



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Felipe Neves de Albuquerque

**Desenvolvimento de um escore genético de risco para  
avaliação de prognóstico em pacientes com  
insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida**

Rio de Janeiro  
2019

Felipe Neves de Albuquerque

**Desenvolvimento de um escore genético de risco para  
avaliação de prognóstico em pacientes com  
insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréa Araujo Brandão  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayse Aparecida da Silva

Rio de Janeiro  
2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

A345 Albuquerque, Felipe Neves de.  
Desenvolvimento de um escore genético de risco para avaliação de prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida / Felipe Neves de Albuquerque – 2019.  
85 f.

Orientadoras: Andréa Araujo Brandão, Dayse Aparecida da Silva.  
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Insuficiência cardíaca – Prognóstico - Teses. 2. Insuficiência cardíaca - Pacientes – Avaliação de riscos de saúde - Teses. 3. Insuficiência cardíaca - Mortalidade - Teses. 4. Análise de sobrevivência (Biometria) – Teses. 5. Polimorfismo (Genética) – Teses. 6. Receptores Adrenérgicos beta. I. Brandão, Andréa Araujo. II. Silva, Dayse Aparecida da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.12-008.315

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

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

---

Assinatura

---

Data

Felipe Neves de Albuquerque

**Desenvolvimento de um escore genético de risco para  
avaliação de prognóstico em pacientes com  
insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida**

Tese apresentada, como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor, ao  
programa de Pós-Graduação em Ciências  
Médicas, da Universidade do Estado do  
Rio de Janeiro.

Aprovada em 05 de julho de 2019.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayse Aparecida da Silva  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréa Araujo Brandão (Orientadora)  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

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

---

Prof. Dr. Roberto Esporcatte  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dr. Wolney de Andrade Martins  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Fernando Bacal  
Universidade de São Paulo

Rio de Janeiro  
2019

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Elisa e Denilson, à minha esposa Claudia, a meus filhos Daniel e Bento e ao meu eterno avô Generoso.

## AGRADECIMENTOS

Quem parou para ler essa página deve saber que ela é a última a ser escrita. Quando quase não há mais energia ou criatividade, a gente se depara com uma página em branco te pedindo nomes. Será a página mais lida de todo o trabalho e o autor fica pensando se esqueceu alguém. Afinal, família, amigos e curiosos não estão interessados em destrinchar o que aconteceu com esse tal de polimorfismo mas todos adoram passar por esta seção. Eu tive o privilégio de contar com muitas pessoas nesse doutorado. Algumas estarão aqui diretamente e outras indiretamente. Mas a todas eu deixo um muito obrigado.

Assim, gostaria de agradecer à Claudia, minha esposa. Eu (não) consigo imaginar como foi difícil se dividir em duas enquanto estive ausente. Com filho de um ano e grávida do segundo, o desafio foi ainda maior. Mas você foi infalível. Foram muitas ausências e, até mesmo quando presente, eu ligava um “modo tese” e desaparecia... Eu sei de tudo isso. Obrigado! Por conseguir numa frase definir o que é apoio incondicional: “Pode ficar trabalhando que eu garanto aqui em casa”.... Você é simplesmente incrível!

Ao Daniel e Bento (!), meus filhos. Foi nesse ponto de exclamação que o nome do segundo foi escolhido. Bento nascerá em quatro meses e já tem história(s) para contar... Ao Dandan, que já conheço, escrevo para explicar que peguei o seu tempo emprestado para investir nessa obra. Mas, a partir de amanhã, vou devolver em dobro. À Elisa e Denilson, meus pais. Muita gente pensa que meu exemplo de vida profissional é o meu pai. Afinal, ele é um renomado cardiologista com uma história profissional magnífica. Engano deles. Meu modelo é uma combinação de vocês dois em partes iguais. Nosso orgulho (e falo também pelos meus irmãos) é imenso... Vocês estão ajudando a construir essa obra há 39 anos...

Ao meu avô Generoso (*in memoriam*) em nome de toda família (do Rio, de Recife e de Londres). Você é o início dessa história e continuará para sempre na nossa memória.

À Dra. Andréa. São dez anos de jornada acadêmica entre mestrado e doutorado. Na verdade, seriam quase 30 anos desde o momento em que um garoto de uns 12 anos dava um prosaico suporte de informática a uma de suas tias - amiga do seu pai. A semente dessa parceria era plantada há muito tempo. Através de seus comentários cirúrgicos, conseguiu extrair o melhor trabalho possível desse material. Não se trata

só de terminar um trabalho, mas sim de fazê-lo da melhor maneira possível. Você sabe deixar isso claro como ninguém.

À Prof.<sup>a</sup> Dayse Aparecida da Silva, orientadora, por suas brilhantes participações na elaboração deste trabalho.

A toda equipe médica da Clínica de Insuficiência Cardíaca do HUPE: Ricardo Mourilhe, Marcelo Bittencourt, Ana Luiza F. Sales e Pedro Spineti, pela parceria e amizade. Vocês são muito especiais.

À equipe da Cardiologia representada por Shirley Calleia, Simone Offrede, Fabio Abrahão e Veronika Braun e responsável por todo apoio logístico sob diversas formas. O acompanhamento e a energia de todos vocês nessa jornada foi notado.

A toda a equipe de Cardiologia do HUPE: médicos, residentes, enfermeiros, técnicos e servidores que, com o único objetivo de melhorar a vida de nossos pacientes, transformam nosso Serviço num dos melhores do País.

A toda a equipe do Hospital Samaritano, representada pela Arlete, que garantia todo o conforto possível para a redação deste trabalho nas salas de reunião durante as longas tardes, noites e fins de semana.

À equipe de revisores, representada pela Prof.<sup>a</sup> Maria Lucia Brandão, responsável pelo “acabamento” da obra. A diferença está nos detalhes e o domínio da técnica somado à dedicação na revisão do material foram imprescindíveis no momento de conclusão deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Nosso agradecimento.

O seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz.

*Steve Jobs*



## RESUMO

ALBUQUERQUE, Felipe Neves de. **Desenvolvimento de um escore genético de risco para avaliação de prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida**. 2019. 85f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A utilização de escores de risco genético já está sendo testada com sucesso em alguns cenários clínicos. No entanto, para insuficiência cardíaca (IC) ainda não há descrição de um painel genético robusto para avaliação prognóstica desses pacientes. Este estudo tem por objetivo avaliar a relação entre um escore de risco genético (ERG) e desfechos clínicos em indivíduos com IC com fração de ejeção reduzida. Para tal, em uma coorte de 178 pacientes, foram identificadas as variantes dos polimorfismos genéticos (PG) do receptor beta-adrenérgico-tipo1 ( $R\beta 1$ ), enzima conversora da angiotensina, óxido nítrico-sintase, aldosterona-sintase e angiotensinogênio. Foram realizadas duas etapas complementares na construção do ERG. O ERG foi construído a partir de cinco PG multissistêmicos. Inicialmente, analisou-se a relação isolada entre PG- $R\beta 1$  e desfechos clínicos. Esse resultado foi considerado em conjunto com dados da literatura para determinar os alelos de risco utilizados na construção do ERG. Em seguida, o ERG foi calculado a partir da soma do número de cópias de alelos de risco de cada PG (variação: 0-10). A população foi estratificada em dois grupos pelo tempo de doença: IC Inicial (<72 meses) ou IC Tardia ( $\geq 72$  meses). Os principais desfechos clínicos considerados foram: óbito, internação por IC. Foi adotado nível de significância de 5%. Foram encontrados os seguintes resultados: as médias da coorte foram: 63,5% de homens e 55,1% brancos. A etiologia da IC foi predominantemente isquêmica (31,5%), idiopática (23,6%) e hipertensiva (15,7%). Na primeira etapa de avaliação do PG- $R\beta 1$  – uma análise preliminar com tempo de seguimento de 6,7 anos, tempo de doença 8,9 anos e média de idade de 64,4 anos, observou-se uma relação significativa entre os genótipos e óbitos ( $p=0,026$ ) com o Gly-Gly associado a melhor prognóstico. O alelo Gly teve um efeito protetor independente mantido após análise multivariada e foi associado à redução na chance de óbito de 63% ( $p=0,03$ ; Odds Ratio: 0,37 – IC95%: 0,15-0,91). Para análise principal do trabalho – relacionada ao ERG, os tempos de acompanhamento e de doença foram maiores – 8,1 anos e 10,3 anos respectivamente, com uma média de idade de 65,8 anos. O escore foi dividido em duas faixas segundo o número de cópias de alelo de risco: Baixo (0-5) e Alto (6-10). Foram 123 pacientes (69,1%) classificados como ERG Alto. O ERG Alto foi associado a menor sobrevida na IC Inicial ( $p=0,018$ ). Em análise multivariada, ERG Alto associou-se ao dobro de risco de morte (HR=2,01; IC95%: 1,21-3,33;  $p=0,007$ ). Não houve associação significativa entre ERG e desfechos clínicos ou sobrevida após 72 meses de doença. Em conclusão: a presença do PG- $R\beta 1$  Gly-Gly associou-se a melhor evolução clínica e o alelo Gly foi preditor de menor risco de mortalidade, independente de outros fatores. O ERG, construído a partir de cinco polimorfismos, foi identificado como preditor de sobrevida na fase inicial da IC. O ERG associou-se ao dobro de risco de mortalidade numa fase inicial da IC independentemente de outros fatores.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca. Polimorfismo genético. Indicador de risco. Mortalidade. Sobrevida. Receptores adrenérgicos beta.

## ABSTRACT

ALBUQUERQUE, Felipe Neves de. **Development of a genetic risk score for the assessment of prognosis in patients with heart failure with reduced ejection fraction.** 2019. 85f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The use of genetic risk scores is being successfully tested in some clinical settings. Nevertheless, for heart failure (HF), there is no description of a robust genetic panel for prognostic evaluation of these patients yet. The objective was to evaluate the relationship between a genetic risk score (GRS) and clinical outcomes in individuals with HF with reduced ejection fraction. In a cohort of 178 patients, the SNP variants of beta 1 adrenergic receptor (ADBR1), angiotensin converting enzyme, nitric oxide synthase, aldosterone synthase and angiotensinogen were identified. The GRS development process consisted of two consecutive stages. The GRS was built from five multisystemic single nucleotide polymorphisms (SNP). First, the relationship between ADBR1 genotypes and clinical outcomes was evaluated. These findings were contemplated in addition to other publications to select the risk alleles. GRS was calculated from the sum of the number of risk allele copies of each SNP (variation: 0-10). The population was divided into two strata according to disease time: Early-Stage HF (<72 months) or End-Stage HF (≥72 months). The main clinical outcomes were: death and hospital admission due to HF. A significance level of 5% was adopted. The following results were observed: cohort means were: 63.5% of men and 55.1% of whites. HF etiologies were mainly ischemic (31.5%), idiopathic (23.6%) and hypertensive (15.7%). Preliminary analysis was done at 6.7 years of follow-up and 8.9 years of HF duration and mean age 64.4 years. There was a significant relationship between ADBR1 genotypes and clinical outcomes: Gly-Gly was related to better outcomes ( $p=0.026$ ). Multivariate analysis defined the Gly allele as an independent predictor of reduction in death by 63% ( $p=0.03$ , OR 0.37 – CI: 0.15-0.91). Subsequent findings evaluating the impact of GRS were analyzed at 8.1 years of follow-up, 10.3 years after HF diagnosis and mean age of 65.8 years. GRS was divided into two ranges according to the number of risk allele copies: Low (0-5) and High (6-10). High GRS was found in 123 patients (69.1%). High GRS was associated with lower survival in early-stage HF ( $p=0.018$ ). In a multivariate analysis, High GRS was associated with double risk of death (HR=2.01; CI 1.21–3.33;  $p=0.007$ ). There was no significant association between GRS and clinical outcomes or survival after 72 months of disease. In conclusion: ADBR1 Genotype was independently related to outcomes in HF: Gly-Gly patients presented with better outcomes and Gly allele was a predictor of lower mortality. The GRS, elaborated from five SNP, was identified as a predictor of survival in early-stage HF. The subgroup with High GRS was associated with double risk of mortality irrespective of other factors.

