado com Sacubitril/Valsartan e o grupo C representando o controle. Os dois primeiros componentes principais, PC1 (21,5%) e PC2 (11,45%), explicam conjuntamente 32,95% da variância total dos dados, permitindo uma visualização das principais diferenças entre os grupos.

Observa-se uma separação parcial entre os grupos E e C no espaço PCA, com alguns *clusters* claramente definidos. Por exemplo, indivíduos dos subgrupos E3, E5 e E7 mostram certa proximidade, sugerindo respostas similares ao tratamento com Sacubitril/Valsartan. O grupo Controle (C), em contraste, apresenta uma maior dispersão em alguns subgrupos, como C2, que se distancia significativamente no eixo PC2.

O grupo Sacubitril/Valsartan (E, de entresto, nome comercial do Sacubitril/Valsartan) apresenta uma distribuição relativamente coesa no espaço PCA, especialmente em subgrupos como E4 e E10, indicando menor variabilidade nas características analisadas entre os indivíduos tratados. No grupo C, subgrupos como C5 e C3 aparecem em extremos de PC1, possivelmente indicando maior variabilidade em características basais ou respostas menos uniformes.

Figura 4: Gráfico de componentes principais dos grupos E (Sacubitril/Valsartan) e C (Controle)

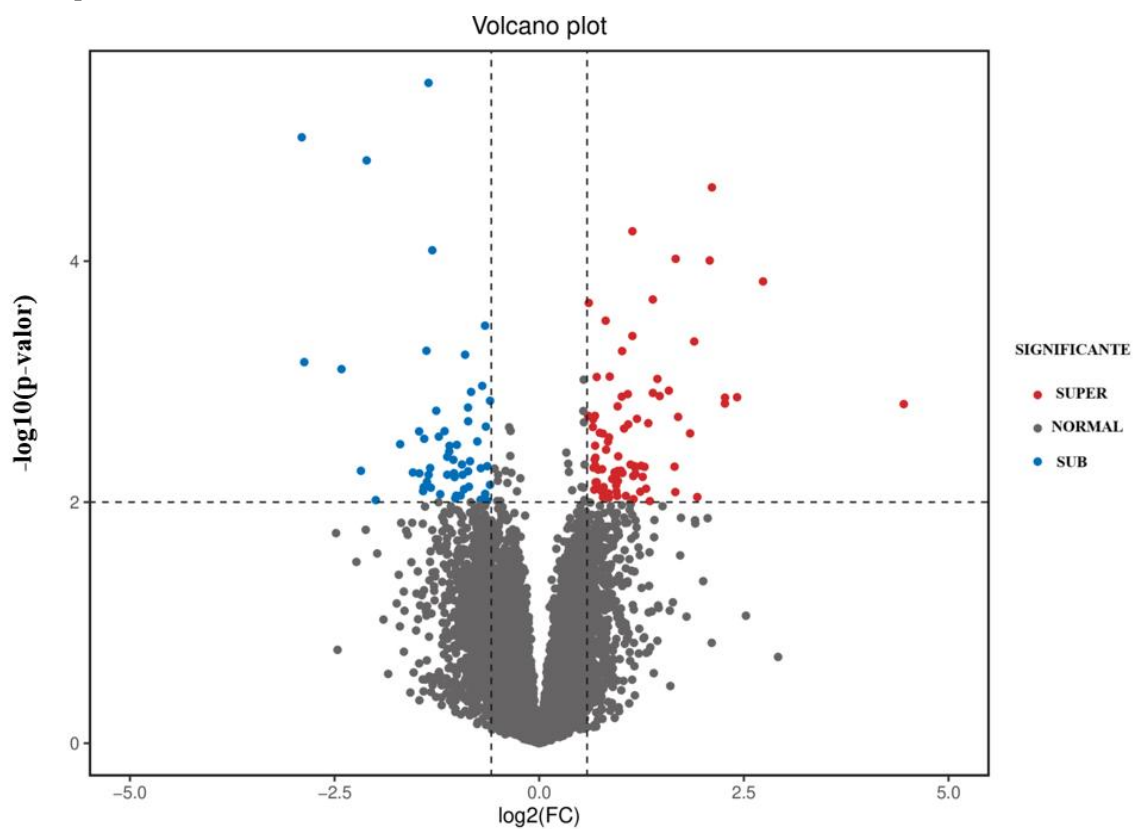


Fonte: A autora, 2025

3.3 Análise de expressão diferencial

Após os critérios de filtragem aplicados ($\text{Fold Change} \geq 1,0$ e valor de $p < 0,05$), as análises preliminares evidenciaram 75 DEGs entre os grupos S/V e Controle (Figura 5). Contudo, após a exclusão de genes novos, que ainda não foram registrados nos bancos de dados oficiais, restaram 56, dos quais 52 encontraram-se superexpressos e 4 subexpressos (Tabela 4).

Figura 5: VolcanoPlot dos 75 genes diferencialmente expressos entre os grupos, incluindo os super e subexpressos.



Fonte: A autora, 2025

Tabela 4: Grupos de DEGs classificados quanto ao nível de expressão

Símbolos	Nível de expressão
<i>IRF2BPL, GP1BB, S100A6, NDUFB6, CXCL6, H3C12, TLCD4, TIGD7, RTP4, SLC30A1, CEBPB, CEBPD, HBD, CMTM2, MED30, H3C8, RPL31, CCDC85B, JCHAIN, H4C1, XCL2, RPS29, CTU1, TRAPPC5, PIGBOS1, SNRPG, H1-10, BASP1, H3C2, RPS21, H4C12, ASCL2, S100P, NECTIN2, CALHM6, H3C3, RPL35A, H4C11, RPL39, ROMO1, TMEM170B, COL9A3, FADD, S100A12, LY96, TNFRSF17, COMMD8, SEC61G, ANTKMT, SMIM27, HBB, ENSG00000284292</i>	Superexpressos
<i>IGLL5, ENSG00000284931, SPATS2L, BICDL2</i>	Subexpressos

Fonte: A autora, 2025

3.4 Análise de enriquecimento funcional de processos biológicos pelo banco de dados Gene Ontology

A análise de enriquecimento funcional, por sua vez, contribuiu para estabelecer possíveis relações entre os DEGs encontrados com processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares. A tabela 5 e a figura 6 mostram quais processos biológicos possuem maior relevância estatística. Esses dados foram gerados através do banco de dados *Gene Ontology* (GO). Esses resultados sugerem a prevalência de processos associados à tradução proteica, resposta imune e transporte de gases no contexto analisado.

O termo mais significativo foi "Tradução citoplasmática" (GO:0002181), com um q-valor extremamente baixo (0,006985) e um escore combinado elevado (169,97), destacando a importância da síntese de proteínas no contexto estudado.

Os resultados também apontaram para a importância da resposta imune, com termos como "Resposta humoral antimicrobiana" (GO:0019730) (q-valor = 0,01109, EC = 152,17) e "Resposta humoral antimicrobiana mediada por peptídeos antimicrobianos" (GO:0043043) (q-valor = 0,01109, EC = 168,28). Esses termos indicam a ativação de mecanismos de defesa imune, sugerindo um possível papel desses genes na resposta a infecções bacterianas ou outros estímulos antimicrobianos.

Adicionalmente, processos relacionados à biossíntese foram enriquecidos, incluindo "Processo de biossíntese de peptídeos" (GO:0043043) (q-valor = 0,02414, EC = 74,30) e "Processo de biossíntese de macromoléculas" (GO:0009059) (q-valor = 0,03372, EC = 58,47), indicando a importância desses processos nas diferenças entre os grupos. Outro destaque foi o termo "Transporte de Oxigênio" (GO:0015671), que apresentou um dos escores combinados mais altos (504,62) e uma razão de chances elevada (RC = 68,21), com um q-valor igual a 0,03372. O termo "Transporte de Dióxido de Carbono" (GO:0015670) (q-valor: 0,03528), também foi identificado com escore combinado de 436,51, sugerindo uma regulação significativa do transporte de gases no contexto biológico avaliado.

Esses resultados, em conjunto, indicam uma integração de processos fundamentais, como tradução de proteínas, resposta imune e transporte de gases, sugerindo que esses genes desempenham papéis críticos no contexto da resposta farmacológica ao Sacubitril/Valsartan em pacientes com IC-FEr.

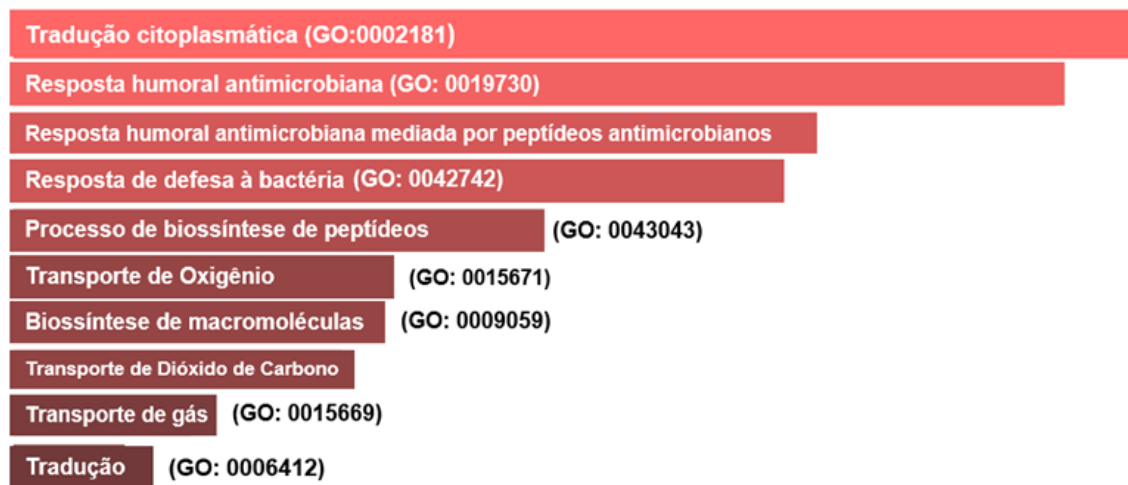
Tabela 5: Análise de enriquecimento funcional de processos biológicos identificados

Índice	Nome	p-valor	q-valor	RC	EC
1	Tradução citoplasmática (GO:0002181)	0.00002604	0.006985	16.10	169.97
2	Resposta humoral antimicrobiana (GO:0019730)	0.00003696	0.006985	14.91	152.17
3	Resposta humoral antimicrobiana mediada por peptídeos antimicrobianos (GO:0043043)	0.0001038	0.01109	18.35	168.28
4	Resposta de defesa à bactéria (GO:0042742)	0.0001173	0.01109	8.66	78.41
5	Processo de biossíntese de peptídeos (GO:0043043)	0.0003192	0.02414	9.23	74.30
6	Transporte de Oxigênio (GO:0015671)	0.0006123	0.03372	68.21	504.62
7	Processo de biossíntese de macromoléculas (GO:0009059)	0.0006244	0.03372	7.92	58.47
8	Transporte de Dióxido de Carbono (GO:0015670)	0.0007466	0.03528	60.63	436.51
9	Transporte de gás (GO:0015669)	0.001412	0.05929	41.96	275.41
10	Tradução (GO:0006412)	0.001864	0.07046	6.14	38.61

Fonte: A autora, 2025

Abreviatura: RC: Razão de chances; EC: Escore combinado.

Figura 6: Processos biológicos associados aos genes diferencialmente expressos, anotados por nível de significância



Fonte: A autora, 2025

3.5 Análise de enriquecimento funcional de componentes celulares pelo banco de dados Gene Ontology

A Tabela 6 e a figura 7 apresentam os dez principais termos do GO relacionados aos componentes celulares identificados, classificados com base no p-valor ajustado (q-valor) e no escore combinado. Os resultados evidenciam o envolvimento predominante de estruturas ribossômicas e componentes relacionados à tradução e sinalização intracelular. Os termos mais relevantes incluíram "Ribossomo Polissômico" (GO:0042788), com o menor q-valor (0,0002441) e o maior escore combinado (587,05), e "Ribossomo" (GO:0005840), com um q-valor de 0,002833 e escore combinado de 185,02. Esses resultados destacam a importância do maquinário ribossômico, possivelmente indicando uma regulação aumentada da tradução de proteínas no contexto estudado.