Keywords: Heart failure. Polymorphism, Genetic. Risk Index. Mortality. Survival. Receptors, Adrenergic, beta.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGT	Angiotensinogênio
ALDOS	Aldosterona-sintase
ANGII	Angiotensina II
Asp	Aspartato
BB	Betabloqueador
BRA	Bloqueador do receptor da angiotensina
CDI	Cardiodesfibrilador implantável
DAC	Doença arterial coronariana
DD	Deleção-deleção
DDVE	Diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo
DM	Diabetes mellitus
DSVE	Diâmetro sistólico de ventrículo esquerdo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ERG	Escore de risco genético
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fibrilação atrial
FC	Frequência cardíaca
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GWAS	<i>Genomic Wide Association Studies</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Insuficiência cardíaca
ICFER	Insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida
IECA	Inibidor da enzima de conversão de angiotensina
Ins	Inserção

MDRD	<i>The Modification of Diet in Renal Disease Study</i>
MP	Marca-passo
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
ON	Óxido nítrico
ONS	Óxido nítrico-sintase
PG	Polimorfismo genético
R $\beta$ 1	Receptor cardíaco beta-adrenérgico do tipo-1
Ser	Serina
SNS	Sistema nervoso simpático
SPNA	Sistema peptídeo-natriurético-atrial
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SUS	Sistema Único de Saúde
TRC	Ressincronizador cardíaco
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VE	Ventrículo esquerdo

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
1.1	<b>Objetivo primário</b> .....	14
1.2	<b>Objetivos secundários</b> .....	14
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1	<b>Genética: Polimorfismos genéticos &amp; <i>Genome Wide Association Studies</i></b> .....	15
2.2	<b>Os Polimorfismos genéticos de interesse na IC</b> .....	17
2.3	<b>Painel genético &amp; Escore de risco genético</b> .....	20
3	<b>MÉTODOS</b> .....	22
3.1	<b>Caracterização do estudo</b> .....	22
3.2	<b>População do estudo</b> .....	23
3.3	<b>Procedimentos de investigação</b> .....	23
3.3.1	<u>Coleta de dados</u> .....	23
3.3.2	<u>Genotipagem</u> .....	26
3.4	<b>Análise estatística</b> .....	29
4	<b>PUBLICAÇÕES</b> .....	31
4.1	<b>O Polimorfismo genético do receptor beta-adrenérgico tipo 1 Ser49Gly é preditor de morte em pacientes brasileiros com insuficiência cardíaca (Artigo submetido)</b> .....	33
4.2	<b>Genetic risk score with five polymorphisms is an independent predictor of survival in early stage heart failure (Artigo submetido) ...</b> .....	47
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>ANEXO A – Parecer da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa</b> .....	78
	<b>ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE</b> .....	79
	<b>ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	80
	<b>ANEXO D – Comprovação de aceite do 1º artigo</b> .....	84
	<b>ANEXO E – Comprovação de submissão do 2º artigo</b> .....	85

## INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é a principal causa de hospitalização por doenças do aparelho cardiovascular com quase 40 milhões de pacientes no mundo.<sup>1</sup> Números oficiais ilustram essa grandeza: no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil em 2018, foram 202 mil hospitalizações com um custo de 311 milhões de reais e média de 80 óbitos por dia relacionados à síndrome.<sup>2</sup> Para melhor estimativa, pode-se utilizar como base os Estados Unidos da América onde a informação epidemiológica é mais acurada: 2,4% da população estadunidense tem diagnóstico de IC.<sup>3</sup> Assim, no Brasil, o número presumido seria de 5 milhões de pacientes com 500 mil novos casos por ano.

Apesar do avanço no tratamento da IC,<sup>4</sup> as taxas de mortalidade permanecem elevadas com até 50% de morte nos primeiros cinco anos após o diagnóstico.<sup>3</sup> Identificar os pacientes de alto risco e prever sua história natural seriam interessantes para adequar a terapêutica individualmente. Mas a estratégia atual, baseada exclusivamente em parâmetros clínicos, laboratoriais e de imagem, é limitada.

Essa diversidade de apresentações fenotípicas pode, em parte, ser explicada pela genética.<sup>5</sup> Assim como em outros cenários clínicos como câncer<sup>6</sup> ou doença arterial coronariana (DAC),<sup>7</sup> estudos específicos para testar essa relação com IC começaram a ser mais publicados nos últimos 25 anos. O objetivo é identificar um ou mais biomarcadores genéticos associados ao prognóstico desses pacientes. Mas, afinal, será que este objetivo está próximo? O trabalho atual foi desenhado com a finalidade de contribuir para o conhecimento desse tema.

O presente trabalho será apresentado sob o modelo de dois artigos científicos que fazem parte de uma linha de pesquisa sobre marcadores genéticos e desfechos clínicos com parâmetros de exames complementares em pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida (ICFER).

A linha de pesquisa foi iniciada em 2009 como parte do programa de mestrado do autor. Na época, foi investigado o impacto dos polimorfismos genéticos da enzima conversora de angiotensina sobre desfechos clínicos e ecocardiográficos. Assim, a primeira publicação desse projeto<sup>8</sup> descreveu a frequência das variantes genéticas diferente de estudos internacionais. Além disso, também foi observado um padrão genético associado de forma independente à pior evolução ecocardiográfica. Esse achado indicava a potencial utilização dos genótipos como marcadores biológicos em uma população brasileira.

Na fase atual desse projeto, continuou-se com a investigação incluindo, além da enzima conversora de angiotensina (ECA), outros quatro polimorfismos de proteínas

protagonistas na resposta fisiopatológica da síndrome. Foi realizada a genotipagem para o receptor beta-adrenérgico tipo 1 ( $R\beta 1$ ), óxido nítrico-sintase (ONS), aldosterona-sintase (ALDOS) e angiotensinogênio (AGT).

Por seu reconhecido e determinante papel de protagonista na atuação dos efeitos do sistema nervoso simpático, os genótipos do  $R\beta 1$  foram observados com especial interesse. Assim, o primeiro artigo apresentado avaliou exclusivamente a relação entre os polimorfismos genéticos do  $R\beta 1$  e desfechos clínicos maiores.

O segundo estudo analisou um painel genético elaborado a partir da genotipagem dos cinco elementos previamente citados ( $R\beta 1$ , ECA, ONS, ALDOS e AGT). Assim, foi avaliado o papel, como preditor de risco, da combinação de polimorfismos através de um escore de risco genético para esses pacientes.

Em ambos os estudos, a mesma população de 178 pacientes com ICFER foi avaliada com uma diferença no tempo de acompanhamento entre as duas análises.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo primário

Avaliar a relação entre polimorfismos genéticos de interesse e desfechos clínicos relevantes (sobrevida, óbitos e hospitalização por IC) em pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida acompanhados por 8,1 anos.

### 1.2 Objetivos secundários

Determinar a frequência das variantes dos polimorfismos genéticos do receptor  $\beta$ 1 adrenérgico, da enzima conversora de angiotensina, óxido nítrico-sintase, aldosterona-sintase e angiotensinogênio em pacientes com ICFER.

Elaborar um painel genético combinando os cinco polimorfismos genéticos (PG-R $\beta$ 1, PG-ECA, PG-ONS, PG-ALDOS e PG-AGT) denominado escore de risco genético.

Avaliar a relação entre desfechos clínicos relevantes (óbitos e hospitalização por IC) e as variantes do PG-R $\beta$ 1.

Avaliar a relação entre parâmetros ecocardiográficos, parâmetros clínicos – incluindo a classe funcional pela New York Heart Association (NYHA), e as variantes do PG-R $\beta$ 1.

Avaliar a relação entre desfechos clínicos (sobrevida, óbitos, hospitalização por IC) e o ERG.

Avaliar a relação entre parâmetros ecocardiográficos e parâmetros clínicos, incluindo a classe funcional pela New York Heart Association (NYHA), e o ERG.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura realizada compreende apenas os aspectos considerados essenciais e fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

A identificação de diferentes níveis de ativação dos sistemas envolvidos na resposta humoral à falência cardíaca e sua relação com genótipos foi a base para o desenvolvimento desses estudos, isto é, padrões genotípicos distintos promovendo variação em processos celulares que estão relacionados a diferentes evoluções clínicas na IC.

O fenótipo é o conjunto de características observáveis de um indivíduo como suas funções e propriedades bioquímicas (em nível molecular), físicas (como os traços de uma pessoa) ou psicológicas (como seu comportamento). Portanto, uma variação macroscópica como a dextrocardia ou microscópica como uma alteração de aminoácidos na proteína do receptor beta-adrenérgico ou na composição da enzima conversora de angiotensina (ECA) são ambos exemplos de características fenotípicas. Elas são resultado da expressão dos genes desse organismo, determinada pelo seu genótipo, assim como pela influência de fatores ambientais.<sup>9</sup>

### 2.1 Genética: Polimorfismos genéticos & *Genome Wide Association Studies*

Mutações genéticas são mudanças na sequência dos nucleotídeos, os elementos básicos que compõem o DNA. Quando essas mutações são comuns na população (com uma frequência do alelo recessivo acima de 1%), são denominadas polimorfismos genéticos (PG). Cada polimorfismo representa uma única variação dessa sequência genética e está associada a uma diferença em apenas um nucleotídeo.<sup>9</sup> O termo mutação genética é mais amplo e significa qualquer alteração do DNA podendo incluir mais de um nucleotídeo.

Assim, um PG pode ser uma substituição, inserção ou deleção de base em qualquer parte do DNA. Essas mudanças são frequentes no genoma e ocorrem até 5 milhões de vezes em único indivíduo. Normalmente, não determinam qualquer efeito clínico uma vez que se localizam em sequências não codificadoras do gene (íntrons). Afinal, apenas 2% do DNA distribuídos pelos 30 000 genes humanos são lidos durante a síntese de proteínas.<sup>10</sup>

Quando essas alterações são em sequências codificadoras ativas dos genes (éxons), elas resultam numa síntese de proteínas defeituosas. Essas proteínas modificadas podem se apresentar como doença (anemia falciforme, por exemplo)

ou apenas promover mudanças em nível molecular de mecanismos celulares. Assim, através de uma genotipagem específica, seria possível prever um fenótipo e os polimorfismos serviriam como marcadores biológicos.

Para testar essa hipótese, o primeiro passo seria identificar os polimorfismos de interesse para cada problema. Isso foi possível a partir de 2007 com o advento da tecnologia dos Estudos Genômicos de Associação Ampla - *Genomic Wide Association Studies* (GWAS) capazes de analisar simultaneamente milhões de variações genéticas.<sup>11</sup> Esses estudos são desenhados como caso-controle e pesquisam uma associação entre esses padrões genéticos e alguma característica de interesse (cor dos olhos, cor da pele, altura ou uma doença, por exemplo).

A maioria das doenças e dos traços físicos têm herança poligênica como, por exemplo, a altura que conta com variações genéticas em 180 *loci* diversos<sup>12</sup> ou o perfil lipídico em que 95 *loci* diferentes interagem para determinar os níveis de colesterol total.<sup>13</sup> O sinergismo de genes distintos estariam envolvidos em múltiplos mecanismos fisiopatológicos e, portanto, sob influência de vários genes.

Ao comparar a frequência de milhões de genótipos entre pacientes e indivíduos saudáveis, foi possível mapear os polimorfismos importantes. Assim, aqueles que eram estatisticamente diferentes entre os grupos seriam potencialmente relevantes e poderiam ser testados através de estudos específicos.

No caso da IC, por se tratar de uma doença multissistêmica com uma resposta fisiopatológica abrangendo o sistema nervoso simpático (SNS), o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e o sistema peptídeo-natriurético-atrial (SPNA) foram múltiplos os genes candidatos e seus respectivos polimorfismos.<sup>14</sup> Alterações desses genes poderiam influenciar a resposta fisiopatológica e determinar uma evolução clínica variável. Dessa forma, ao identificar essas alterações através dos PG, potencialmente ter-se-iam informações prognósticas sobre esses pacientes.

Assim, a participação da genética na IC tem sido largamente estudada tanto em pequenos estudos como em grandes ensaios clínicos. Essa influência genética abrange todas as etapas dessa síndrome<sup>15</sup> e já foi estudada nas fases de pré-instalação<sup>16,17</sup> (predisposição e fatores de risco), durante as alterações morfológicas<sup>5</sup> (fisiopatologia) e finalmente na fase clínica (história natural da doença<sup>18-24</sup> e resposta terapêutica<sup>25-28</sup>).

Em relação à história natural e desfechos clínicos, observam-se estudos com um número limitado de pacientes, em populações de etnias diferentes e com resultados nem sempre homogêneos. No entanto, quando analisados em conjunto, é possível destacar alguns desses polimorfismos. No Quadro 1, eles estão listados com os genótipos definidos como de risco, suas associações clínicas desfavoráveis e efeitos funcionais específicos.

Quadro 1 - Principais características dos polimorfismos genéticos de interesse na IC

Proteína	Variante genética	Efeito funcional	Efeito clínico esperado	Associação clínica na ICFER	Alelo de risco	Autor
Receptor $\beta$ -adrenérgico tipo 1	Ser49Gly	Gly49: $\uparrow$ desensibilização R $\beta$ 1	Bloqueio adrenérgico "intrínseco"	Gly: menos óbitos	Ser49	Börjesson et al., 2000 <sup>58</sup> Albuquerque et al., 2019 [In press] <sup>73</sup>
Enzima conversora da angiotensina	Deleção-inserção	II: $\downarrow$ níveis de ECA e angiotensina	$\downarrow$ Fibrose/Hipertrofia miocárdica	Alelo Ins: melhora Eco Alelo Del: $\uparrow$ morte	Del	Albuquerque et al., 2014 <sup>8</sup> Duque et al., 2016 <sup>19</sup> Andersson et al., 1996 <sup>21</sup>
Óxido nítrico-sintase	Glu298Asp (G894T)	<i>Glu298</i> : $\uparrow$ desacoplamento ONS $\uparrow$ radical livre miocárdico	Disfunção endotelial	Glu298: $\downarrow$ sobrevida	G (Glu298)	Martinelli et al., 2012 <sup>53</sup> Azzam et al., 2015 <sup>22</sup>
Aldosterona-sintase	-344C>T (CYP11B2)	TT: $\downarrow$ síntese aldosterona	$\downarrow$ fibrose, remodelamento e hipertrofia miocárdica	CC: $\downarrow$ sobrevida	C	McNamara, 2006 <sup>23</sup>
Angiotensinogênio	M235T	TT/TM: $\uparrow$ níveis angiotensina	$\downarrow$ Fibrose/Hipertrofia miocárdica <sup>26</sup>	TT: $\uparrow$ morte	T	Winkelman et al., 1999 <sup>74</sup> Pilbrow et al., 2007 <sup>24</sup>

Legenda: insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida (ICFER); receptor  $\beta$ 1-adrenérgico (R $\beta$ 1); enzima conversora da angiotensina (ECA); inserção (Ins); deleção (Del); óxido nítrico-sintase (ONS); insuficiência cardíaca (IC).

Fonte: O autor, 2019.

## 2.2 Os Polimorfismos genéticos de interesse na IC

Em relação ao SRAA, a enzima conversora de angiotensina e o seu subproduto a angiotensina II (ANGII) participam de forma decisiva na mediação dos efeitos deletérios da resposta humoral. Esse hormônio atua como vasoconstrictor, no remodelamento cardíaco da IC, na hipertrofia ventricular da hipertensão arterial sistêmica (HAS) e na síntese de aldosterona.<sup>29</sup> Assim, foi natural o interesse na pesquisa dos polimorfismos associados ao gene da ECA.<sup>29-32</sup>

Um dos principais e com maior associação a eventos clínicos e parâmetros ecocardiográficos foi o polimorfismo genético da enzima conversora de angiotensina (PG-ECA) deleção/inserção do íntron 16. O genótipo deleção-deleção (DD), foi associado a risco de IC,<sup>33</sup> mortalidade por todas as causas<sup>21</sup> e rejeição a transplantes

cardíacos.<sup>34</sup> Foi observado anteriormente em uma análise isolada do PG-ECA seu papel como preditor de pior perfil ecocardiográfico e, indiretamente, de pior prognóstico.<sup>8,20,35</sup> Assim como nos trabalhos publicados com outras etnias, foi confirmado o padrão de risco do alelo D também na população brasileira.

Uma outra molécula fundamental na atuação do SRAA é a ANGII. Como descrito anteriormente, seu efeito vasoconstritor e a relação com níveis mais elevados de pressão arterial são bastante conhecidos.<sup>36,37</sup> Nesse caso, o gene do angiotensinogênio (AGT) – molécula precursora da ANGII foi o candidato com mais polimorfismos estudados. A variante genética de maior destaque foi o polimorfismo genético do angiotensinogênio (PG-AGT) no códon 235 (M235T). Além da relação com HAS,<sup>38,39</sup> o alelo Thr esteve associado a maior risco de IC<sup>40</sup> e maior mortalidade como observado por Imen et al.<sup>41</sup> e Pilbrow et al.<sup>24</sup>

A aldosterona é o terceiro protagonista do SRAA. Trata-se de um hormônio mineralocorticoide produzido na zona glomerulosa do córtex adrenal exclusivamente pela aldosterona-sintase. Esta enzima é codificada pelo gene CYP11B2 no *locus* 8q22. Destaca-se o polimorfismo genético da aldosterona-sintase (PG-ALDOS) transição C/T na posição -344 (-344C>T). No maior trabalho com esse polimorfismo, McNamara et al.<sup>23</sup> acompanharam 354 pacientes genotipados para este PG e concluíram que o alelo C foi relacionado de maneira significativa a pior sobrevida livre de hospitalização e óbito. Embora haja trabalhos como o de Feola et al.<sup>42</sup> em que esse padrão não se repetiu, a maioria das publicações confirmam esse padrão deletério, observando outros desfechos substitutos como pior resposta terapêutica,<sup>43</sup> maior associação com fibrilação atrial<sup>44</sup> e pior padrão ecocardiográfico<sup>45</sup> em pacientes com alelo C.

O ciclo do óxido nítrico é apontado por alguns autores<sup>46</sup> como o principal agente na fisiopatologia da IC. A influência sobre os SNS, SRAA e SPNA se daria através de um mecanismo de disfunção endotelial.<sup>47</sup> Esse ciclo envolve pelo menos 12 elementos-chave e é responsável por regular um complexo conjunto de reações metabólicas chamadas de estresse oxidativo. Embora a contribuição individual desses componentes não seja exuberante, uma enzima em particular pode ser destacada: a óxido nítrico-sintase (ONS).

A ONS é a responsável pela produção do óxido nítrico (ON) que tem participação direta na regulação e homeostase da função cardíaca e vascular.<sup>48</sup> Em processos inflamatórios como na IC, desequilíbrios nessa via contribuem para a resposta fisiopatológica. Assim, variações na atividade da ONS secundárias a mutações genéticas são potencialmente interessantes. A mais estudada é um polimorfismo que existe no nucleotídeo 894 (G-T) e promove a conversão do glutamato (Glu) para aspartato (Asp) no códon 298: o polimorfismo genético da óxido nítrico-sintase (PG-ONS) Glu298Asp.

O PG-ONS Glu298Asp é o polimorfismo com os resultados mais divergentes nessa revisão. A principal causa é a diferença entre as etnias.<sup>49</sup> A distribuição dos genótipos de acordo com a cor da pele pode ser distinta até para um mesmo país como descrito por Velloso et al.<sup>50</sup> ao comparar populações brasileiras de estados diferentes. Luo et al.<sup>49</sup> também observaram que alguns comportamentos eram restritos a algumas etnias: como a associação do alelo T a risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) apenas em asiáticos. Por último, a etiologia da IC também influencia essa resposta com resultados divergentes entre isquêmicos<sup>51</sup> e não isquêmicos.<sup>52</sup>

Assim, para definir um genótipo de risco do ON baseou-se em trabalhos nacionais com características populacionais mais próximas às da coorte avaliada. Em Porto Alegre, capital do Rio Grande do Sul, Martinelli et al.<sup>53</sup> observaram em 316 pacientes com IC que o alelo G foi relacionado a pior prognóstico. Velloso et al.<sup>50</sup> também associaram o alelo G à predisposição de IC no município de Niterói, do estado do Rio de Janeiro. Esses achados não são uniforme e há trabalhos sem associação clínica<sup>51,54</sup> e até inversão desses achados.<sup>52</sup> Mas, na sua maioria, o alelo G foi descrito como o padrão genético de risco para esse PG, inclusive internacionalmente, como descrito por Azzam et al.<sup>22</sup>

Em relação ao SNS, o receptor cardíaco beta-adrenérgico do tipo-1 ( $R\beta 1$ ) é a principal estrutura responsável por mediar os efeitos da adrenalina. A estimulação sustentada desse sistema determinará múltiplos efeitos deletérios,<sup>17</sup> destacando-se a cardiotoxicidade. Os polimorfismos associados ao  $R\beta 1$  determinariam maior ou menor grau de ativação simpática.<sup>25</sup> Por isso, essas variantes genéticas foram eleitas como os marcadores biológicos principais desse eixo humoral e foram testadas em diferentes cenários clínicos da IC.