Outros termos de destaque incluíram "Subunidade Ribossômica Grande" (GO:0015934) e "Subunidade Ribossômica Grande Citossólica" (GO:0022625), ambos com q-valor de 0,01717 e escore combinado de 117,08. Esses termos sugerem uma contribuição específica de subunidades ribossômicas na modulação da atividade translacional.

Esses resultados reforçam a hipótese de que os genes analisados desempenham papéis centrais na regulação de processos fundamentais, como tradução de proteínas, organização celular e resposta à sinalização, sendo especialmente relevantes no contexto da IC e da resposta medicamentosa diferenciada ao Sacubitril/Valsartan

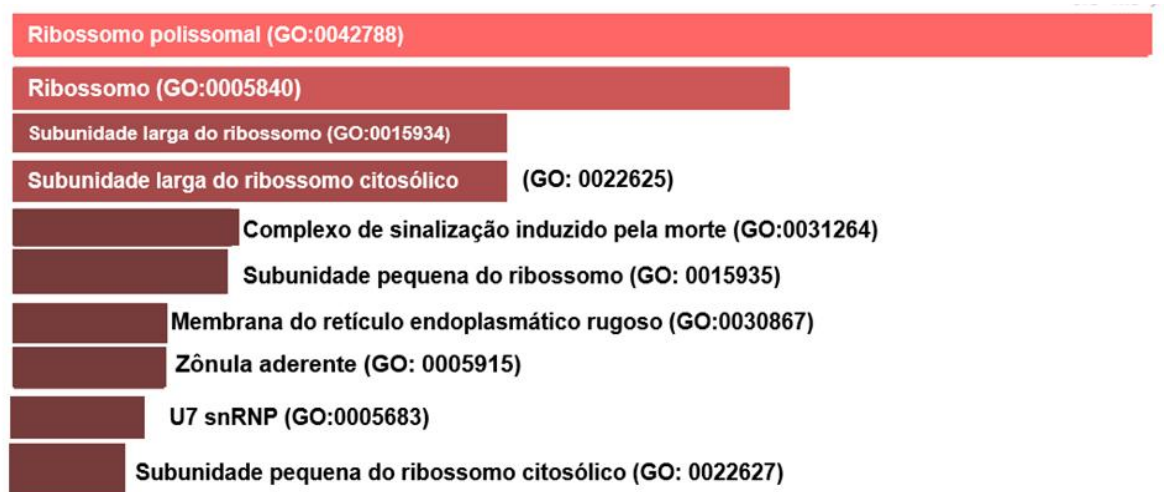
Tabela 6: Análise de enriquecimento funcional de componentes celulares identificados

Índice	Nome	P-valor	q-valor	RC	EC
1	Ribossomo Polissômico (GO:0042788)	0.000003488	0.0002441	46.72	587.05
2	Ribossomo (GO:0005840)	0.00008095	0.002833	19.64	185.02
3	Subunidade Ribossômica Grande (GO:0015934)	0.0009809	0.01717	16.90	117.08
4	Subunidade Ribossômica Grande Citossólica (GO:0022625)	0.0009809	0.01717	16.90	117.08
5	Subunidade Ribossômica Pequena Citossólica (GO:0022627)	0.01035	0.1265	13.97	63.85
6	Subunidade Ribossômica Pequena (GO:0015935)	0.01084	0.1265	13.62	61.62
7	Membrana do Retículo Endoplasmático Rugoso (GO:0030867)	0.01861	0.1629	67.30	268.12
8	Zônula de Adesão (GO:0005915)	0.01861	0.1629	67.30	268.12
9	U7 snRNP (GO:0005683)	0.02229	0.1734	53.84	204.77
10	Complexo de Sinalização Indutor de Morte (GO:0031264)	0.02596	0.1817	44.86	163.80

Fonte: A autora, 2025

Abreviatura: RC: Razão de chances; EC: Escore combinado.

Figura 7: Componentes celulares associados aos genes diferencialmente expressos, anotados por nível de significância



Fonte: A autora, 2025

3.6 Análise de enriquecimento funcional de funções moleculares pelo banco de dados Gene Ontology

A tabela 7 apresenta uma análise funcional de termos do GO associados a funções moleculares. Nenhum termo alcançou significância estatística após ajuste para múltiplos testes. Como não houve relevância estatística na presente análise, não foi gerada a figura correspondente.

Tabela 7: Análise de enriquecimento funcional de componentes celulares identificados

Índice	Nome	Valor p	q-valor	RC	EC
1	Ligação de DNA Específica de Sequência na Região Reguladora de Transcrição da RNA Polimerase II (GO:0000977)	0,846	0,8458	0,64	0,11
2	Ligação de DNA Específica de Sequência na Região Cis-Reguladora (GO:0000987)	0,787	0,813	0,72	0,17
3	Atividade de Transferase de Ubiquitina-Proteína (GO:0004842)	0,791	0,813	0,64	0,15
4	Ligação de DNA Específica de Sequência na Região Cis-Reguladora da RNA Polimerase II (GO:0000978)	0,8	0,813	0,7	0,16
5	Atividade de Ligase de Proteína Ubiquitina (GO:0061630)	0,692	0,7505	0,86	0,31
6	Atividade de Ligase de Proteína Semelhante à Ubiquitina (GO:0061659)	0,701	0,7505	0,83	0,3
7	Ligação de DNA Específica de Sequência (GO:0043565)	0,507	0,5687	1,12	0,76
8	Ligação de Íon de Metal de Transição (GO:0046914)	0,513	0,5687	1,18	0,78
9	Ligação de Íon de Magnésio (GO:0000287)	0,443	0,5095	1,73	1,41
10	Ligação de Receptor Acoplado à Proteína G (GO:0001664)	0,41	0,4811	1,92	1,71

Fonte: A autora, 2025

Abreviatura: RC: Razão de chances; EC: Escore combinado.

3.7 Análise de enriquecimento funcional de processos biológicos pelo banco de dados KEGG

A tabela 8 e a figura 8 apresentam os resultados de uma análise de enriquecimento funcional baseada no banco de dados KEGG, destacando as vias biológicas mais relevantes associadas ao conjunto de genes analisados. A análise revelou "Lúpus eritematoso sistêmico" como a via mais enriquecida, com o menor q-valor (0,00005029), uma razão de chances de 15,92 e um escore combinado de 224,76. Esses resultados sugerem uma associação significativa entre os genes analisados e processos relacionados a doenças autoimunes. A segunda via mais significativa foi "Alcoolismo", com um q-valor de 0,0001575, indicando a relevância de processos metabólicos associados ao álcool.

Outra via de destaque foi "Formação de redes extracelulares de neutrófilos", que também apresentou um q-valor de 0,0001575 e uma razão de chances de 11,17. Essa via está relacionada à resposta imune inata, sugerindo um possível envolvimento dos genes analisados em processos inflamatórios.

As vias relacionadas à tradução proteica, como "Ribossomo" e à regulação de processos celulares, como "Desregulação transcricional no câncer", também apresentaram enriquecimento significativo, q- valores de 0,005427 e 0,01054, respectivamente. Esses achados apontam para a importância desses processos no contexto funcional do conjunto de genes analisados.

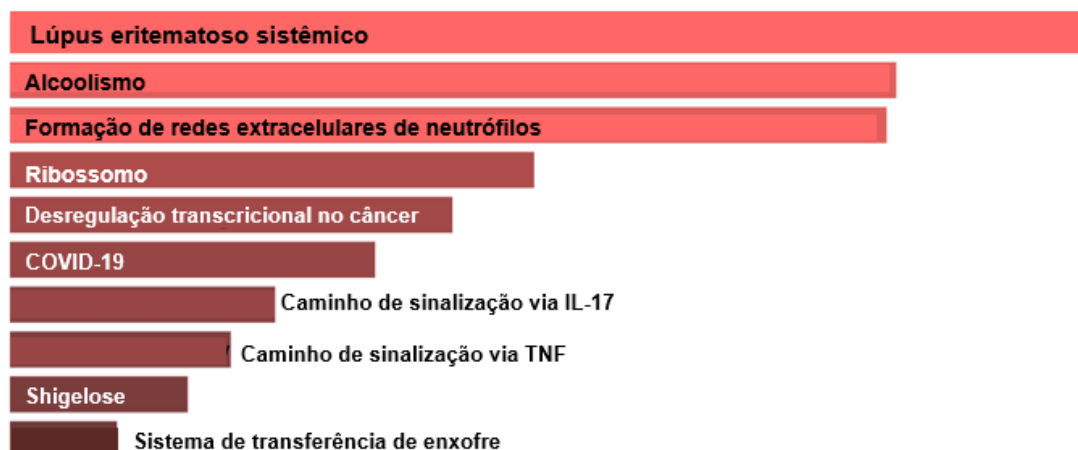
Outras vias, como "COVID-19", "Caminho de sinalização via IL-17" e "Caminho de sinalização via TNF", apresentaram ajustados-valores entre 0,01 e 0,05, reforçando sua relevância biológica em processos inflamatórios e imunológicos.

Tabela 8: Análise de enriquecimento de vias do banco de dados KEGG

Índice	Nome	P-valor	q valor	RC	EC
1	Lúpus eritematoso sistêmico	7,40E-04	0.00005029	15.92	224.76
2	Alcoolismo	0.00006256	0.0001575	11.36	136.06
3	Formação de redes extracelulares de neutrófilos	0.00006948	0.0001575	11.17	132.63
4	Ribossomo	0.0003192	0.005427	9.23	74.30
5	Desregulação transcricional no câncer	0.0007754	0.01054	7.54	54.00
6	COVID-19	0.001795	0.02035	6.20	39.19
7	Caminho de sinalização via IL-17	0.005317	0.05165	9.08	47.56
8	Caminho de sinalização via TNF	0.008617	0.07325	7.57	36.01
9	Shigelose	0.01374	0.1038	4.58	19.65
10	Sistema de transferência de enxofre	0.02961	0.2014	38.45	135.33

Fonte: A autora, 2025

Abreviatura: RC: Razão de chances; EC: Escore combinado.

Figura 8: Análise de enriquecimento de vias do banco de dados KEGG

Fonte: A autora, 2025

3.8 Análise de enriquecimento funcional do *Reactome*

A tabela 9 e a figura 9 apresentam os resultados da análise de enriquecimento funcional utilizando a base de dados *Reactome*, destacando as vias mais relevantes associadas ao conjunto de genes analisados. Os resultados destacam vias funcionais altamente significativas e biologicamente relevantes. A via mais proeminente foi "Resposta do EIF2AK4 à deficiência de aminoácidos", que apresentou um q-valor de 0,0009206, uma razão de chances de 17,24 e um escore combinado de 219,95. Esses achados sugerem uma forte associação entre esta via e os genes analisados, indicando um papel essencial na resposta celular ao estresse nutricional. Outra via de destaque foi "Proteína co-traducional dependente de SRP direcionada à membrana", que também apresentou alta significância estatística, com valores semelhantes de q e uma razão de chances de 15,25, apontando para sua importância na translocação de proteínas.

Além disso, diversas vias relacionadas à tradução proteica apresentaram enriquecimento notável. Entre elas, destacam-se "Alongamento da cadeia polipeptídica", com um q-valor de 0,001477 e escore combinado de 167,23, e "Terminação da tradução eucariótica", que compartilhou valores estatísticos semelhantes. Tais resultados sugerem que o conjunto de genes analisado está intrinsecamente ligado a processos essenciais de síntese e modificação proteica.

A análise também revelou vias associadas à resposta a condições de estresse, como "Resposta celular à fome", que apresentou uma razão de chances de 11,09 e um q-valor de 0,001477. Este achado reforça a hipótese de que os genes analisados desempenham papéis importantes na adaptação celular a condições de privação de nutrientes. Ademais, vias como "Síntese de selenocisteína" e "Decaimento mediado por códon de parada prematuro" também se destacaram, com escores combinados superiores a 150, apontando para sua participação em processos de controle da tradução.

Os resultados indicam que o conjunto de genes analisado está associado a vias funcionais críticas, incluindo processos de tradução proteica, resposta ao estresse nutricional e regulação de RNAm. O baixo q-valor para várias vias ressalta sua significância estatística, enquanto os escores combinados elevados reforçam sua relevância biológica. Esses achados sugerem que os genes envolvidos desempenham papéis cruciais na manutenção da homeostase celular e nos mecanismos de resposta ao estresse.

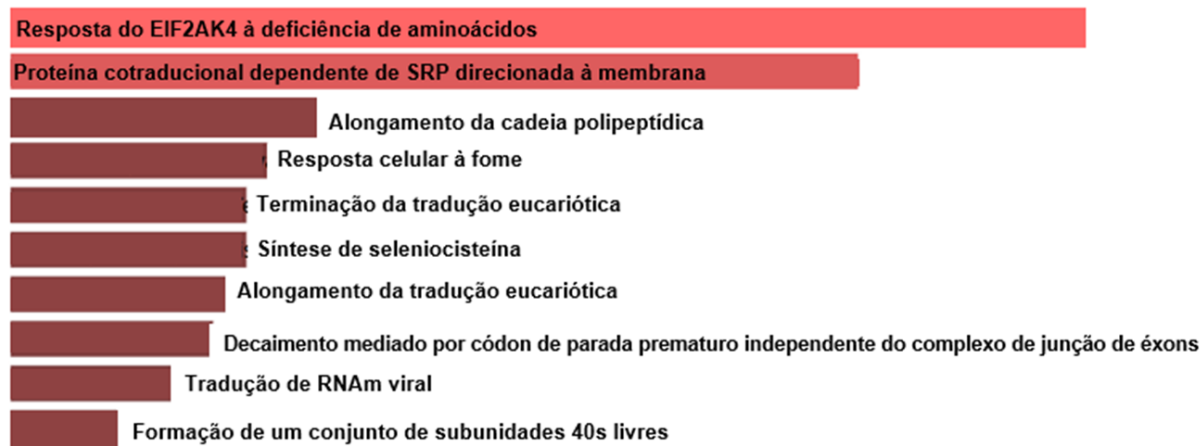
Tabela 9: Análise de Enriquecimento de vias do *Reactome*

Índice	Nome	P valor	q valor	RC	EC
1	Resposta do EIF2AK4 à deficiência de aminoácidos	0,00002876	0,0009206	17,24	219,95
2	Proteína cotraduccional dependente de SRP direcionada à membrana	0,0000563	0,0009206	15,25	184,28
3	Alongamento da cadeia polipeptídica	0,00002742	0,001477	15,92	167,23
4	Resposta celular à fome	0,00003155	0,001477	11,09	114,95
5	Terminação da tradução eucariótica	0,00003353	0,001477	15,23	156,94
6	Síntese de selenocisteína	0,00003353	0,001477	15,23	156,94
7	Alongamento da tradução eucariótica	0,00003521	0,001477	15,07	154,52
8	Decaimento mediado por códon de parada prematuro independente do complexo de junção de éxons	0,00003696	0,001477	14,91	152,17
9	Tradução de RNAm viral	0,00004065	0,001477	14,6	147,62
10	Formação de um conjunto de subunidades 40s livres	0,00004888	0,001598	14,02	139,16

Fonte: A autora, 2025

Abreviatura: RC: Razão de chances; EC: Escore combinado.

Figura 9: Análise de Enriquecimento de vias do banco de dados Reactome

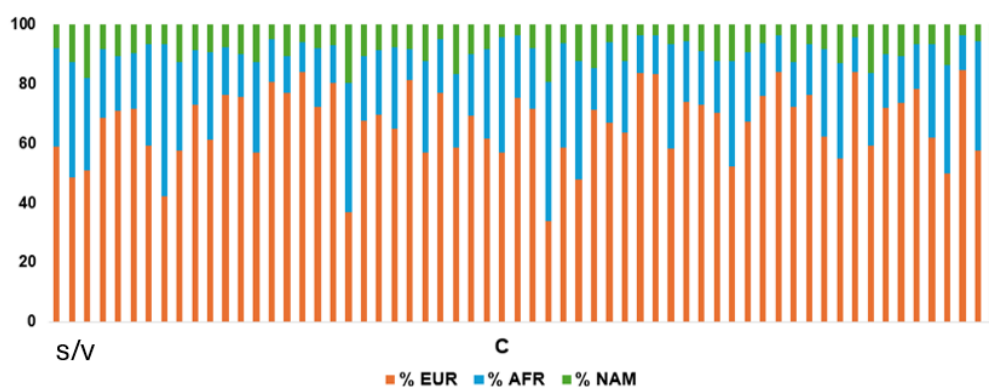


Fonte: A autora, 2025

3.9 Identificação dos perfis de AIMs-InDels

As informações alélicas, relativas aos marcadores AIMs-InDels, de cada indivíduo foram processadas pelo *software* STRUCTURE v.2.3.4, o qual permitiu a comparação do perfil alélico dos indivíduos a três populações referências (africana, europeia e nativo-americana). Os resultados das amostras caso e controle podem ser vistos na figura 10 e tabela 10.

Figura 10: Perfil de ancestralidade dos grupos S/V e controle



Fonte: A autora, 2025

Em relação ao perfil de ancestralidade genômica, observou-se que a componente da ancestralidade europeia foi predominante ($EUR > 60\%$) em todos os grupos estudados, enquanto a componente de ancestralidade nativo-americana apresentou o menor percentual de contribuição. Quando todas as porcentagens das componentes de contribuição europeia, africana e nativo-americana foram comparadas entre o grupo S/V e Controle, não se observou diferenças estatisticamente significativas, indicando que ambos os grupos são homogêneos quanto à ancestralidade;

Tabela 10: Perfil de ancestralidade dos grupos S/V e controle

	Entresto	Controle	p valor
%EUR <i>média ± dp</i>	65,8 ± 11,9	67,6 ± 12,1	> 0.05
%AFR <i>média ± dp</i>	24,3 ± 10,0	23,7 ± 9,9	> 0.05
%NAM <i>média ± dp</i>	9,9 ± 3	8,71±4,15	> 0.05

Fonte: A autora, 2025

Abreviatura: RC: Razão de chances; EC: Escore combinado.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou as bases genéticas da resposta ao tratamento com Sacubitril/Valsartan em pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida (IC-FEr), comparando com terapias convencionais. Foram realizadas análises transcriptômicas via RNA-Seq e avaliação da ancestralidade genômica dos indivíduos para minimizar vieses populacionais. Os resultados apontaram diferenças significativas na expressão de genes relacionados à sinalização celular e tradução proteica, com destaque para vias como a formação de redes extracelulares de neutrófilos e a síntese de selenocisteína.

4.1 Dados clínicos e demográficos dos pacientes

Neste estudo, foi avaliada a eficácia do tratamento com S/V em comparação ao grupo Controle, analisando características basais, comorbidades, uso de outros medicamentos e alterações na fração de ejeção (FE). Apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas em muitas das variáveis analisadas, a variação na fração de ejeção (Δ FE) foi significativamente maior no grupo S/V, sugerindo um benefício potencial dessa intervenção em pacientes com disfunção ventricular (tabela3).

A média de idade foi ligeiramente maior no grupo S/V ($66,33 \pm 6,95$ anos) em comparação ao grupo Controle ($61,78 \pm 9,43$), mas essa diferença não atingiu significância estatística ($p=0,14$) (tabela3). Essa característica é consistente com outros estudos que avaliam intervenções similares, onde diferenças demográficas entre grupos são comuns, mas não impactam a validade dos resultados quando ajustadas estatisticamente ou consideradas na interpretação clínica (BARRETTO; WAJNGARTEN, 1998; BALIEIRO *et al.*, 2009).

A análise das comorbidades revelou frequências semelhantes entre os grupos, como diabetes (56,7% no grupo S/V *versus* 71,4% no Controle, $p=0,2$) e hipertensão (70% *versus* 71,4%, $p=0,9$) (tabela3), reforçando que os grupos eram comparáveis em termos de fatores de risco cardiovascular. Esses achados indicam que qualquer diferença observada na resposta ao tratamento provavelmente não se deve a desequilíbrios nas condições basais.

O aumento significativo na fração de ejeção no grupo S/V ($\Delta FE=10,11\pm 12,00\%$ em comparação ao grupo Controle ($4,54\pm 11,16\%$, $p=0,04$) (tabela 3) é um achado de destaque e está em linha com estudos anteriores que demonstraram os benefícios do S/V na remodelação cardíaca. Por exemplo, no estudo PARADIGM-HF, o uso de S/V foi associado a melhorias significativas na função cardíaca, atribuídas à sua ação combinada de inibição da neprilisina e bloqueio dos receptores de angiotensina. Esses mecanismos contribuem para a redução da sobrecarga ventricular, diminuição da fibrose e melhora da contratilidade miocárdica (MCMURRAY *et al.*, 2014; GUHA *et al.*, 2016). O tempo de tratamento entre os grupos também não demonstrou diferença estatisticamente significativa, assim como os dados referentes ao uso de medicamentos.

O Sacubitril/Valsartan é administrado como um pró-fármaco que, após a ingestão, é rapidamente hidrolisado em Sacubitril (um inibidor da neprilisina) e Valsartan (um bloqueador do receptor de angiotensina II, AT1). A ação combinada dessas moléculas reduz a sobrecarga cardíaca e melhora a função ventricular, o que está diretamente relacionado ao aumento significativo na fração de ejeção ($\Delta FE_{pós} - FE_{pré}$) observado no grupo tratado. O benefício na remodelação cardíaca pode ser atribuído à redução do estresse cardíaco, ao equilíbrio do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e à preservação dos peptídeos natriuréticos.

Por outro lado, algumas limitações devem ser consideradas. Primeiro, a amostra relativamente pequena pode limitar o poder estatístico para identificar diferenças em variáveis secundárias, como o uso de medicamentos e comorbidades. Além disso, a ausência de aleatorização pode introduzir vieses não controlados, embora os grupos tenham sido semelhantes em características basais.

Os resultados, por sua vez, reforçam o benefício do S/V na remodelação ventricular, particularmente em pacientes com fração de ejeção reduzida. Estudos futuros com maior tamanho amostral e seguimento prolongado podem oferecer uma avaliação mais robusta dos impactos clínicos, especialmente em desfechos duros, como mortalidade e hospitalizações por IC.

4.2 Análise de enriquecimento - Gene Ontology

Os processos biológicos “tradução citoplasmática” (GO:0002181) e “tradução” (GO:0006412) (Tabela 5) estão relacionados à síntese de proteínas no citoplasma e são essenciais para a manutenção da homeostase celular. Na IC, há uma regulação alterada da síntese de proteínas devido ao estresse oxidativo, inflamação e remodelamento cardíaco. O Sacubitril/Valsartan, por reduzir o estresse cardíaco através do bloqueio da neprilisina e do receptor AT1 da angiotensina II, pode contribuir para restaurar a homeostase da tradução proteica (CHEN *et al.*, 2022; ALVES *et al.*, 2022; SHI *et al.*, 2023).

Além disso, a resposta humoral antimicrobiana (GO:0019730), mediada por peptídeos antimicrobianos (GO:0043043), e a resposta de defesa à bactéria (GO:0042742) (tabela 5) indicam a importância do sistema imune inato. Na IC, o estado inflamatório crônico pode enfraquecer essas defesas, mas a ação anti-inflamatória de Sacubitril, ao aumentar os níveis de peptídeos natriuréticos, pode ajudar a modular positivamente as respostas imunológicas (JIANG *et al.*, 2022).

Os processos de biossíntese de peptídeos (GO:0043043) e macromoléculas (GO:0009059) (tabela 5) são cruciais para a reparação tecidual e a manutenção do coração em situações de estresse. Na IC, há frequentemente um desequilíbrio nessas vias, e Sacubitril/Valsartan pode atuar favorecendo a recuperação e reparação celular por meio de efeitos cardioprotetores (SINGH *et al.*, 2017).

Por fim, o transporte de oxigênio (GO:0015671), dióxido de carbono (GO:0015670) e gases (GO:0015669) (tabela 5) são processos vitais para a troca gasosa e o metabolismo energético. A IC prejudica esses mecanismos, devido à redução da perfusão tecidual, mas Sacubitril/Valsartan, ao melhorar a função cardíaca, pode contribuir para a restauração da eficiência do transporte de gases (GONÇALVES *et al.*, 2020; NOUGUÉ *et al.*, 2023).