Foram descritas algumas variantes genéticas que modificavam a atividade desse receptor. A principal delas foi identificada na posição 145 do nucleotídeo que resultava em substituição da serina (Ser) por glicina (Gly) na posição 49 do aminoácido – o polimorfismo genético *Ser49Gly* do  $R\beta 1$  (PG- $R\beta 1$ -Ser49Gly).<sup>55</sup>

No contexto da IC, foi demonstrado uma relação significativa desse PG com: predisposição,<sup>55</sup> resposta terapêutica,<sup>56</sup> desfechos ecocardiográficos,<sup>57</sup> e desfechos clínicos.<sup>18,58</sup> Mas também há trabalhos em que essa associação não foi observada.<sup>59-61</sup> Assim como para o óxido nítrico, um dos mecanismos possíveis para explicar essa divergência é a potencial influência da etnia nos genótipos.<sup>18,25,62</sup>

Em geral, o alelo Ser foi associado à pior evolução clínica,<sup>58</sup> no entanto, observou-se uma inversão desse comportamento maligno em algumas populações.<sup>25</sup> Por essas razões, o papel desse genótipo permanece em aberto, em especial no Brasil, o que motivou o primeiro artigo deste projeto.

### 2.3 Painel genético & Escore de risco genético

A utilização das mutações do gene BRCA como fator de risco, diagnóstico e definição do tratamento nas mulheres com câncer de mama<sup>63</sup> é o melhor exemplo de um teste genético incorporado à prática clínica. Não há dúvida sobre seu valor nos subgrupos de risco (mulheres com história familiar) e tem sido avaliada a possibilidade de um rastreamento universal.<sup>64</sup>

Ao contrário da neoplasia de mama familiar, não há um marcador biológico definitivo para prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca. Embora os estudos com polimorfismos analisados individualmente tenham confirmado a relevância de alguns genes, esses resultados ainda não são absolutos. Mais ainda, a probabilidade de que vários PG possam contribuir em conjunto, de forma variável, para determinada evolução clínica mostra a complexidade do tema.

No campo da IC, são poucas as publicações que combinaram diferentes polimorfismos como preditores de eventos. Nesses estudos, algumas limitações foram observadas: resultados restritos a subgrupos,<sup>11</sup> baixo número de pacientes<sup>15</sup> e ausência de múltiplos eixos humorais genotipados.<sup>12</sup> Uma exceção é o trabalho de Zakrzewski-Jakubiak et al:<sup>31</sup> os autores analisaram 10 polimorfismos diferentes simultaneamente. No entanto, apenas a combinação de dois PG foi significativa para predisposição à IC. Assim, permanece uma lacuna sobre o valor de um painel genético multissistêmico na avaliação prognóstica da IC.

Pelo caráter poligênico da IC, a associação de marcadores genéticos dos três sistemas (SNS, SRAA e SPNA) parece mais interessante para espelhar o produto da resposta fisiopatológica individual e conseqüentemente a gravidade clínica. Essa estratégia de um painel genético já foi testada com sucesso em outros cenários como doença arterial coronariana (DAC)<sup>7</sup> e neoplasia de cólon.<sup>6</sup>

Como descrito anteriormente, a primeira questão seria a definição dos genes e polimorfismos que deveriam fazer parte desse painel genético de risco da IC. Antes dos GWAS, essa pesquisa se baseava nos fundamentos da fisiopatologia da síndrome para identificar os genes candidatos.<sup>5</sup> Combinando os achados de pequenos trabalhos através de meta-análises, alguns polimorfismos foram indicados como potencialmente úteis e foram descritos acima.

De uma maneira geral, apesar do poder dos GWAS para identificar uma base genética para muitas doenças complexas, o sucesso para a IC é pequeno.<sup>65,66</sup> A complexidade da fisiopatologia e a multiplicidade de etiologias explicam essa limitação.<sup>67</sup> Em outras doenças como DAC, acidente vascular encefálico ou fibrilação

atrial em que essa heterogeneidade é menor, a identificação de padrões genéticos já foi descrita.<sup>68</sup>

No entanto, foram descritos alguns avanços na IC. Alguns genótipos foram associados a etiologias específicas,<sup>69,70</sup> a parâmetros clínicos<sup>71</sup> e houve incorporação de alguns marcadores genéticos na classificação de cardiomiopatias.<sup>72</sup> Mas esses dados não são úteis para estratificar o risco de forma generalizada para esses pacientes.

Assim, a construção de um painel genético a partir dos polimorfismos já associados a processos fisiopatológicos e desfechos clínicos continua interessante e foi objeto da segunda parte desse projeto. Após revisão da literatura, optou-se por selecionar os polimorfismos dos seguintes elementos que seriam representativos de etapas diversas do processo fisiopatológico:

- a) polimorfismo genético do receptor b-adrenérgico tipo 1: Ser49Gly (PG-Rb1-Ser49Gly);<sup>73</sup>
- b) polimorfismo genético da enzima conversora de angiotensina: deleção/inserção (PG-ECA);<sup>8</sup>
- c) polimorfismo genético da óxido nítrico-sintase: Glu289Asp (PG-ONS);<sup>22</sup>
- d) polimorfismo genético da aldosterona-sintase: -344C>T (PG-ALDOS);<sup>23</sup>
- e) polimorfismo genético do angiotensinogênio: M235T (PG-AGT).<sup>74</sup>



## 3 MÉTODOS

### 3.1 Caracterização do estudo

Trata-se de estudo do tipo coorte, observacional, de um único centro, prospectivo (a partir do início do trabalho) e retrospectivo (desde o início do acompanhamento do paciente na Clínica IC-HUPE), a partir da análise secundária dos prontuários médicos.

O estudo foi desenvolvido entre dezembro 2009 e abril 2019 na Clínica de IC do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) onde todos os pacientes foram acompanhados, e no Laboratório de Diagnósticos por DNA do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, onde a análise genética foi realizada.

A Clínica IC-HUPE, estabelecida em 1988, é responsável atualmente pelo acompanhamento de cerca de 850 pacientes. Conta com infraestrutura para armazenamento dos próprios prontuários além de *software* específico para atendimento de pacientes – Consultório Digital (fornecido pela Sociedade Brasileira de Cardiologia) – onde são armazenadas todas as informações referentes à prescrição médica.

A equipe multidisciplinar da clínica compreende cinco médicos cardiologistas, um enfermeiro, uma técnica de enfermagem e uma bióloga responsável pelas amostras laboratoriais, além de uma secretária exclusiva para lidar com a logística envolvida nos ensaios clínicos de que participa, como o transporte de amostras, documentação médica com os organismos competentes, entre outras atividades.

Todos os pacientes são tratados conforme orientações da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca, publicadas e atualizadas periodicamente pela Sociedade Brasileira de Cardiologia.<sup>4</sup>

Por se tratar de um núcleo de pesquisa clínica internacional (com a participação em diversos ensaios clínicos multicêntricos já finalizados e em andamento), os prontuários médicos da clínica são continuamente auditados por monitores externos para garantir a qualidade.

O Laboratório de Diagnósticos por DNA do Instituto de Biologia da UERJ atende a 20 alunos de graduação e pós-graduação em Biologia e Medicina, coordenados por três professores doutores da área de Biociências.

O projeto foi incluído na base de dados do Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (SISNEP) em 03/11/2009 sob o nº CAAE-0176.0.228.000-09 e folha de rosto nº 301213 (ANEXO A). Em 16/12/2009, o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP/HUPE) (ANEXO B). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado por todos os pacientes antes de qualquer procedimento (ANEXO C), de acordo com a Resolução CNS 466/12.



## 3.2 População do estudo

Foram estudados 178 pacientes (113 homens e 65 mulheres) com diagnóstico de IC com fração de ejeção reduzida, incluídos de forma consecutiva e acompanhados por 8,1 anos. Trata-se, portanto, de amostra de conveniência. O recrutamento de pacientes foi encerrado em março de 2018 para permitir 12 meses de seguimento clínico.

Critérios de inclusão:

- a) indivíduos com idade > 18 anos;
- b) IC sintomática pelos Critérios de Framingham;
- c) disfunção ventricular sistólica e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE)  $\leq 50\%$  ao ecocardiograma bidimensional.

Indivíduos com status clínico desconhecido ao final do trabalho foram excluídos na análise de sobrevida e de desfechos, mas tiveram as demais características analisadas.

Critérios de exclusão:

- a) pacientes com expectativa de vida reduzida por outra comorbidade;
- b) pacientes em lista de transplante no momento da inclusão;
- c) pacientes sem registro médico adequado, incluindo exames laboratoriais e ecocardiográficos disponíveis no prontuário da Clínica IC-HUPE.

## 3.3 Procedimentos de investigação

### 3.3.1 Coleta de dados

As informações foram colhidas dos prontuários médicos dos pacientes, desde o início do seu acompanhamento.

Os procedimentos referentes ao estudo como análise de dados do prontuário médico e a obtenção de dados clínicos e de exames complementares foram realizados de forma cega para os investigadores. A informação do genótipo só foi conhecida ao final da revisão de prontuários, portanto nenhum dos médicos-assistentes tinha conhecimento dessa informação durante as consultas realizadas.

Os dados clínicos extraídos do prontuário médico foram coletados pelo autor com auxílio de um médico-residente do próprio serviço de cardiologia do HUPE que esteve sob supervisão durante todo o período. Essa informação foi registrada em uma planilha / banco de dados do *Microsoft Excel*. As variáveis clínicas avaliadas estão listadas a seguir:

- a) características do paciente: nome, número do prontuário, data nascimento, sexo e cor da pele. A idade foi calculada tomando-se por base a data da última consulta e/ou do registro do óbito;
- b) características do acompanhamento médico: data da primeira consulta, data do diagnóstico de IC e data da última consulta;
- c) etiologia da IC classificada conforme critérios descritos adiante;
- d) comorbidades: arritmias: fibrilação/*flutter* atrial (FA); hipertensão arterial sistêmica (HAS); diabetes mellitus (DM); etilismo;
- e) medicação concomitante: uso das seguintes medicações na última consulta: betabloqueador (BB): carvedilol, metoprolol ou bisoprolol; inibidor da enzima de conversão de angiotensina (IECA): captopril ou enalapril; bloqueador do receptor da angiotensina (BRA): losartana; furosemida: incluindo dose diária; espironolactona; digoxina;
- f) classe funcional da *New York Heart Association* (NYHA) na primeira e na última consulta;
- g) dados adicionais: presença de baixa adesão ao tratamento;
- h) presença de dispositivos implantáveis: marca-passo (MP); terapia de ressincronização cardíaca (TRC); cardiodesfibrilador implantável (CDI);
- i) desfechos clínicos: presença e número de internações por IC com data da última internação; óbito com data e causa.