Com relação a esse achado é interessante ressaltar que a ampla distribuição do Valsartan no tecido cardíaco é essencial para modular os receptores AT1 localizados nos cardiomiócitos e nos vasos sanguíneos. Paralelamente, o Sacubitril aumenta os níveis de peptídeos natriuréticos circulantes, que atuam em processos como a biossíntese de proteínas e o transporte de oxigênio. Esses efeitos farmacocinéticos são alinhados aos

achados relacionados à melhora do transporte de gases e à reparação tecidual observados no estudo.

Em síntese, os processos biológicos interligados são fundamentais para a compreensão da fisiopatologia da IC e os efeitos terapêuticos do Sacubitril/Valsartan, que demonstram atuar de maneira integrada para melhorar desfechos clínicos e a qualidade de vida dos pacientes.

Com relação à análise de enriquecimento voltada para componentes celulares, os termos relacionados à estrutura e função dos ribossomos refletem processos fundamentais para a síntese de proteínas e são cruciais em situações de estresse celular, como ocorre na IC. O ribossomo polissômico (GO:0042788) (tabela 5), que envolve múltiplos ribossomos atuando simultaneamente na tradução de um único RNA mensageiro, é uma estratégia eficiente para aumentar a produção proteica. Na IC, essa dinâmica pode estar alterada, devido ao remodelamento celular ou à inflamação, impactando negativamente a síntese de proteínas essenciais para a função cardíaca. A restauração desse processo é essencial para a regeneração tecidual e a homeostase (AZEVEDO *et al.*, 2016).

O ribossomo (GO:0005840) (tabela 6), como organela central da tradução, desempenha um papel essencial na expressão gênica. Em condições de IC, o estresse metabólico e o desequilíbrio energético afetam a capacidade funcional do ribossomo, prejudicando a síntese de proteínas necessárias para reparar o tecido cardíaco e manter a função contrátil. Intervenções terapêuticas que promovem a eficiência ribossômica, direta ou indiretamente, podem contribuir para a recuperação celular (GHOSH; SHCHERBIK, 2020; CHEN *et al.*, 2022).

A subunidade ribossômica grande (GO:0015934) e sua contraparte específica do citosol (GO:0022625) (tabela 6), são componentes estruturais críticos no mecanismo de tradução. Elas facilitam a formação de ligações peptídicas e o alongamento da cadeia proteica durante a tradução. Alterações na funcionalidade dessas subunidades, como as que podem ocorrer em estados patológicos, afetam a produção de proteínas cardíacas importantes, incluindo aquelas envolvidas na contratilidade e no reparo celular (GHOSH; SHCHERBIK, 2020).

No contexto da IC, o estresse oxidativo, a inflamação e a sobrecarga mecânica podem interferir nesses processos moleculares, contribuindo para a disfunção cardíaca progressiva. Estratégias terapêuticas, como o uso de Sacubitril/Valsartan, que reduzem o estresse celular e promovem a homeostase proteica, podem atuar de forma indireta, beneficiando os processos relacionados aos ribossomos e restaurando a capacidade de

resposta adaptativa das células cardíacas. Dessa forma, os ribossomos e suas subunidades desempenham papéis indispensáveis para a saúde celular, particularmente em tecidos como o cardíaco, que requerem alta capacidade de síntese proteica para responder ao estresse e manter sua função vital (PLATA-MOSQUERA *et al.*, 2021; NOUGUÉ *et al.*, 2023)

Os processos relacionados à ligação de DNA, como "Ligação de DNA Específica de Sequência" (GO:0043565) (tabela 7) e subcategorias, estão ligados à regulação transcricional e podem refletir ajustes adaptativos na expressão gênica em resposta ao tratamento. O Sacubitril/Valsartan, ao reduzir o estresse oxidativo e melhorar a função cardíaca, pode modular vias de expressão gênica associadas ao remodelamento cardíaco. De forma semelhante, a "Atividade de Ligase de Ubiquitina/Proteína" (GO:0004842, GO:0061630, GO:0061659) (tabela 7) destaca a relevância da ubiquitinação na degradação de proteínas danificadas e no controle da qualidade proteica, aspectos frequentemente comprometidos na IC. A tendência observada nesses processos sugere que o tratamento pode influenciar positivamente a homeostase proteica e a função celular (NISHIDA *et al.*, 2015; IBORRA-EGEA, 2017).

A ligação de íons metálicos, como magnésio (GO:0046914, GO:0000287) (tabela 7), também se destaca, dada a sua importância para a função enzimática e contratilidade cardíaca. A tendência de aumento na razão de chances para essas categorias pode refletir um impacto benéfico do tratamento na homeostase enzimática e iônica, componentes essenciais para a função cardíaca eficiente. Por fim, a "Ligação de Receptor Acoplado à Proteína G" (GO:0001664) (tabela 7), envolvida em vias de sinalização cardiovascular, pode estar associada à regulação de respostas a angiotensina II e peptídeos natriuréticos, reforçando os mecanismos de cardioproteção promovidos pelo Sacubitril/Valsartan (SEVERINO *et al.*, 2020).

O Sacubitril/Valsartan atua reduzindo a pressão de enchimento ventricular, melhorando a função cardíaca e modulando processos inflamatórios e fibróticos por meio de seus efeitos sobre os peptídeos natriuréticos e o sistema renina-angiotensina-aldosterona. As tendências observadas, mesmo que não estatisticamente significativas, podem indicar sutis ajustes fisiológicos que refletem esses mecanismos. Tais resultados destacam a necessidade de estudos futuros com amostras maiores ou metodologias mais específicas, para explorar de forma mais detalhada os efeitos do tratamento em vias moleculares específicas. Assim, mesmo sem significância estatística, os dados sugerem

direções promissoras para investigações futuras sobre os impactos do Sacubitril/Valsartan na IC.

4.3 Análise de enriquecimento - KEGG

Por fim, os resultados da análise de enriquecimento KEGG revelam processos e vias moleculares altamente enriquecidos, muitos dos quais possuem implicações diretas e indiretas nos mecanismos fisiopatológicos associados à IC e aos potenciais efeitos terapêuticos do Sacubitril/Valsartan. Esses processos abrangem desde alterações inflamatórias e imunológicas até vias de sinalização celular e remodelamento tecidual, destacando a complexidade das respostas celulares em condições de estresse metabólico e inflamatório.

A identificação do "Lúpus eritematoso sistêmico" como a via mais significativamente enriquecida ($q = 0,00005029$; $RC = 15,92$) (Tabela 8) pode refletir a ativação de respostas imunológicas e inflamatórias na IC. Embora o lúpus seja uma doença autoimune específica, muitas de suas vias inflamatórias sobrepostas, como a ativação de células T e B, estão também associadas ao remodelamento cardíaco e à inflamação sistêmica na IC. O Sacubitril/Valsartan, ao reduzir a inflamação por meio da inibição da neprilisina e do bloqueio do receptor de angiotensina II, pode ter efeitos moduladores nessas vias, contribuindo para a redução da disfunção imunológica observada em pacientes com IC (Candia *et al.*, 2007)

A via do "Alcoolismo" ($q = 0,0001575$; $RC = 11,36$) (Tabela 8) está associada a alterações metabólicas, estresse oxidativo e disfunção hepática, processos que frequentemente coexistem com a IC. A modulação das vias metabólicas e inflamatórias promovida pelo Sacubitril/Valsartan pode melhorar esses efeitos, especialmente por meio de seus impactos na regulação de peptídeos natriuréticos e redução de mediadores inflamatórios (XANTHOPOULOS *et al.*, 2019).

A "Formação de redes extracelulares de neutrófilos" (NETs, $p = 0,0001575$; $RC = 11,17$) (Tabela 8) é um processo inflamatório chave, frequentemente exacerbado na IC. As NETs podem contribuir para o agravamento do remodelamento cardíaco por promoverem inflamação e dano tecidual. O Sacubitril/Valsartan, ao reduzir o estresse oxidativo e a inflamação, pode inibir a ativação excessiva dos neutrófilos, limitando a formação de NETs e, assim, reduzindo a progressão da doença (DUMMONT *et al.*, 2024).

A via do "Ribossomo" ($q = 0,005427$; $RC = 9,23$) (Tabela 8) reflete alterações na síntese proteica, que são críticas para o reparo e a regeneração celular em condições de estresse, como na IC. O Sacubitril/Valsartan, ao melhorar a função cardíaca e reduzir o estresse metabólico, pode criar um ambiente mais favorável para a síntese de proteínas essenciais, contribuindo para a homeostase celular. Outras vias, como "Desregulação transcricional no câncer" ($q = 0,01054$; $RC = 7,54$), "Caminho de sinalização via IL-17" ($q = 0,05165$; $RC = 9,08$), e "Caminho de sinalização via TNF" ($q = 0,07325$; $RC = 7,57$) (Tabela 8), estão amplamente relacionadas à inflamação crônica e ao remodelamento tecidual. Apesar de as vias "Caminho de sinalização via IL-17" e "Caminho de sinalização via TNF" não terem apresentado resultados estatisticamente significativos, todos esses processos são críticos na IC e podem ser modulados pelos efeitos anti-inflamatórios do Sacubitril/Valsartan. A redução da sinalização inflamatória e do estresse oxidativo ajuda a mitigar os danos associados ao remodelamento cardíaco.

A via de "COVID-19" ($q = 0,02035$; $RC = 6,20$) (Tabela 8) é interessante, pois reflete a ativação de vias imunológicas e inflamatórias exacerbadas em casos graves da doença. Os paralelos com a IC, incluindo inflamação sistêmica e disfunção endotelial, sugerem que os mecanismos moduladores de Sacubitril/Valsartan podem ter relevância nesses contextos também.

Em suma, esses resultados reforçam a complexidade dos processos celulares e moleculares modulados na IC e como os efeitos diretos e indiretos do Sacubitril/Valsartan convergem para mitigar a inflamação, melhorar o metabolismo e reduzir o estresse oxidativo. Esses achados também destacam a importância de continuar explorando as vias KEGG para identificar novos alvos terapêuticos na IC.

4.4 Análise de enriquecimento - *Reactome*

Por outro lado, com relação à análise de enriquecimento de vias do Reactome, foi possível observar resultados estatisticamente significativos. Os resultados apresentados na tabela 9 revelam processos biológicos altamente significativos que podem ser fundamentais para a compreensão dos mecanismos celulares associados ao contexto estudado. Os valores de q extremamente baixos indicam robustez estatística, sugerindo que os processos analisados não são apenas relevantes, mas também centrais para a fisiologia da célula em resposta a condições específicas, como deficiência de nutrientes ou estresse metabólico.

A resposta do EIF2AK4 à deficiência de aminoácidos ($q = 0,0009206$, $RC = 17,24$) (tabela 9) apresenta-se como um dos destaques mais relevantes. O EIF2AK4 (também conhecido como GCN2) é um sensor crucial da disponibilidade de aminoácidos, cuja ativação desencadeia uma cascata de eventos que modulam a tradução e preservam a homeostase celular. O aumento significativo no RC e na EC (Efeito Cumulativo) reflete a ativação acentuada dessa via em resposta à fome celular, apontando para um papel adaptativo essencial em condições de estresse nutricional (CARLSON *et al.*, 2023; PIECYK *et al.*, 2024).

Outro aspecto relevante é o envolvimento de processos relacionados à tradução, como o "Alongamento da cadeia polipeptídica" ($q = 0,001477$, $RC = 15,92$) e a "Terminação da tradução eucariótica" ($q = 0,001477$, $RC = 15,23$) (Tabela 9). Esses resultados sugerem uma modulação significativa da síntese proteica, possivelmente associada a adaptações para manter a qualidade proteica ou priorizar a produção de proteínas essenciais durante situações de estresse. O aumento nos indicadores para "Formação de um conjunto de subunidades 40S livres" ($q = 0,001598$, $RC = 14,02$) corrobora essa interpretação, indicando alterações na dinâmica do ribossomo e na tradução de proteínas em condições específicas (GHOSH; SHCHERBIK, 2020; CHEN *et al.*, 2022).

Outro ponto de destaque é a "Síntese de selenocisteína" ($q = 0,001477$, $RC = 15,23$) (Tabela 9), um processo especializado, mas crucial, dada a relevância das selenoproteínas na resposta ao estresse oxidativo e na regulação redox celular. A significância dessa via pode indicar um papel adaptativo ampliado, alinhado à necessidade de proteção

celular em cenários de maior demanda metabólica ou maior geração de espécies reativas de oxigênio (DE BARTOLO *et al.*, 2024).