As etiologias foram classificadas em: isquêmica, idiopática, hipertensiva, alcoólica e outras. A definição da etiologia era responsabilidade do médico-assistente da clínica de IC, segundo critérios descritos previamente.<sup>75</sup>

O período de seguimento clínico foi definido como o intervalo em meses entre a data do início do acompanhamento na clínica (tão antiga quanto 16/03/1992) e a última consulta (tão recente quanto 22/04/2019) realizada pelo paciente até 01/05/2019 – data do fechamento do banco de dados.

A cor da pele foi observada pelo próprio médico-assistente e os indivíduos classificados em: branco, pardo ou preto.

Para as comorbidades analisadas, o diagnóstico do médico-assistente foi estabelecido segundo os critérios adotados pelas diretrizes pertinentes.<sup>4</sup> Assim, o relato no prontuário médico da presença de HAS, DM ou etilismo era suficiente. A presença dos dispositivos implantáveis (MP, TRC e CDI) foi registrada seguindo-se o mesmo critério.

A classificação da NYHA<sup>76</sup> é reconhecidamente um instrumento de avaliação de gravidade de pacientes com IC e utiliza uma escala de I a IV segundo a presença e intensidade de dispneia apresentadas pelos pacientes. Segue um critério objetivo: dispneia a grandes/médios/pequenos esforços ou em repouso para as seguintes classes funcionais I, II, III e IV, respectivamente. A classe funcional foi determinada no início e ao final do acompanhamento.

Os sinais vitais – frequência cardíaca e pressão arterial – foram medidos no início do acompanhamento clínico.

A busca de pacientes com baixa adesão ao tratamento foi definida como ausência ou uso irregular (mais de uma semana de intervalo entre interrupção e reinício) de medicações, não justificada por mais de três consultas durante o seguimento.

Todos os exames complementares realizados neste estudo e durante o acompanhamento médico foram analisados e solicitados de acordo com o julgamento clínico do médico-assistente.

A população amostral foi submetida a exames laboratoriais de forma periódica, seguindo o protocolo clínico da Clínica IC-HUPE. Foram considerados os exames disponíveis mais recentes como forma de identificar o perfil clínico mais atualizado possível.

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do HUPE mas, eventualmente, os pacientes realizaram os exames em laboratórios externos que foram também utilizados na análise.

Os dados observados foram: data do exame, hemoglobina, sódio, creatinina e potássio.

O eletrocardiograma (ECG) de 12 derivações em repouso mais recente foi utilizado para análise do ritmo cardíaco. duração do QRS ( $\geq$  ou  $<120$  ms) e presença de bloqueio de ramo esquerdo (BRE).

As avaliações pelo ecocardiograma (ECO) foram realizadas por equipe médica compreendendo cardiologistas especializados na área de ecocardiografia. Os genótipos dos pacientes eram desconhecidos para todos os médicos que fizeram esses exames.

Os aparelhos utilizados para o exame ecocardiográfico eram capacitados para exame uni e bidimensional simultâneo ou não e avaliação com Doppler pulsado, contínuo e mapeamento em cores. Dois modelos diferentes de aparelhos foram utilizados: GE modelo *Vivid 3* (EUA), *GE Vivid™ E95* (EUA) e *Phillips* modelo HD7 (Países Baixos). O transdutor utilizado foi de 2,75 MHz. A metodologia de obtenção das medidas ecocardiográficas correspondentes aos diâmetros cavitários e espessuras musculares obedeceram às normas da *American Society of Echocardiography*.<sup>77</sup>

Os parâmetros ecocardiográficos avaliados foram: diâmetro sistólico de VE (DSVE), diâmetro diastólico de VE (DDVE) e fração de ejeção de VE (FEVE). Foram utilizados dois exames: no início e ao final do acompanhamento. O método utilizado para cálculo da FEVE foi preferencialmente o de Simpson e, em alguns casos, utilizado o método de Teichholz.

Em apenas 6 dos 178 pacientes, não foi possível a avaliação pelo ECO ao final do estudo, por óbito antes da sua realização ou ausência da informação disponível.

Alguns pacientes tinham ECO da época do diagnóstico da IC, não realizado no HUPE. Nesse caso, utilizou-se este exame – o mais antigo de todos – para análise estatística. Optou-se por esse procedimento na tentativa de observar a evolução ecocardiográfica desde o diagnóstico da doença, minimizando o impacto do tratamento farmacológico sobre os parâmetros medidos, uma vez que parte dos pacientes já chegava à Clínica IC-HUPE em uso de alguns medicamentos.

Para análise evolutiva dos parâmetros ecocardiográficos, foram calculados o aumento ou a diminuição nos valores da FEVE e dos DSVE e DDVE entre a primeira e última avaliação ecocardiográfica do paciente, e quantificadas essas diferenças, sendo calculadas para FEVE ( $\Delta FE$ ), DSVE ( $\Delta DSVE$ ) e DDVE ( $\Delta DDVE$ ).

Também foram criadas variáveis evolutivas categóricas em relação ao ECO, sendo os pacientes classificados segundo a melhora ou piora da FE e dos diâmetros sistólico e diastólico do VE, utilizando-se como comparação o primeiro e o último ECO realizados.

Foram pesquisados os desfechos clínicos internação por IC e óbito combinados e isoladamente.

O registro de hospitalizações por IC, independentemente do local da internação, é feito rotineiramente pelo médico-assistente na evolução do paciente durante o atendimento e essa informação foi a utilizada para análise.

O registro de óbito foi extraído do prontuário médico e, na sua ausência, uma busca ativa era iniciada através do prontuário eletrônico, telefone ou de bancos de dados de certidões de óbito disponíveis na internet.

A *causa mortis* foi classificada segundo o mecanismo: progressão da IC, morte súbita ou outras causas.

### 3.3.2 Genotipagem

A análise das variantes dos polimorfismos foi realizada a partir de amostras de sangue venoso coletadas em tubo Vacutainer® (Becton-Dickinson) na Clínica IC-HUPE. Após armazenamento, sob uma temperatura de 5-15°C (Celsius), as amostras foram enviadas para o Laboratório de Diagnósticos por DNA da UERJ para as análises genéticas.

A extração do DNA foi realizada pelo método de *salting-out*, descrito a seguir. Uma alíquota de sangue total (2 mL) foi transferida para um tubo cônico. Adicionaram-se 2 mL de tampão de lise de hemácias (TLH), homogeneizando-se a solução contida no tubo e centrifugando-a a 3000 rpm por 5 minutos. Terminada a centrifugação, descartou-se o sobrenadante. Observou-se a presença de um *pellet* que é desprendido manualmente e a este foram acrescentados 500  $\mu$ L de tampão de lise de célula e 30  $\mu$ L de proteinase K 20 mg/mL. Homogeneizou-se o tubo manualmente e incubou-se a 37°C por 12 horas. Após a digestão, adicionaram-se 300  $\mu$ L de NaCl 6M e fez-se o agito da solução por cerca de 30 segundos. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo cônico, adicionou-se a este 1 mL de etanol gelado, homogeneizou-se o tubo, descartou-se o etanol. Observou-se a precipitação de DNA após o descarte do álcool. Ao precipitado foram adicionados 300  $\mu$ L de TE e a amostra foi mantida a -20°C.

A genotipagem foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase associada a de restrição de fragmentos com polimorfismo de comprimento (PCR-RFLP) para o gene do Receptor  $\beta$ 1 (PGR $\beta$ 1): polimorfismo Ser49>Gly<sup>78</sup>, gene da óxido nítrico-sintase endotelial: polimorfismo 894G>T<sup>79</sup>, gene aldosterona-sintase (CYP11B2): polimorfismo 344T/C<sup>80</sup> e gene do angiotensinogênio: polimorfismo 235M>T<sup>81</sup> e por reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene da enzima conversora de angiotensina (PGECA): polimorfismo inserção/deleção<sup>82</sup>. Os detalhes desses procedimentos estão listados no Quadro 2.

A partir dessa genotipagem, um painel genético foi elaborado para cada indivíduo, com informações a respeito dos genótipos (5 no total: 1 para cada PG) e alelos (10 no total: 2 para cada PG).

Na revisão da literatura, identificaram-se os alelos relacionados a pior prognóstico na IC para cada um desses cinco polimorfismos estudados. Assim, esses cinco alelos - denominados "alelos de risco", serviram de base para a construção da variável escore de risco genético (ERG).

O ERG representava o número total de cópias de alelos de risco identificadas para os PG do R $\beta$ 1, ECA, ONS, ALDOS e AGT. Baseado em modelos semelhantes para DAC,<sup>7</sup> o escore para cada indivíduo era calculado através da soma simples (isto é, com mesmo peso aritmético) do alelo de risco para cada um dos cinco PG estudados (2 pontos se homocigoto para alelo de risco, 1 ponto se heterocigoto para alelo de risco, nenhum ponto na ausência de alelos de risco daquele PG).

O ERG poderia variar de 0 (ausência de qualquer alelo de risco) a 10 (todos os alelos de risco possíveis). Essa variável foi classificada em duas faixas: ERG baixo (0 a 5 cópias de alelos de risco) e ERG alto (6 a 10 cópias de alelos de risco).

Quadro 2 – Informação do gene, polimorfismos e metodologia da genotipagem

Gene	Polimorfismo genético	Referência	Primers (5'-3')	Tm (°C)	Enzima de restrição	Genótipo (alelo) testado	
						Selvagem	Recessivo
Receptor $\beta$ 1adrenérgico	Ser49Gly (rs1801252)	Sandilands et al., 2003 <sup>78</sup>	CCGGGCTTCTGGGGTGTTC GGCGAGGTGATGGCGAGGTAGC	65°C	ECO0100I	Ser/Ser (Ser)	Gly/Gly
Enzima conversora angiotensina	Ins-Del (rs4646994)	Odawara et al., 1997 <sup>82</sup>	CTGGAGCCACTCCCATCCTTTCT GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT	63°C	-	Del/Del (Del)	Ins/Ins/ (Ins)
Óxido nítrico-sintase endotelial	Glu298Asp (rs1799983)	Dasar et al., 2012 <sup>79</sup>	CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC AGTCAATCCCTTTGGTCAC	63 °C	<i>MboI</i>	Glu/Glu (Glu)	Asp/Asp (Asp)
Aldosterona-sintase (CYP11B2)	-344C>T (rs1799998)	Gu et al., 2004 <sup>80</sup>	GTGTCAGGGGGGCAGGTA CGTGGGAGGGTCTGGACT	60°C	<i>HaeIII</i>	C/C (C)	T/T (T)
Angiotensinogênio	ATM235T Met235Thr (rs699)	Russ et al., 1993 <sup>81</sup>	GGAAGGACAAGAACTGCACCTC CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC	65 °C	<i>Tth111 I</i>	Met/Met (M)	Thr/Thr (T)

Fonte: O autor, 2019.