O processo de "Tradução de RNAm viral" ($q = 0,001477$, $RC = 14,6$) (Tabela 9) é intrigante, pois pode refletir não apenas a interação célula-patógeno, mas também o reaproveitamento de mecanismos celulares para a tradução seletiva de transcritos específicos. Esse resultado pode ser interpretado como uma adaptação das células para gerenciar recursos limitados de tradução em condições de estresse, priorizando RNAs com maior impacto na sobrevivência. Por fim, a "Resposta celular à fome" ($q = 0,001477$, $RC = 11,09$) (Tabela 8) integra e reforça a visão geral de que os processos destacados estão alinhados às estratégias celulares de adaptação a ambientes adversos. O papel central dessas vias sugere que a célula reorienta sua atividade metabólica, translacional e de sinalização para preservar a viabilidade em condições de deficiência de nutrientes ou estresse metabólico celular (ROSS; THAKOR, 2018; BHOWMICK *et al.*, 2024).

Na IC, a restrição de nutrientes e o aumento do estresse metabólico são comuns, levando à ativação de vias adaptativas, como a mediada por EIF2AK4. O Sacubitril, ao aumentar os níveis de peptídeos natriuréticos, pode indiretamente reduzir o estresse metabólico, melhorando a perfusão e a disponibilidade de nutrientes nos tecidos. Além disso, o Valsartan, ao antagonizar a angiotensina II, reduz a inflamação e o remodelamento cardíaco, que são fatores contribuintes para a disfunção metabólica observada em pacientes com IC. Além disso, no contexto da IC, a remodelação cardíaca frequentemente resulta em síntese proteica disfuncional. O Sacubitril/Valsartan pode influenciar positivamente esses processos, reduzindo o estresse oxidativo e promovendo a restauração de condições favoráveis para a síntese de proteínas essenciais, como aquelas envolvidas na contratilidade cardíaca e na reparação tecidual (OVRICENCO *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2017).

A "Síntese de selenocisteína" (Tabela 9), que desempenha papel crítico na formação de seleno-proteínas antioxidantes, é particularmente relevante no contexto da IC, onde o estresse oxidativo é exacerbado. Os efeitos antioxidantes indiretos do Sacubitril, mediados pelos peptídeos natriuréticos, podem reduzir a demanda por selenoproteínas, enquanto o Valsartan contribui para limitar a ativação de vias pró-oxidantes associadas ao sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Assim, esses ajustes na dinâmica redox podem refletir uma sinergia entre os processos celulares e os efeitos farmacológicos do tratamento (SINGH *et al.*, 2017; DE BARTOLO *et al.*, 2024).

Outro achado relevante é a "Tradução de RNAm viral" (Tabela 8), que pode refletir a capacidade celular de priorizar a tradução de transcritos críticos em situações de estresse. Essa adaptação pode estar conectada aos efeitos do Sacubitril/Valsartan, que promovem um ambiente celular menos inflamatório e mais favorável ao gerenciamento dos recursos de tradução, reduzindo a sobrecarga metabólica (SINGH *et al.*, 2017).

Por fim, a "Resposta celular à fome" (Tabela 8) destaca a adaptação celular em condições de privação energética, comum na IC devido à redução da perfusão e à disfunção mitocondrial. Os efeitos hemodinâmicos do Sacubitril/Valsartan, ao melhorar a perfusão e reduzir a pressão de enchimento ventricular, podem aliviar essa resposta, restaurando parcialmente o equilíbrio metabólico celular. Assim, os resultados apresentados estão alinhados aos mecanismos de ação conhecidos do Sacubitril/Valsartan, refletindo tanto efeitos diretos na modulação de vias metabólicas e de tradução quanto efeitos indiretos que derivam da melhora da função cardíaca e da redução do estresse celular. Esses achados reforçam a relevância desse tratamento em mitigar os múltiplos aspectos patofisiológicos da IC (ZHANG *et al.*, 2022).

4.5 Associação entre os DEGs, análises de enriquecimento e ação do Sacubitril/Valsartan

Os DEGs superexpressos representam potenciais respostas celulares ao estresse metabólico e inflamatório na IC, estando diretamente ligados aos processos enriquecidos. Genes como *RPL31*, *RPL35A*, *RPL39*, *RPS29e* e *RPS21* (tabela 4) estão associados à biogênese e ao funcionamento do ribossomo, sendo essenciais para a síntese proteica (UNIPROT, 2021; STELZER *et al.*, 2021). O enriquecimento de processos relacionados ao ribossomo ($q = 0.002833$, $RC = 9.23$) (tabela 6) reflete a necessidade de adaptação da tradução proteica em situações de estresse. A superexpressão desses genes em pacientes com IC tratados com Sacubitril/Valsartan pode ser explicada por mecanismos adaptativos e efeitos do tratamento que modulam a função celular e a expressão gênica.

O Sacubitril/Valsartan promove efeitos hemodinâmicos, como redução da pressão de enchimento ventricular e melhora da perfusão tecidual. Essa melhora na oxigenação e no suprimento de nutrientes, por sua vez, cria condições que favorecem a síntese proteica, resultando na superexpressão de genes ribossômicos. Além disso, a recuperação da função celular pode induzir uma maior demanda por proteínas estruturais e funcionais, aumentando a expressão desses genes para suprir as necessidades adaptativas. Outra justificativa para esse aumento nos níveis de expressão inclui o fato de que o Sacubitril/Valsartan possui efeitos além da modulação hemodinâmica, como alterações em vias de sinalização intracelular que impactam diretamente na biologia ribossômica e epigenética. Esses efeitos incluem a regulação de vias relacionadas à sobrevivência celular, como o sistema ubiquitina-proteassoma e a ativação de peptídeos natriuréticos, que podem estimular processos regenerativos e adaptativos.

Genes como *CXCL6*, *S100A6*, *S100A12*, *LY96* e *TNFRSF17* (tabela 4) têm papéis importantes na inflamação e na sinalização imune (Horiuchi *et al.*, 2004; Garderet *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Mera *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2023; UNIPROT, 2021; Stelzer *et al.*, 2021). A superexpressão de genes como *CXCL6*, *S100A6*, *S100A12*, *LY96*, e *TNFRSF17* (Tabela 4) em pacientes com IC tratados com Sacubitril/Valsartan pode ser justificada por sua participação em processos inflamatórios, imunomodulação, e respostas adaptativas ao estresse. A combinação Sacubitril/Valsartan reduz inflamação crônica e remodelamento adverso por meio da inibição da neprilisina e do bloqueio da angiotensina II. Essa ação pode levar a uma modulação diferencial da expressão gênica inflamatória,

ativando vias protetoras e diminuindo o impacto das vias prejudiciais crônicas. Portanto, a superexpressão desses genes sugere que o tratamento com Sacubitril/Valsartan está associado a uma reprogramação adaptativa do sistema imunológico e do microambiente cardíaco, preservando respostas inflamatórias e imunes necessárias para o reparo tecidual.

Paralelamente, os genes *HBB*, *HBD* e *NDUFB6* (Tabela 4) estão associados ao metabolismo energético e à regulação redox. O Sacubitril/Valsartan, ao melhorar a perfusão tecidual, pode contribuir para a redução do estresse oxidativo, modulando a expressão desses genes (LIU *et al.*, 2011; KARAMANLIDIS *et al.*, 2013; UNIPROT, 2021; STELZER *et al.*, 2021).

Já os genes *COL9A3* (ligado à matriz extracelular) e *JCHAIN* (envolvido em processos imunes) podem estar relacionados ao remodelamento cardíaco e às respostas adaptativas na IC. O Sacubitril/Valsartan, por meio da redução da pressão de enchimento ventricular e da modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, pode influenciar a expressão desses genes. A superexpressão desses genes em pacientes com IC tratados com Sacubitril/Valsartan pode ser explicada por mecanismos relacionados à remodelação da matriz extracelular, resposta imune adaptativa e processos de reparo tecidual modulados pelo tratamento. O gene *COL9A3* (Tabela 4) codifica uma das subunidades do colágeno tipo IX, uma proteína estrutural associada à matriz extracelular (MEC), participando do remodelamento tecidual e na resposta a lesões, especialmente em tecidos sujeitos a estresse biomecânico, como o coração (FALETRA *et al.*, 2013). A superexpressão de *COL9A3*, por sua vez, pode refletir um esforço adaptativo para reparar ou estabilizar a estrutura da MEC. Já o gene *JCHAIN* (Tabela 4) atua na ligação de imunoglobulinas a receptores específicos, sendo fundamental para a imunidade adaptativa e a proteção tecidual. O tratamento, por conseguinte, reduz a inflamação crônica, mas pode facilitar respostas imunes protetoras e adaptativas, como o aumento da produção de imunoglobulinas reguladas pela cadeia J (MAX *et al.*, 1985; UNIPROT, 2021; STELZER *et al.*, 2021).

Adicionalmente, também se observou uma elevação na expressão de genes codificantes de proteínas histonas como *H3C12*, *H3C8*, *H3C2*, *H4C12*, *H3C3* e *H4C11* (Tabela 4). A superexpressão de que codificam variantes das histonas H3 e H4, em pacientes com IC tratados com Sacubitril/Valsartan pode ser explicada por sua relevância na regulação epigenética da expressão gênica, remodelagem da cromatina e resposta ao estresse celular, refletindo a necessidade de modular extensivamente a cromatina para ajustar a expressão gênica em resposta à IC e ao tratamento com Sacubitril/Valsartan.

Essas histonas desempenham papel importante no controle da expressão de genes associados à síntese proteica, ao ciclo celular e à resposta inflamatória, todos fundamentais para a recuperação cardíaca (UNIPROT, 2021; STELZER *et al.*, 2021).

Por outro lado, a análise transcriptômica também revelou alguns genes que se apresentaram subexpressos, tais como *SPATS2L*, *BICDL2* e *IGLL5* e *ENSG00000284931* (Tabela 4), que estão associados a processos celulares fundamentais, como transporte intracelular e organização do citoesqueleto. A subexpressão desses genes pode estar relacionada a alterações na funcionalidade celular causadas pela IC. O Sacubitril/Valsartan pode indiretamente ajudar a restaurar a função normal ao aliviar o estresse metabólico e inflamatório. Com relação ao quarto gene subexpresso (*ENSG00000284931*) (Tabela 4), embora menos caracterizado, pode estar associado a vias de desregulação transcricional, refletindo alterações adaptativas ou patológicas. Isso está relacionado à via de "Desregulação transcricional no câncer" ($q = 0,01054$, $RC = 7.54$) (Tabela 8), que também é relevante para remodelamento tecidual e expressão gênica alterada na IC (UNIPROT, 2021; STELZER *et al.*, 2021)

A IC está associada a uma função mitocondrial prejudicada, incluindo a diminuição da atividade do Complexo I. Foi demonstrado que o Sacubitril/Valsartana melhora o metabolismo energético cardíaco e a eficiência mitocondrial. A função mitocondrial melhorada, incluindo a melhor montagem e função do Complexo I, pode reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Como a produção de ROS é um fator que contribui para a progressão da IC, a redução do estresse oxidativo pode ser um benefício adicional do Sacubitril/Valsartan. Em resumo, embora o mecanismo de ação primário do Sacubitril/Valsartana envolva o RAAS e os peptídeos natriuréticos, ele pode melhorar indiretamente a função mitocondrial. Isso pode melhorar o metabolismo energético cardíaco e reduzir o estresse oxidativo, contribuindo para sua eficácia no tratamento da IC. No entanto, mais pesquisas são necessárias para elucidar completamente essa conexão (YU *et al.*, 2022; RAFFA *et al.*, 2023; GALLO *et al.*, 2024).

Quando se analisou um conjunto de genes regulados positivamente usando o banco de dados KEGG, obteve-se resultados indicando associações com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Alcoolismo, Formação de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) e Desregulação Transcricional no Câncer e isso sugere que esses processos biológicos ou vias de doenças estão significativamente conectados à mudanças na expressão gênica observadas.

O LES é uma doença autoimune em que o sistema imunológico ataca erroneamente tecidos saudáveis, levando à inflamação e danos aos órgãos. A identificação da via do LES na análise KEGG pode sugerir que os genes diferencialmente expressos estão envolvidos em processos como: desregulação imunológica, envolvendo vias de sinalização de células T e B; Produção de citocinas e vias como a sinalização de interferons, frequentemente ativadas no LES; produção de autoanticorpos, uma característica marcante do LES. Em suma, se esses genes no seu conjunto de dados estão ligados ao LES, isso implica que processos de desregulação imunológica semelhantes podem estar ocorrendo, potencialmente contribuindo para sintomas autoimunes ou respostas inflamatórias. Por outro lado, a expressão diferencial de genes relacionados a resposta imune e inflamação pode indicar um estado regulado de ativação do sistema imune que pode estar ligado à melhora ventricular por efeitos imunomodulatórios do Sacubitril/Valsartan. (DEOKAR, 2020; SANTOS *et al.*, 2022).

Paralelamente, a via do alcoolismo no KEGG destaca que o consumo crônico de álcool pode induzir danos oxidativos, inflamação e alterações neurológicas. Esses efeitos estão associados à regulação positiva de genes ligados à desintoxicação, respostas ao estresse, produção de citocinas inflamatórias e mudanças na expressão gênica relacionadas à neurotransmissão e sinalização cerebral. A via do alcoolismo no KEGG está associada à desregulação de vias neuro-inflamatórias, estresse oxidativo e alterações epigenéticas. Ao contrário, a superexpressão de genes ligados a essa via pode indicar um mecanismo compensatório para restaurar a homeostase metabólica e antioxidante, contribuindo para a melhora da função cardíaca. (QUINTEROS, 2017).

Com relação à formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), os genes envolvidos nesse processo estão associados à ativação de neutrófilos, produção de NETs e promoção de inflamação e respostas imunes. Assim, esses genes podem desempenhar um papel na imunidade inata, inflamação e lesões nos tecidos. O enriquecimento dessa via, por sua vez, pode indicar uma regulação adaptativa dos processos biológicos envolvidos nos NETs, evitando a hiperativação inflamatória e prevenindo dano endotelial e fibrose excessiva. (WANG *et al.*, 2024).

Por fim, a desregulação transcricional no câncer refere-se a padrões de expressão gênica anormais frequentemente encontrados em células cancerígenas devido a mutações ou desregulação de fatores de transcrição e proteínas modificadoras de cromatina. Se a desregulação transcricional no câncer for destacada, isso indica que o Sacubitril/Valsartan pode estar ativando mecanismos de remodelação cardíaca adaptativa, reduzindo

hipertrofia patológica e fibrose miocárdica, uma vez que muitos genes dessa via regulam processos como crescimento celular, apoptose e reparo tecidual. (PLATI *et al.*, 2008; BRADNER *et al.*, 2017).

4.6 Análise da ancestralidade genômica

Finalmente, com relação à análise de ancestralidade, estudos prévios indicam que a variabilidade genética, frequentemente expressa em termos de ancestralidade populacional, pode influenciar o risco à determinadas doenças e a resposta ao tratamento farmacológico, incluindo a eficácia e a segurança (BAHAMI *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2014). No entanto, neste estudo, os resultados sugerem que não houve influência significativa da ancestralidade sobre os desfechos analisados, ao menos no contexto deste tamanho amostral e na população avaliada.

É possível observar na Tabela 10 que existe uma maior prevalência de indivíduos com ancestralidade europeia nas populações de casos e controles. Esse fator está em sincronia com o estudo de Manta *et al.* (2013) e Santos *et al.* (2010), os quais demonstraram que a população do Rio de Janeiro é composta por uma maior proporção de indivíduos com ancestralidade europeia. Contudo, a variabilidade genética entre as populações é um fator bem documentado que pode influenciar a resposta ao tratamento farmacológico. Portanto, estudos futuros que combinem análises farmacogenômicas e de ancestralidade poderão elucidar melhor a relação entre essas variáveis e os efeitos terapêuticos do Sacubitril/Valsartan.

CONCLUSÕES

De uma forma geral, os resultados deste estudo evidenciam a complexidade da IC, destacando alterações profundas em processos biológicos cruciais, como a tradução proteica, a resposta imunológica e o transporte de gases. No entanto, com os achados do presente trabalho concluímos que:

- Os perfis de expressão gênica diferenciais entre os pacientes com IC-Fer tratados com Sacubitril/Valsartan e tratados com outras drogas foram associados com a tradução citoplasmática, a resposta humoral, o transporte de oxigênio, a resposta inflamatória associada à IC, bem como com a recuperação de funções celulares essenciais, indicando que o Sacubitril/Valsartan tem impacto sobre essas vias;
- Esses achados apontam para o papel do Sacubitril/Valsartan na intervenção clínica como uma terapia para a redução do estresse oxidativo, do processo inflamatório, para a melhoria da perfusão dos tecidos e para a otimização do metabolismo energético o que abre portas para investigações futuras sobre o seu uso em terapias combinadas para pacientes que não respondem bem às terapias convencionais;
- O estudo reforça o papel do Sacubitril/Valsartan na remodelação ventricular e na melhora da função cardíaca, sugerindo que sua introdução precoce pode reduzir desfechos adversos, como hospitalizações e mortalidade;
- No presente estudo foram identificados 56 genes diferencialmente expressos na coorte estudada. Dentre esse grupo de genes, pode-se mencionar aqueles que atuam de alguma forma na transcrição e regulação da expressão gênica (*IRF2BPL*, *CEBPB*, *CEBPD*, *ASCL2*, *TIGD7* e *ANTKMT*), aqueles que influenciam na estrutura das histonas e na organização da cromatina (*H1-10*, *H3C12*, *H3C8*, *H3C2*, *H3C3*, *H4C1*, *H4C12*, *H4C11*), outros que influenciam na estrutura do Ribossomo e Síntese Proteica (*RPL31*, *RPL35A*, *RPL39*, *RPS29*, *RPS21*, *SNRPG* e *MED30*), no metabolismo celular e transporte de íons (*NDUFB6*, *SLC30A1* e *CALHM6*), na sinalização celular e resposta imunológica (*FADD*, *LY96*, *TNFRSF17*, *COMMD8*, *CXCL6*, *XCL2*, *IGLL5*, *SPATS2L*, *BICDL2* e *SEC61G*), na adesão celular e estrutura da matriz extracelular (*NECTIN2*, *COL9A3* e *JCHAIN*) e no transporte de gases (*HBD*, *HBB* e *GP1BB*);
- A identificação dos biomarcadores genéticos associados à resposta ao Sacubitril/Valsartan apontados no presente trabalho, juntamente com a futura

caracterização de variantes genéticas envolvidas na modulação da expressão desses biomarcadores e a sua validação em coortes maiores de diferentes populações, pode ter implicações clínicas significativas, tais como a personalização do tratamento, permitindo a seleção de pacientes que terão maior benefício com essa terapia, a melhora no prognóstico e redução de hospitalizações, otimizando o manejo da IC;

- Foram descartados quaisquer vieses relacionados às variáveis demográficas, clínicas e de ancestralidade nos resultados encontrados;
- Fica evidente que o emprego de tecnologias avançadas em pesquisa clínica, como a análise transcriptômica por RNA-seq, abrem caminho para a medicina personalizada, permitindo abordagens terapêuticas mais precisas e adaptadas às necessidades individuais dos pacientes, demonstrando a sua contribuição para a prática clínica;
- Por fim, os achados reforçam a importância dos estudos de investigação das bases genéticas e moleculares das respostas terapêuticas em IC como forma de aprofundar o conhecimento sobre a doença e desenvolver estratégias terapêuticas mais específicas e eficazes.

REFERÊNCIAS

- ABUZAANONA, A.; LANFEAR, D. Pharmacogenomics of the natriuretic peptide system in heart failure. **Current Heart Failure Reports**, v. 14, n. 6, p. 536-542, 2017.
- ALENCAR, A. K. N. Sacubitril/Valsartan: Um avanço no tratamento da insuficiência cardíaca – abordando a qualidade de vida e a mortalidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 120, n. 8, p. e20230123, 2023.
- ALVES, F. C. B.; OLIVEIRA, R. G.; REYES, D. R. A.; GARCIA, G. A.; *et al.* Transcriptomic profiling of rectus abdominis muscle in women with gestational diabetes-induced myopathy: Characterization of pathophysiology and potential muscle interventions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 12864, 2022.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION (AHA). Medications used to treat heart failure. Disponível em: <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-failure/treatment-options-for-heart-failure/medications-used-to-treat-heart-failure>. Acesso em: 11 jan.2025.
- AZEVEDO, P. S.; POLEGATO, B. F.; MINICUCCI, M. F.; PAIVA, S. A. R.; ZORNOFF, L. A. M. Cardiac remodeling: Concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, n. 1, p. 62–69, 2016.
- BAHAMI, H.; KRONMAL, R.; BLUEMKE, D. A.; OLSON, J.; SHEA, S.; LIU, K.; BURKE, G.L.; LIMA, J. A. Differences in the incidence of congestive heart failure by ethnicity: The multi-ethnic study of atherosclerosis. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, n. 9, p. 2138-2145, 2008.
- BALIEIRO, H. M.; OSUGUE, R. K.; RANGEL, S. P.; BRANDÃO, R.; *et al.* Perfil clínico-demográfico e indicadores de qualidade da insuficiência cardíaca em uma área rural. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 6, p. 687–691, 2009.
- BARRETTO, A. C. P.; WAJNGARTEN, M. Insuficiência cardíaca nos idosos: diferenças e semelhanças com os mais jovens. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 71, n. 6, p. 801–806, 1998.
- BAYES-GENIS, A.; MORANT-TALAMANTE, N.; LUPÓN, J. Nephilysin and natriuretic peptide regulation in heart failure. **Current Heart Failure Reports**, v. 13, n. 4, p. 151–157, 2016.
- BECK-DA-SILVA, L.; ROHDE, L. E. The diuretic effect of Sacubitril/Valsartan might be clinically relevant. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.l.], v. 112, n. 6, p. 791-792, 2019.

BEYER, M.; MALLMANN, M. R.; XUE, J.; STARATSCHEK-JOX, A.; *et al.* High-resolution transcriptome of human macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45466, 2012.

BOCCHI, E. A.; BIOLO, A.; MOURA, L. Z.; NETO, J. A. F.; *et al.* Tópicos emergentes em insuficiência cardíaca: inibidores do cotransportador sódio-glicose 2 (iSGLT2) na IC. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 2, p. 255–258, 2021.

BHOWMICK, T.; BISWAS, S.; MUKHERJEE, A. Cellular response during cellular starvation: a battle for cellular survivability. **Cell Biochemistry and Function**, v. 42, n.5, e4101, 2024.

BOZKURT, B.; COATS, A.; TSUTSUI, H.; ABDELHAMID, M.; *et al.* Universal definition and classification of heart failure. **Journal of Cardiac Failure**, v. 27, n. 4, p. 387–413, 2021.

BRADNER, J. E.; HNISZ, D.; YOUNG, R. A. Transcriptional addiction in cancer. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 629–643, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes Brasileiras para Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida**. 2020. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/20201211_relatorio_diretrizes_brasileiras_icfer_final_409_2018_publicacao2020.pdf. Acesso em: 1 fev. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Cerca de 400 mil pessoas morreram em 2022 no Brasil por problemas cardiovasculares**. 2023. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/cerca-de-400-mil-pessoas-morreram-em-2022-no-brasil-por-problemas-cardiovasculares/>. Acesso em: 1 fev. 2025.

BRAUNWALD, E. The path to an angiotensin receptor antagonist-neprilysin inhibitor in the treatment of heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 10, p. 1029–1041, 2015.

BRAUNWALD, E. Academic-industrial collaboration in the development of the first angiotensin receptor blocker: neprilysin inhibitor in the treatment of heart failure. **European Heart Journal**, v. 37, n. 9, p. 745–746, 2016.

BUMGARNER, R. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. **Current Protocols in Molecular Biology**, chapter 22, number 22.1, 2013.

CANDIA, A. M.; VILLACORTA JÚNIOR, H.; MESQUITA, E. T. Ativação imuno-inflamatória na insuficiência cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, n. 3, p. 201–208, 2007.