O teorema de Hardy-Weinberg descreve um dos princípios do equilíbrio genético de uma população. Ele afirma que as frequências alélicas e genotípicas permanecerão constantes / na mesma proporção no decorrer das gerações, independente de um alelo ser dominante ou recessivo ou um gene raro ou frequente. Para isso, não deve haver fatores externos que influenciem esse padrão como seleção natural, migração ou mutações.<sup>83</sup>

Assim, quando é feita a análise genética em qualquer estudo populacional, elas devem ser testadas para confirmar que estão em equilíbrio com o teorema de Hardy-Weinberg. Desvios do EHW indicam que podem ter ocorridos erros na genotipagem, estratificação da população (viés de seleção) ou mutação, por exemplo.

As frequências gênicas e haplotípicas foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg<sup>83</sup> utilizando uma ferramenta disponibilizada pela *Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*. De acordo com essa análise, exceto para o *locus* M235T ( $0,01 < p < 0,05$ ), todos os *loci* estão em equilíbrio ( $p > 0,05$ ).

### 3.4 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram armazenados e analisados por computador *IBM-PC* e *Apple-Macintosh*, através do programa estatístico *SPSS for Mac*, versão 25 de 2018. Em todos os testes utilizados, fixou-se em 0,05 ou 5% ( $p < 0,05$ ) como nível de rejeição da hipótese de nulidade e intervalo de confiança (IC) de 95%. Todas variáveis contínuas apresentadas nas comparações apresentaram distribuição normal e as medidas de tendência central foram expressas como média  $\pm$  desvio-padrão.

Foram utilizados os seguintes testes estatísticos:

- a) análise de variância (F): utilizado para a comparação das médias de variáveis de três ou mais amostras que apresentem distribuição normal e haja homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene e e Kolmogorov-Smirnov;
- b) teste de Tukey: usado na complementação da análise de variância para a comparação das médias das variáveis duas a duas;
- c) teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ): utilizado para a comparação das distribuições de frequência das variáveis de amostras independentes;
- d) teste de correlação bivariada de Pearson (r): utilizado para analisar a correlação de variáveis contínuas com ou sem distribuição normal;
- e) teste de regressão múltipla: utilizado para análise de correlação entre três ou mais variáveis contínuas com distribuição normal. Este

teste permitiu avaliar a influência que cada variável exerceu sobre o modelo final, sendo possível a determinação do significado estatístico para cada variável no modelo. As variáveis de distribuição não normal foram testadas nos modelos após sua transformação logarítmica. Este foi complementado pela análise de variância;

- f) teste de regressão logística binária: utilizada para a avaliação dos desfechos clínicos estudados. Inicialmente, para análise univariada, foram avaliadas as variáveis isoladamente com o objetivo de se identificar quais tinham relevância estatística. Posteriormente, na análise multivariada, essa avaliação foi feita de forma conjunta, como covariáveis. Foi considerado nível de significância de 95% para escolha de entrada e de 90% para remoção de variáveis no método de escolha “passo a passo”;
- g) análise de distribuição de Skewness: utilizada para avaliar a distribuição das variáveis estudadas;
- h) curva de sobrevida de Kaplan-Meier: utilizado para analisar a distribuição de dois ou mais estratos em termos de sobrevida cumulativa, relacionados a determinado evento. Foi complementada pela comparação dos estratos através do teste de *log-rank*.



## 4 PUBLICAÇÕES

Este trabalho de pesquisa deu origem a duas publicações:

a) **O Polimorfismo genético do receptor beta-adrenérgico tipo 1 Ser49Gly é preditor de morte em pacientes brasileiros com insuficiência cardíaca** (Artigo submetido):

- neste artigo, o objetivo principal foi analisar o comportamento do polimorfismo genético do receptor beta-adrenérgico tipo 1 Ser49Gly em relação a desfechos clínicos maiores (óbito e internação), em 178 pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida. Como há divergência na literatura atual e uma possível influência da etnia sobre esses genótipos, a definição do seu papel para a população brasileira torna-se essencial. A partir da genotipagem desses indivíduos, observou-se que a presença do genótipo Gly-Gly associou-se de modo significativo a melhor evolução clínica avaliada pela classe funcional da NYHA e foi preditor de menor risco de mortalidade, independente de outros fatores, em seguimento de 6,7 anos;
- este é o primeiro trabalho publicado na literatura nacional e internacional com este tempo de acompanhamento de pacientes com IC, o que aumenta a relevância dos presentes achados;
- este artigo foi submetido aos Arquivos Brasileiros de Cardiologia, tendo sido aceito para publicação. O comprovante de aceite encontra-se no ANEXO D;

b) **Genetic risk score with five polymorphisms is an independent predictor of survival in early stage heart failure** (Artigo submetido):

- a elaboração de um escore de risco genético (ERG) para pacientes com insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida foi o foco dessa publicação. O escore foi estruturado a partir da combinação de cinco polimorfismos representativos de múltiplas etapas da fisiopatologia da síndrome. Foi analisada a

relação entre esse painel genético e os desfechos clínicos relevantes em 178 pacientes com um tempo médio de doença acima de 10 anos. Observou-se que o ERG identificou, de maneira independente, um subgrupo com o dobro de risco de mortalidade numa fase inicial da doença. Até então, não há outros trabalhos que estudaram o valor prognóstico conjunto de cinco genes responsáveis pela codificação de diferentes protagonistas de processos fisiopatológicos em uma população com ICFER;

- este segundo artigo foi submetido ao European Journal of Heart Failure em junho de 2019. O comprovante de submissão encontra-se no ANEXO E.

#### 4.1 O Polimorfismo genético do receptor beta-adrenérgico tipo 1 Ser49Gly é preditor de morte em pacientes brasileiros com insuficiência cardíaca

##### RESUMO

**Fundamentos:** O papel do polimorfismo genético do receptor beta1-adrenérgico Ser49Gly (PG-Rb1-Ser49Gly) como preditor de eventos na insuficiência cardíaca (IC) não está definido para a população brasileira.

**Objetivos:** Avaliar a relação entre o PG-R $\beta$ 1-Ser49Gly e desfechos clínicos em indivíduos com IC com fração de ejeção reduzida.

**Métodos:** Análise secundária de prontuários de 178 pacientes e identificação das variantes do PG-R $\beta$ 1-Ser49Gly, classificadas como Ser-Ser, Ser-Gly e Gly-Gly e avaliar sua relação com evolução clínica. Foi adotado nível de significância de 5%.

**Resultados:** As médias da coorte foram: seguimento clínico 6,7 anos, idade 64,4 anos, 63,5% de homens e 55,1% brancos. A etiologia da IC foi predominantemente isquêmica (31,5%), idiopática (23,6%) e hipertensiva (15,7%). O perfil genético teve a seguinte distribuição: 122 Ser-Ser (68,5%), 52 Ser-Gly (28,7%), e 5 Gly-Gly (2,8%). Houve relação significativa entre esses genótipos e a classe funcional NYHA ao final do acompanhamento ( $p=0,014$ ) com o Gly-Gly associado a NYHA menos avançada. Em relação aos desfechos clínicos, houve associação significativa ( $p=0,026$ ) entre mortalidade e PG-R $\beta$ 1-Ser49Gly: o número de óbitos em pacientes com Ser-Gly ( $n=12$ ) ou Gly-Gly ( $n=1$ ) foram menores que com Ser-Ser ( $n=54$ ). O alelo Gly teve um efeito protetor independente mantido após análise multivariada e foi associado à redução na chance de óbito de 63% ( $p=0,03$ ; Odds Ratio 0,37 - IC 0,15-0,91).

**Conclusões:** A presença do PG-R $\beta$ 1 Gly-Gly associou-se a melhor evolução clínica avaliada pela classe funcional da NYHA e foi preditor de menor risco de mortalidade, independente de outros fatores, em seguimento de 6,7 anos.

**Palavras-chave:** Insuficiência cardíaca. Polimorfismo genético. Receptores adrenérgicos beta. Mortalidade.

##### INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é atualmente a principal causa de internação por doenças do sistema circulatório no Sistema Único de Saúde: foram 202 mil pacientes hospitalizados em 2018 com custo de 311 milhões de reais.<sup>1</sup>

A estratégia atual com parâmetros clínicos, laboratoriais e de imagem para prever seu prognóstico é limitada. Sua história natural é imprevisível mesmo em pacientes fenotipicamente semelhantes.

O arsenal terapêutico é capaz de reduzir a sua mortalidade em até 60%,<sup>2</sup> mas a resposta a essas drogas é heterogênea. Foi demonstrado que a natureza genética contribui para essa variabilidade.<sup>3-5</sup>

Na fisiopatologia da IC, o papel do sistema nervoso simpático (SNS) está bem estabelecido. O receptor cardíaco beta-adrenérgico do tipo 1 (R $\beta$ 1) é a principal estrutura responsável por mediar os efeitos da adrenalina. A estimulação sustentada desse sistema determinará múltiplos efeitos deletérios,<sup>3</sup> destacando-se a cardiotoxicidade.<sup>6</sup>

Assim, foram descritas algumas variantes genéticas que modificavam a atividade desse receptor. Um polimorfismo genético (PG) foi identificado na posição 145 do nucleotídeo que resultava em substituição da serina por glicina na posição 49 do aminoácido – o PG *Ser49Gly* do R $\beta$ 1 (PG-R $\beta$ 1-*Ser49Gly*).<sup>7</sup>

O PG-R $\beta$ 1-*Ser49Gly* foi associado a uma interferência dramática na função do R $\beta$ 1. O alelo *Gly* determinou maior redução no seu número (*down-regulation*) quando comparado ao alelo *Ser*.<sup>6,7</sup> Na IC, pela exposição contínua à adrenalina, essa disfunção poderia ser clinicamente relevante. Na prática, essa mutação genética determinaria uma dessensibilização com um interessante bloqueio adrenérgico intrínseco.<sup>8</sup>

Assim, no contexto da IC, há algumas publicações analisando o PG-R $\beta$ 1-*Ser49Gly* em cenários como: risco de IC,<sup>3,9-11</sup> resposta a betabloqueador,<sup>6,12</sup> desfechos ecocardiográficos,<sup>13</sup> capacidade funcional,<sup>14</sup> arritmia cardíaca<sup>10,15</sup> e desfechos clínicos.<sup>7,16,17</sup> Esses estudos compartilham um baixo número de pacientes e apresentam alguns achados divergentes. Em geral, o alelo *Gly* foi associado a uma melhor evolução clínica;<sup>7,17</sup> no entanto, observou-se uma potencial influência da etnia sobre esses genótipos, invertendo esse comportamento benigno em algumas populações.<sup>9</sup> Por essas razões, o papel desse genótipo permanece em aberto.