CARLSON, K. R.; GEORGIADIS, M. M.; TAMEIRE, F.; STASCHKE, K. A.; WEK, R. C. Activation of Gcn2 by small molecules designed to be inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 4, p. 104595, 2023.

CHEN, J.; ZHANG, D.; YANXZC, W.; YANG, D.; SHEN, B. Translational bioinformatics for diagnostic and prognostic prediction of prostate cancer in the next-generation sequencing era. **Biomedical Research International**, v. 2013, n. 2013, p. 901578, 2013.

CHEN, X.; WANG, Y.; LIU, M.; SONG, X.; WANG, D.; *et al.* Network pharmacology-based analysis of the effects of puerarin on sarcopenia. **Annals of Translational Medicine**, v. 10, n. 12, p. 671, 2022.

Da AGOSTINI, L.; CUNHA, W. R.; SILVA, N. N. T.; *et al.* Angiotensin-converting enzyme gene (ACE) polymorphisms are associated with dysregulation of biochemical parameters in hypertensive patients. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 5, p. 1487–1497, 2023.

DAI, C. L.; YANG, H. X.; LIU, Q. P.; RAHMAN, K.; ZHANG, H. CXCL6: A potential therapeutic target for inflammation and cancer. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 8, p. 4413–4427, 2023.

DATASUS. Incidência de morbidade no Brasil. 2014. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 11 jan. 2025.

De BARTOLO, A.; PASQUA, T.; ROMEO, N.; *et al.* The redox-active defensive Selenoprotein T as a novel stress sensor protein playing a key role in the pathophysiology of heart failure. **Journal of Translational Medicine**, v. 22, n. 1, p. 375, 2024.

DEOKAR, A. Stratification of Systemic Lupus Erythematosus patients using gene expression data to reveal expression of distinct immune pathways. **medRxiv**, 2020 (preprint).

DUMONT, B. L.; NEAGOE, P. E.; CHARLES, E.; VILLENEUVE, L.; *et al.* Low-density neutrophils and neutrophil extracellular traps (NETs) are new inflammatory players in heart failure. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 40, n. 9, p. 1524–1535, 2024.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, n. 1, p. 47–50, 2005.

FALETRA, F.; D'ADAMO, A. P.; BRUNO, I.; ATHANASAKIS, E.; *et al.* Autosomal recessive Stickler syndrome due to a loss of function mutation in the COL9A3 gene. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 164A, n. 1, p. 42–47, 2013.

FERNANDES, A. D. F.; FERNANDES, G. C.; MAZZA, M. R.; KNIJNIK, L. M.; *et al.* Insuficiência cardíaca no Brasil subdesenvolvido: análise de tendência de dez anos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 114, n. 2, p. 222–231, 2020.

GAINER, J. V.; LIPKOWITZ, M. S.; YU, C.; WATERMAN, M. R.; *et al.* Association of a CYP4A11 variant and blood pressure in black men. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, n. 9, p. 1606–1611, 2005.

GALLO, G.; RUBATTU, S.; VOLPE, M. Mitochondrial dysfunction in heart failure: From pathophysiological mechanisms to therapeutic opportunities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 5, p. 2667, 2024.

GARDERET, L.; LABOPIN, M.; GORIN, N. C.; POLGE, E.; *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation for de novo acute megakaryocytic leukemia in first complete remission: a retrospective study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). **Blood**, v. 105, n. 1, p. 405–409, 2005.

GELLER, D. S.; RODRIGUEZ-SORIANO, J.; VALLO BOADO, A.; SCHIFTER, S.; *et al.* Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudo hypoaldosteronism type I. **Nature genetics**, v. 26, n. 2, p. 169-172, 2000.

GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. **Gene Ontology Resource: enriching the knowledge of gene function**. Disponível em: <http://geneontology.org/>. Acesso em: 11 jan. 2025.

GHOSH, A.; SHCHERBIK, N. Effects of oxidative stress on protein translation: implications for cardiovascular diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2661, 2020.

GONÇALVES, A. V.; PEREIRA-DA-SILVA, T.; GALRINHO, A.; RIO, P.; *et al.* Melhora no consumo máximo de oxigênio e na ventilação após tratamento com sacubitril-valsartana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 5, p. 821–827, 2020.

GUHA, K.; VARKEY, S.; SHARMA, R. PARADIGM-HF: The Rise of the Arnis. **Reviews on Recent Clinical Trials**, v. 11, n. 1, p. 39–46, 2016.

HORIUCHI, M.; TSUTSUI, M.; TASAKI, H.; MORISHITA, T.; SUDA, O.; *et al.* Upregulation of vascular extracellular superoxide dismutase in patients with acute coronary syndromes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 1, p. 106–111, 2004.

HUI-QI, Q.; KAO, C.; HAKONARSON, H. Single-cell RNA sequencing technology landscape in 2023. **Stem Cells**, v. 42, n. 1, p. 1–12, 2024.

IBORRA-EGEA, O.; GÁLVEZ-MONTÓN, C.; ROURA, S.; PEREA-GIL, I.; *et al.* Mechanisms of action of Sacubitril/Valsartan on cardiac remodeling: a systems biology approach. **NPJ Systems Biology and Applications**, v. 3, n. 18, p. 12, 2017.

JIANG, Y.; ZHAO, Q.; HUANG, S.; CHENG, B.; HU, Z. Identification and comparison of potential biomarkers by proteomic analysis in Traditional Chinese Medicine-based heart failure syndromes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 6338508, 2022.

KARAMANLIDIS, G.; LEE, C. F.; GARCIA-MENENDEZ, L.; KOLWICZ JR, S. C.; *et al.* Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 239–250, 2013.

KAUR, L. **Brenner's encyclopedia of genetics**. 2. ed. Bundoora: La Trobe University Research and Development Park, 2013.

KEGG. **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**. Disponível em: <https://www.genome.jp/kegg/>. Acesso em: 11 jan. 2025.

KIM, Ha-Young. Statistical notes for clinical researchers: Chi-squared test and Fisher's exact test. **Restorative Dentistry & Endodontics**, Seoul, v. 42, n. 2, p. 152-155, 2017.

KUMAR, S.; HE, H.; AGGOUR, H.; LACHLAN, T.; *et al.* Side effects of Sacubitril/Valsartan influence outcomes in heart failure populations: a retrospective study. **Heart**, v. 107, n. 1, p. A109–A111, 2021.

LAMOUNIER, J. A.; FERRARI, F.; MAX, R.; RITT, L. E. F.; STEIN, R. Importância do Teste Genético na Miocardiopatia Dilatada: Aplicações e Desafios na Prática Clínica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 2, p. 274-281, 2019.

LI, W.; MAK, M.; JIANG, H.; WANG, Q.; PANG, Y.; *et al.* Novel anti-Alzheimer's dimer Bis(7)-cognitin: cellular and molecular mechanisms of neuroprotection through multiple targets. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 1, p. 187–201, 2009.

LIU, W.; BAKER, S. S.; BAKER, R. D.; NOWAK, N. J.; ZHU, L. Up regulation of hemoglobin expression by oxidative stress in hepatocytes and its implication in non-alcoholic steatohepatitis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, e24363, 2011.

LIU, L.; NÚÑEZ, A. E.; AN, Y.; LIU, H.; *et al.* Burden of cardiovascular disease among multi-racial and ethnic populations in the United States: an update from the National Health Interview Surveys. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 1, n. 8, p. 1–8, 2014.

LUO, H. Y.; GAO, L. C.; LONG, H. Z.; Zhou, Z. W.; *et al.* Association between the NEP rs701109 polymorphism and the clinical efficacy and safety of Sacubitril/Valsartan in Chinese patients with heart failure. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 79, n. 5, p. 663–670, 2023.

MACHADO, F. B.; FARIA, M. A.; LOVATEL, V. L.; ALVES DA SILVA, A. F.; *et al.* 5meCpG epigenetic marks neighboring a primate-conserved core promoter short tandem repeat indicate X-chromosome inactivation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103714, 2014.

MANN, D. L.; BONOW, L.; BHATT, S. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2014. 486p.

MANN, D. L.; GIVERTZ, M. M.; VADER, J. M.; STARLING, R.; *et al.* Effect of treatment with Sacubitril/Valsartan in patients with advanced heart failure and reduced ejection fraction: A randomized clinical trial. **JAMA Cardiology**, v. 7, n. 1, p. 17–25, 2022.

- MATSA, L. S.; RANGARAJU, A.; VENGALDAS, V.; LATIFI, M.; JAHROMI, H. M.; *et al.* Haplotypes of NOS3 gene polymorphisms in dilated cardiomyopathy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70523, 2013.
- MAX, E. E.; KORSMEYER, S. J. Human J chain gene: Structure and expression in B lymphoid cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 161, n. 4, p. 832–849, 1985.
- MCHUGH, M. L. The chi-square test of independence. **Biochemia Medica**, Zagreb, v. 23, n. 2, p. 143-149, 2013.
- MCMURRAY, J. J. V.; PACKER, M.; DESAI, A. S.; GONG, J.; LEFKOWITZ, M. P.; *et al.* Angiotensin–neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 11, p. 993–1004, 2014.
- MCNAMARA, D. M.; HOLUBKOV, R.; POSTAVA, L.; RAMANI, R.; *et al.* Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. **Circulation**, v. 107, n. 12, p. 1598–1602, 2003.
- MERA, J.; JOSHI, K.; THORNTON, K.; BOX, T.; *et al.* Retrospective study demonstrating high rates of sustained virologic response after treatment with direct-acting antivirals among American Indian/Alaskan Natives. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. ofz128, 2019.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- MILLS, J.; VARDENY, O. The role of neprilysin inhibitors in cardiovascular disease. **Current Heart Failure Reports**, v. 12, n. 6, p. 389–394, 2015.
- MURPHY, S.; PRESCOTT, M.; CAMACHO, A.; LYER, S. R.; *et al.* trial Natriuretic Peptide and Treatment With Sacubitril/Valsartan in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. **Journal of the American College of Cardiology: Heart Failure**, v. 9, n. 2, p. 127–136, 2021.
- MUSTAFA, N. H.; JALIL, J.; ZAINALABIDIN, S.; SALEH, M. S. M.; ASMADI, A. Y.; KAMISAH, Y. Molecular mechanisms of Sacubitril/Valsartan in cardiac remodeling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 892460, 2022.
- MUTZ, K. O.; HEILKENBRINKER, A.; LÖNNE, M.; WALTER, J. G.; STAHL, F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 22–30, 2013.
- NALBANT, E.; AKKAYA-ULUM, Y. Z. Exploring regulatory mechanisms on miRNAs and their implications in inflammation-related diseases. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 1, p. 142, 2024.
- NEGI, A.; SHUKLA, A.; JAISWAR, A.; SHRINET, J.; JASROTIA, R. S. Applications and challenges of microarray and RNA-sequencing. Bioinformatics, **Academic Press**, p. 91–103, 2022.

NISHIDA, K.; YAMAGUCHI, O.; OTSU, K. Degradation systems in heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 84, p. 212–222, 2015.

NOUGUÉ, H.; PICARD, F.; COHEN-SOLAL, A.; LOGEART, D.; *et al.* Impact of Sacubitril/Valsartan on cardiac and systemic hypoxia in chronic heart failure. *iScience*, v. 27, n. 1, p. 108520, 2023.

PEREIRA, R. W.; PENA, S. D. Phylogeography of haplotypes of five microsatellites located in a low-recombination region of the X chromosome: studies worldwide and in Brazilian populations. **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 243–250, 2006.

PEREIRA, R.; PHILLIPS, C.; PINTO, N.; SANTOS, C.; *et al.* Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e29684, 2012.

PIECYK, M.; FERRARO-PEYRET, C.; LAVILLE, D.; PERROS, F.; CHAVEROUX, C. Novel insights into the GCN2 pathway and its targeting: therapeutic value in cancer and lessons from lung fibrosis development. **FEBS Journal**, v. 291, n. 22, p. 4867–4889, 2024.

RODRÍGUEZ-CASANOVA, Á. M.; CASANOVA-VALDERRAMA, M. E.; VIVAS-MAYOR, M.; PUERTA-MESA, A. C.; MARTÍNEZ-ARISTIZÁBAL, J. Sacubitril/Valsartan reduces levels of procollagen types I and III and correlates with reverse cardiac remodelling. **REC: CardioClinics**, v. 56, n. 1, p. 14-21, 2021.

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Dysregulation of apoptotic signalling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, n. 4, p. 1124–1149, 2008.

POZZI, A.; ABETE, R.; TAVANO, E.; KRISTENSEN, S. L.; *et al.* Sacubitril/Valsartan and arrhythmic burden in patients with heart failure and reduced ejection fraction: a systematic review and meta-analysis. **Heart Failure Reviews**, v. 28, n. 6, p. 1395–1403, 2023.

QUINTEROS, D. A. Efeito da associação de álcool e cigarro sobre parâmetros neurotróficos, neuroinflamatórios, oxidativos e comportamentais em ratos. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre.

REACTOME. **Reactome: PathwayDatabase**. Disponível em: <https://reactome.org/>. Acesso em: 11 jan. 2025.

ROSS, J. A.; THAKOR, N. Toeprinting analysis of translation initiation complex formation on mammalian mRNAs. **Journal of Visualized Experiments**, v. 10, n. 135, p. e57519, 2018.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the gene pop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 103–106, 2008.

RUXTON, G. D. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann-Whitney U test. **Behavioral Ecology**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 688-690, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, M. C. S.; DE PAIVA, E. B.; NOGUEIRA, G. de L. E.; SILVA, E. S.; *et al.* O papel do sistema imune no lúpus eritematoso sistêmico: uma revisão integrativa de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 5, p. 21498–21507, 2022.

SATAM, H.; JOSHI, K.; MANGROLIA, U.; WAGHOO, S.; *et al.* Next-generation sequencing technology: **Current trends and advancements**. *Biology*, v. 12, n. 7, p. 997, 2023.

SASAGAWA, Y.; HAYASHI, T.; NIKAIDO, I. Strategies for converting RNA to amplifiable cDNA for single-cell RNA sequencing methods. In: SUZUKI, Y. Single molecule and single cell sequencing. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 2019, n. 1129, p. 1-17, 2019.

SEIDELMANN, S. B.; VARDENY, O.; CLAGGETT, B.; YU, B.; *et al.* An NPPB promoter polymorphism associated with elevated N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and lower blood pressure, hypertension, and mortality. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 4, p. e005257, 2017.

SEVERINO, P.; D'AMATO, A.; PUCCI, M.; INFUSINO, F.; *et al.* ischemic heart disease and heart failure: Role of coronary ion channels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3167, 2020.

SILVA, P. M.; AGUIAR, C. Sacubitril/Valsartan: An important piece in the therapeutic puzzle of heart failure. **Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)**, v. 36, n. 9, p. 655-668, 2017.

SHI, Q.; LIU, T.; HU, W.; HE, X.; LI, S.; *et al.* SRTdb: an omnibus for human tissue and cancer-specific RNA transcripts. **Biomarker Research**, v. 10, n. 1, p. 27, 2022.

SHI, Y. J.; YANG, C. G.; QIAO, W. B.; LIU, Y. C.; *et al.* Sacubitril/Valsartan attenuates myocardial inflammation, hypertrophy, and fibrosis in rats with heart failure with preserved ejection fraction. **European Journal of Pharmacology**, v. 961, 2023.

SILVA, P. M.; AGUIAR, C. Sacubitril/Valsartan: An important piece in the therapeutic puzzle of heart failure. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 36, n. 9, p. 655–668, 2017.

SINGH, J. S. S.; BURRELL, L. M.; CHERIF, M.; SQUIRE, I. B.; *et al.* Sacubitril/Valsartan: Beyond natriuretic peptides. **Heart**, v. 103, n. 20, p. 1569–1577, 2017.

- STEIN, R.; BEUREN, T.; CELA, L. R.; FERRARI, F. Pharmacogenomics and cardiovascular disease: Where are we and where do we go from here? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 4, p. 690-700, 2020.
- STELZER, G.; ROSEN, N.; PLAUT, I.; INGBER, A.; *et al.* **Gene Cards: The human gene database**. 2021. Disponível em: <https://www.genecards.org>. Acesso em: 10 jan. 2025.
- STUMPF, M. A. M.; ALMEIDA, M. Q. A "Grasp Heart" Situation: Managing Heart Failure with Reduced Ejection Fraction in Primary Adrenal Insufficiency. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 120, n. 8, p. e20230171, 2023.
- SULLIVAN, G. M.; FEINN, R. Using effect size—or why the P value is not enough. **Journal of Graduate Medical Education**, Chicago, v. 4, n. 3, p. 279-282, 2012.
- SWATHY, B.; BANERJEE, M. Understanding pharmaco-epigenomic response of antipsychotic drugs using genome-wide microRNA expression profile in liver cell line. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, 786632, 2022.
- TIAN, C.; HINDS, D. A.; SHIGETA, R.; KITTLES, R.; *et al.* A genome wide single-nucleotide-polymorphism panel with high ancestry information for African American admixture mapping. **American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. 4, p. 640–649, 2006.
- UNIPROT CONSORTIUM. **UniProt: A worldwide hub of protein knowledge**. 2021. Disponível em: <https://www.uniprot.org>. Acesso em: 10 jan. 2025.
- VAN DER KLOET, F. M.; BUURMANS, J.; JONKER, M. J.; SMILDE, A. K.; WESTERHUIS, J. A. Increased comparability between RNA-Seq and microarray data by utilization of gene sets. **PLoS Computational Biology**, v. 16, n. 9, e1008295, 2020.
- XANTHOPOULOS, A.; STARLING, R. C.; KITAI, T.; TRIPOSKIADIS, F. Heart failure and liver disease: Cardiohepatic interactions. **JACC: Heart Failure**, v. 7, n. 2, p. 87-97, 2019.
- WANG, H.; KIM, S. J.; LEI, Y.; YANG, Y.; CHEN, Y.; WANG, Z.; HE, Y. Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, 235, 2024.
- WEBB, R. L.; DE GASPARO, M. Role of the angiotensin II receptor blocker valsartan in heart failure. **Experimental and Clinical Cardiology**, v. 6, n. 4, p. 215-221, 2001.
- WIELENGA, R. P.; SMITS, J. M.; KRAGTEN, J. A.; MAASSEN, J. H.; *et al.* **The role of exercise training in chronic heart failure**. *Heart*, v. 78, n. 5, p. 431-436, 1997.
- ZHANG, J.; DU, L.; QIN, X.; GUO, X. Effect of Sacubitril/Valsartan on the right ventricular function and pulmonary hypertension in patients with heart failure with reduced ejection fraction: A systematic review and meta-analysis of observational studies. **Journal of the American Heart Association**, v. 11, n. 9, e024449, 2022.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

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

Título da Pesquisa: IMPLICAÇÕES FARMACOGENÉTICAS NA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM SACUBITRIL/VALSARTAN OU TERAPIAS CONVENCIONAIS EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DE FRAÇÃO DE EJEÇÃO REDUZIDA.

Pesquisador: RICARDO MOURILHE ROCHA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47609121.0.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.872.399

Apresentação do Projeto:

Continuação do Parecer: 4.784.247

Objetivo da Pesquisa:

Continuação do Parecer: 4.784.247

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Continuação do Parecer: 4.784.247

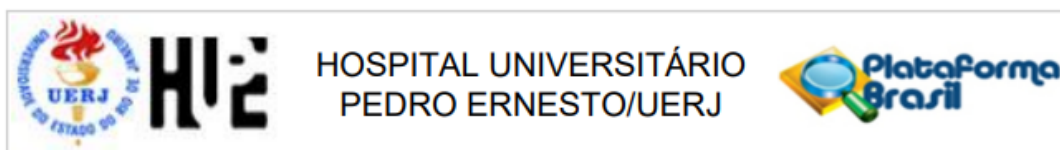
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Continuação do Parecer: 4.784.247

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos: Documento devidamente preenchido, datado e assinado
- 2) Projeto de Pesquisa: Adequado



Continuação do Parecer: 4.872.399

3) Orçamento financeiro e fontes de financiamento: adequado/apresentado

4) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado

5) Cronograma: Adequado

6) Documentos pertinentes à inclusão do HUPE: Adequado

7) Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: anexados e conforme as normas.

Os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todos dados necessários para apreciação ética e tendo sido avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos na pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em consonância com a resolução CNS 466/12 e a Norma Operacional CNS 001/13, o CEP recomenda ao O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**Universidade do Estado do Rio de Janeiro****Programa de Pós-Graduação em Biociências****Hospital Universitário Pedro Ernesto****Setor de Insuficiência cardíaca****Laboratório de Diagnósticos por DNA****1- Afirmação Introdutória**

Você está sendo convidado a participar de um estudo de investigação clínica e genética. Para decidir se você deseja ou não participar, você precisa entender as vantagens e desvantagens do mesmo, para poder formar a sua opinião.

2- Objetivo do Estudo

Realizar análises moleculares (genômicas e transcriptômicas) a fim de compreender quais são as bases genéticas para as diferentes respostas farmacoterapêuticas ao Sacubitril/Valsartan observadas na prática clínica, em pacientes com IC de fração de ejeção reduzida, assim como estabelecer possíveis relações com a gravidade desta condição.

3- Procedimentos Médicos a Serem Seguidos

Após ler, entender e concordar, você assinará o Consentimento Informado, e somente depois, os médicos irão examinar você e colher o seu sangue para os exames laboratoriais. Se você estiver tomando algum remédio prescrito pelo seu médico, eles deverão ser mantidos, ou, a critério do seu médico, poderão ser modificados no futuro, de acordo com o resultado de seus exames. A avaliação constará de uma visita médica, onde serão realizados o exame clínico, o ecocardiograma para avaliação da função cardíaca e a coleta de sangue. Após esta visita, você terá acesso a todos os resultados e será acompanhado aqui no Hospital Pedro Ernesto ao longo do estudo para melhor tratamento de sua condição.

4- Desconfortos e Riscos

Nenhum novo medicamento ou forma de tratamento será testado em você e o único desconforto será o da coleta de sangue, através da punção do sangue de sua veia, como é feito habitualmente.

5- Exclusões

Se você não entender alguma palavra do texto, peça explicações ao médico que o está atendendo. Se não for da sua vontade, você não tem obrigação de participar do estudo.

6- Benefícios aos participantes

Ao participar de estudos como este, você estará colaborando para que um maior conhecimento médico e científico em nosso país seja alcançado. Além disso, você estará realizando uma revisão ampla da sua saúde cardiovascular e em sendo encontrada alguma anormalidade, você será devidamente informado, e as orientações médicas serão fornecidas. Paralelamente, você também estará contribuindo para a melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento da IC, bem como para o curso de seu tratamento.

7- Dados confidenciais

A menos que sejam requeridos por lei, apenas o investigador, o comitê de revisão e a comissão de ética terão acesso aos dados confidenciais que identificam você pelo nome. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou em publicações; no entanto, você não será identificado nestas apresentações. Todo o material biológico coletado neste estudo será exclusivamente utilizado para as pesquisas dos fatores de risco cardiovascular e avaliação genética. Qualquer outro exame a ser realizado com este material será solicitado novo consentimento, informando detalhadamente o fim a que se destina.

8- Novas descobertas

Se no decorrer deste estudo ou ao seu final, surgir alguma conclusão relevante para seu benefício, você será informado a respeito.

9- Pessoas para contato

O pesquisador ou seu substituto responderá a todas as perguntas. Se você tiver questões adicionais no decorrer deste estudo sobre a pesquisa ou seus direitos como um participante da pesquisa, poderá dirigi-las à Gizella da Cunha Rodrigues Garcia, ou Dr. Ricardo Mourilhe-Rocha no setor de Insuficiência cardíaca da Cardiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, tel: (21) 2587-6482 ou Dra. Dayse Aparecida da Silva no Laboratório de Diagnósticos por DNA da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, tel: (21) 2334-0594.

10- Participação voluntária

Você está participando voluntariamente deste estudo. Você pode se recusar a participar do mesmo a qualquer momento, sem penalidades nem perda dos benefícios a que você já tem direito.

Li o texto acima e estou ciente do conteúdo deste formulário de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Consinto voluntariamente em participar. Recebi uma cópia deste formulário de consentimento.

Este termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP/HUPE) e qualquer dúvida pode-se entrar em contato através do endereço: CEP/HUPE: CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA. AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030. Ou pelo telefone: (21) 2868-8253, ou através do e-mail: cep-hupe@uerj.br.