Portanto, a análise do comportamento desse PG em uma população brasileira, com características étnicas próprias, é fundamental para estabelecer o padrão desse PG para nossa população aumentando a nossa (pequena) base de dados genética atual.<sup>10,16</sup>

Este trabalho tem como objetivo avaliar a relação entre os genótipos do *Ser49Gly* e desfechos clínicos maiores, tais como internação por IC e óbito em indivíduos com IC com fração de ejeção reduzida.

## MÉTODOS

### Delineamento do estudo

Estudo longitudinal de uma coorte de pacientes. Coletou-se informação do prontuário médico entre janeiro de 2015 e dezembro de 2018, desde o início do seu acompanhamento. Todos foram atendidos na mesma clínica de IC de um hospital universitário.

### População do estudo

Trata-se de uma série de casos acompanhados por 6,7 anos, sendo incluídos de forma consecutiva 178 pacientes (113 homens e 65 mulheres) com diagnóstico de IC com fração de ejeção reduzida, caracterizando-se uma amostra por conveniência.

### Critérios de inclusão

Pacientes com mais de 18 anos de idade, com IC sintomática (definida pelos critérios de Framingham), disfunção ventricular sistólica e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE)  $\leq 50\%$  no ecocardiograma bidimensional.

### Critérios de exclusão

Pacientes com *status* clínico desconhecido ao final do trabalho.

## **Métodos**

### Análise estatística

A análise estatística feita através do programa SPSS para Mac versão 25. Em todos os testes, fixou-se em 0,05 ou 5% ( $p < 0,05$ ) como nível de rejeição da hipótese de nulidade e intervalo de confiança (IC) de 95%. Todas as variáveis contínuas apresentadas nas comparações tiveram distribuição normal e as medidas de tendência central e dispersão foram expressas, respectivamente, em média  $\pm$  desvio-padrão. Variáveis categóricas foram expressas em frequências absolutas e relativas n (%).

Foram utilizados os seguintes testes estatísticos: ANOVA One-Way, complementado pelo teste de Tukey, qui-quadrado e regressão logística. Foram utilizados o teste de Levene e Kolmogorov-Smirnov para avaliar a homogeneidade das variâncias. Quando não houve homogeneidade das variâncias, foi empregado o teste Kruskal-Wallis para comparar as médias de três ou mais amostras independentes e Mann-Whitney para até duas amostras independentes.

A regressão logística binária foi utilizada para a avaliação dos desfechos clínicos estudados. Inicialmente, para análise univariada, foram avaliadas as variáveis isoladamente com o objetivo de se identificar quais tinham relevância estatística. Posteriormente, na análise multivariada, essa avaliação foi feita de forma conjunta, como covariáveis. Foi considerado nível de significância de 95% para escolha de entrada e de 90% para remoção de variáveis no método de escolha “passo a passo”.

### Etiologia da insuficiência cardíaca

As etiologias foram classificadas em cinco grupos: isquêmica, idiopática, hipertensiva, alcoólica e outras. A definição da etiologia era responsabilidade do médico-assistente da clínica de IC, segundo critérios descritos previamente.<sup>18=</sup>

### Parâmetros clínicos, laboratoriais e eletrocardiográficos

A cor da pele foi indicada pelo médico-assistente e classificada em branca, preta ou parda. A classe funcional foi determinada de acordo com a *New York Heart Association* (NYHA), no início e ao final do acompanhamento. O registro de óbito foi extraído do prontuário médico e, na sua ausência, uma busca ativa era iniciada através do prontuário eletrônico, telefone ou de bancos de dados de certidões de óbito disponíveis na internet.

Foram considerados os exames laboratoriais mais recentes para análise estatística.

Todos os indivíduos foram submetidos a eletrocardiograma (ECG) analisados quanto à duração do QRS, presença de bloqueio de ramo esquerdo e fibrilação atrial.

#### Variáveis ecocardiográficas

Os parâmetros avaliados foram: diâmetro sistólico de VE, diâmetro diastólico de VE e fração de ejeção de VE. Foram utilizados dois exames: no início e ao final do acompanhamento.

#### Genotipagem

Agenotipagem foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase e restrição da extensão do fragmento (PCR-RFLP) para o gene do R $\beta$ 1: polimorfismo 49Ser>Gly. Os detalhes desses procedimentos seguiram literatura específica.<sup>19</sup>

Todos os indivíduos foram testados para a presença dos alelos Ser (selvagem e mais comum) e Gly (recessivo). A partir desses alelos, eles foram classificados em Ser-Ser, Ser-Gly e Gly-Gly.

As frequências gênicas e haplotípicas foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg<sup>20</sup> utilizando o *software* Arlequin versão 2000.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto em 16/12/2009. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os pacientes.

O presente estudo foi parcialmente financiado pela FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).

## **RESULTADOS**

### **Características da população do estudo total e pelos PG-R $\beta$ 1**

As características gerais da população estão expostas na Tabela 1. Pode-se destacar a média de idade de 64,4  $\pm$  12,8 anos (variação: 24-93 anos), a maior prevalência de homens, cor da pele branca e de etiologia isquêmica.

O tempo de acompanhamento médio na clínica de IC foi 6,7  $\pm$  4,4 anos.

Quanto ao perfil genético, o alelo Ser ocorreu 295 vezes (82,8%) enquanto que o Gly 61 vezes (17,2%). Em relação aos genótipos, 122 (68,5%) foram classificados como o Ser-Ser, 51 (28,7%) Ser-Gly e apenas 5 (2,8%) como Gly-Gly.

É possível destacar a diferença significativa ( $p=0,003$ ) entre os PG-R $\beta$ 1 e a cor da pele observada: houve uma maior prevalência de brancos entre aqueles com genotipagem Ser-Ser e praticamente um equilíbrio entre brancos e pardos com Ser-Gly como destacado na Tabela 1.

Tabela 1 – Características da população do estudo total e pelos PG-Rβ1

Variável clínica*		Total	Polimorfismo Genético Receptor β1 Ser49Gly			
			Ser-Ser (n=122)	Ser-Gly (n=51)	Gly-Gly (n=5)	p
Homens n (%)		113 (63,5)	79 (64,8)	31 (60,8)	3 (60,0)	0,873
Seguimento (anos)		6,7 ± 4,4				
Tempo de IC (anos)		8,9 ± 6,1				
Idade (anos)		64,4 ± 12,8				
Cor da pele n (%)	Branca	98 (55,1)	76 (62,3)	22 (43,1)	0,0	0,003
	Preta	28 (15,7)	20 (16,4)	6 (11,8)	2 (40,0)	
	Parda	52 (29,2)	26 (21,3)	23 (45,1)	3 (60,0)	
Etiologia n (%)	DAC	56 (31,5)	43 (35,2)	12 (23,5)	1 (20,0)	0,093
	Idiopática	42 (23,6)	27 (22,1)	13 (25,5)	2 (40,0)	
	HAS	28 (15,7)	13 (10,7)	13 (25,5)	2 (40,0)	
	Álcool	19 (10,7)	12 (9,8)	7 (13,7)	0 (0,0)	
	Outras	33 (18,5)	27 (22,1)	6 (11,8)	0 (0,0)	
NYHA Inicial† n (%)	I	47 (26,6)	36 (29,8)	9 (17,6)	2 (40,0)	0,334
	II	70 (39,5)	50 (41,3)	19 (37,3)	1 (20,0)	
	III	47 (26,6)	28 (23,1)	17 (33,3)	2 (40,0)	
	IV	13 (7,3)	7 (5,8)	6 (11,8)	0 (0,0)	
	Média	2,15 ± 0,9	2,05 ± 0,9	2,39 ± 0,9	2,00 ± 1,0	0,068
FEVE inicial (%)		34,8 ± 10,7	35,3 ± 11,2	33,5 ± 8,1	37,4 ± 2,1	0,54
HAS n (%)		134 (75,7)	88 (72,7)	42 (82,4)	4 (80,0)	0,395
DM n (%)		60 (33,7)	39 (32,0)	19 (37,3)	2 (40,0)	0,763
FA n (%)		41 (24,0)	29 (24,8)	12 (24,5)	0 (0,0)	0,492
Lab	Hemoglobina (mg/dL)	13,2 ± 1,9	13,2 ± 2,0	13,1 ± 1,7	13,8 ± 2,2	0,734
	Sódio (mEq/L)	139,8 ± 3,4	139,9 ± 3,4	139,8 ± 3,3	139,0 ± 4,6	0,843
	Potássio (mEq/L)	4,47 ± 0,7	4,46 ± 0,7	4,52 ± 0,6	4,38 ± 0,5	0,836
	Creatinina (mg/dL)	1,41 ± 1,0	1,50 ± 1,1	1,23 ± 0,5	1,06 ± 0,2	0,199
Tratamento	BB n (%)	173 (97,2)	118 (96,7)	50 (98,0)	5 (100,0)	0,828
	IECA n (%)	79 (44,4)	52 (42,6)	23 (45,1)	4 (80,0)	0,255
	BRA n (%)	54 (30,3)	37 (30,3)	16 (31,4)	1 (20,0)	0,87
	Espiro n (%)	83 (46,6)	52 (42,6)	27 (52,9)	4 (80,0)	0,147
	Digoxina n (%)	47 (26,4)	30 (24,6)	15 (29,4)	2 (40,0)	0,631
	Baixa adesão n (%)	81 (46,0)	52 (43,0)	27 (54,0)	2 (40,0)	0,405
	Furosemida (dose-mg)	90,8 ± 64,3	97,3 ± 66,8	81,0 ± 59,8	55,0 ± 30,0	0,22

\*As variáveis numéricas estão expressas em média ± desvio-padrão; as variáveis categóricas em [n e (%)]. PG-Rβ1 – polimorfismo genético receptor β1 Ser49Gly; Seguimento – tempo de seguimento; Tempo IC – tempo de evolução da doença desde a data do diagnóstico; DAC – doença arterial coronariana; HAS – hipertensão arterial sistêmica; NYHA – classe funcional da *New York Heart Association*; FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo; DM – diabetes mellitus; FA – fibrilação atrial; BRE – bloqueio de ramo esquerdo; Hb – hemoglobina; BB – betabloqueador; IECA – inibidor da enzima de conversão de angiotensina; BRA – bloqueador do receptor da angiotensina; Espiro – espironolactona; Lab – laboratório.  
†Não havia disponibilidade de dados relativos à classe NYHA inicial para 1 paciente do Grupo Ser-Ser.

A população estava em equilíbrio genético segundo o teorema de Hardy-Weinberg.<sup>20</sup>

Não houve diferenças significativas entre os genótipos para as características clínicas, da classe funcional NYHA inicial, eletrocardiográficas, ecocardiográficas, laboratoriais ou do tratamento medicamentoso, conforme representado na Tabela 1.

### Evolução clínica

Os dados sobre os desfechos clínicos estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Desfechos clínicos característicos da população do estudo total e pelos PG-Rβ1

Variável Clínica*		Total	Polimorfismo Genético Receptor β1 Ser49Gly			P
			Ser-Ser (n=122)	Ser-Gly (n=51)	Gly-Gly (n=5)	
NYHA Final	I	68	42	24	2	0,014
		38,2%	34,4%	47,1%	40,0%	
	II	57	45	9	3	
		32,0%	36,9%	17,6%	60,0%	
	III	35	19	16	0	
		19,7%	15,6%	31,4%	0,0%	
IV	18	16	2	0		
	10,1%	13,1%	3,9%	0,0%		
	Média	2,02 ± 1,0	2,07 ± 1,0	1,92 ± 1,0	1,6 ± 0,5	0,420
FEVE Final (%)		35,4 ± 13,3	35,1 ± 13,2	35,8 ± 13,4	39,6 ± 16,2	0,751
Internação	n	74	54	18	2	0,55
	%	41,6%	44,3%	35,3%	40,0%	
Óbito	n	67	54	12	1	0,026
	%	37,6%	44,3%	23,5%	20,0%	
Internação + Óbito	n	100	74	24	2	0,197
	%	56,2%	60,7%	47,1%	40,0%	

\*As variáveis numéricas estão expressas em média ± desvio-padrão; as variáveis categóricas em [n (%)]. PG-Rβ1 – polimorfismo genético receptor β1 Ser49Gly; NYHA: classe funcional da *New York Heart Association*; FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

O genótipo do Rβ1 apresentou uma relação significativa com a classe funcional da NYHA final (p=0,014), com o Ser-Ser associado à classe funcional mais avançada. Dos 18 pacientes em NYHA IV, o Ser-Ser foi observado em 88,9% dos casos. O PG Ser-Gly foi responsável pelos outros 2 casos. Todos os 5 pacientes com genótipo Gly-Gly evoluíram com NYHA I ou II ao final do seguimento.



A média da classe funcional NYHA final foi menor que a inicial ( $2,15 \pm 0,9$  à  $2,02 \pm 1,0$ ). Em relação ao caráter evolutivo, 24,9% evoluíram com melhora de classe funcional, 38,4% permaneceram estáveis e 36,7% com piora da NYHA. Não houve diferença significativa entre os PG-R $\beta$ 1 e os valores médios da NYHA ou da mudança de classe funcional durante o seguimento clínico.

### **Desfechos: óbitos e internações por IC**

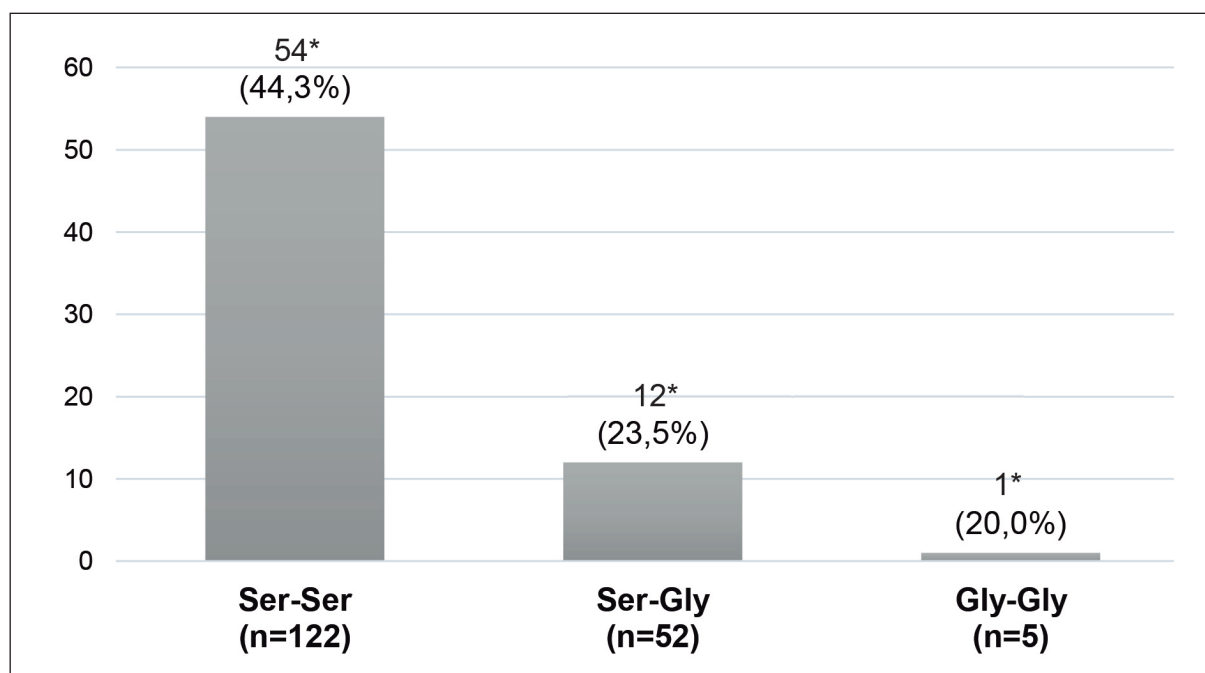
Foram pesquisados os desfechos clínicos internação por IC e óbito combinados e isoladamente.

O desfecho combinado internação por IC+Óbito ocorreu em 100 pacientes (56,2%). Ele foi mais frequente no grupo Ser-Ser (60,7%) sem diferença significativa quando comparados ao Ser-Gly (47,1%) ou Gly-Gly (40,0%).

Em relação ao número de hospitalizações isoladamente, observou-se um total de 182 eventos em 74 pacientes, sem diferença significativa entre os PG-R $\beta$ 1.

Por último, foram analisados apenas os óbitos: 67 eventos – uma taxa de mortalidade global de 37,6%. O genótipo Ser-Ser correspondeu a 80,5% desse total e apenas 1,5% dos pacientes que morreram foram genotipados como Gly-Gly. Na análise comparativa da distribuição dos óbitos pelos PG, houve uma diferença significativa ( $p=0,026$ ) entre os genótipos Ser-Ser, Ser-Gly e Gly-Gly, com taxas de mortalidade de 44,3%, 23,5% e 20,0%, respectivamente. A Tabela 2 e a Figura 1 reproduzem esses achados.

Figura 1 – Número de óbitos segundo os polimorfismos genéticos do Receptor  $\beta$ 1 Ser49Gly



Os dados foram expressos em frequências absolutas e relativas. Na comparação entre os genótipos Ser-Ser x Ser-Gly x Gly-Gly:  $*p=0,026$ , teste qui-quadrado.

O impacto do PG-R $\beta$ 1 na mortalidade desses pacientes foi demonstrado através de análise multivariada: o alelo Gly teve um efeito protetor independente de outros fatores, após o ajuste para NYHA final, FEVE final, creatinina, baixa adesão e frequência cardíaca final. A presença de cada cópia do alelo Gly foi associada à redução na chance de óbito de 63% (p=0,03; Odds Ratio 0,37 - IC 0,15-0,91). Esses dados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise multivariada: fatores preditores de óbito

Variável	P	Odds Ratio
<b>Cópia do Alelo Gly</b>	<b>0,030</b>	0,37 (0,15-0,91)
<b>NYHA final</b>	<b>0,002</b>	2,14 (1,32-3,45)
<b>FEVE final</b>	<b>0,002</b>	0,94 (0,91-0,98)
Creatinina	0,051	1,52 (1,00-2,31)
Baixa adesão	0,346	1,50 (0,65-3,46))
FC Final	0,124	1,03 (0,99-1,07)

NYHA – classe funcional da *New York Heart Association*; FEVE – fração de ejeção de ventrículo esquerdo; FC – frequência cardíaca.

Foi possível apurar a causa mortis em 56% (n=34) dos casos: 61,8% foram relacionadas à piora da IC, 29,4% à morte súbita e 8,8% a outras causas. Não houve diferença entre os genótipos para a causa da morte.

## DISCUSSÃO

Este trabalho descreve a relação entre os genótipos do polimorfismo genético do receptor beta1-Ser49Gly e a evolução clínica em 178 pacientes com IC, com seguimento médio de 6,7 anos. Trata-se de trabalho com genotipagem do Ser49Gly no contexto da IC, com maior tempo de seguimento já publicado. Seu principal achado foi a associação do PG-R $\beta$ 1 Gly-Gly com um efeito protetor para desfechos clínicos, com melhor evolução clínica avaliada pela classe funcional NYHA e menor risco de óbitos.

Quando se compara com outras populações brasileiras, encontra-se uma distribuição alélica relativamente semelhante: o alelo Gly esteve presente em 13% a 17% dos casos de IC.<sup>10,16</sup> Em relação aos genótipos, houve grande semelhança com o trabalho de 201 pacientes do Rio Grande do Sul,<sup>10</sup> mas uma diferença com a coorte com 146 pacientes de Niterói, no estado do Rio de Janeiro.<sup>16</sup>

É possível que com a intensa miscigenação da população brasileira, a cor da pele não seja um bom fator determinante do perfil genético, pois apesar da similaridade no

percentual de brancos entre o presente estudo e o de Pereira et al.,<sup>16</sup> há diferença do seu perfil genético. Assim, a etnia avaliada pela cor da pele isoladamente não explicaria o alto percentual do genótipo Gly-Gly observado por Pereira et al.<sup>16</sup> Reforçando este ponto, estudos internacionais mostraram uma acentuada semelhança com a presente coorte quanto à distribuição genotípica do PG-Rβ1:<sup>7,9,17</sup> 63% a 73% de indivíduos Ser-Ser, 27% a 35% de Ser-Gly e 0% a 3% Gly-Gly, embora tenham sido realizados com outras etnias. O desenvolvimento de mais estudos nacionais pode ser interessante para avaliar a distribuição genotípica desse polimorfismo genético na população.

Um outro aspecto ainda mais relevante é a interpretação clínica desse PG. Nesse caso, foi possível demonstrar que o Gly-Gly teve associação significativa com um marcador clínico substituto: NYHA final ( $p=0,014$ ). Indivíduos portadores desse genótipo tiveram melhor evolução clínica: nenhum paciente deste grupo apresentou uma classe funcional avançada no final do seguimento. Apesar de ser relativamente pequeno (cinco indivíduos), o maior tempo de seguimento em relação aos demais trabalhos permitiu a distinção de comportamentos clínicos entre os genótipos.

Como não havia diferença das características basais entre os três PG, inclusive de tratamento, a diferença da NYHA final observada neste estudo sugere a contribuição da influência genética na fisiopatologia da cardiopatia. Assim, a genotipagem poderia indicar um subgrupo de pacientes com IC com pior evolução clínica.

Esse achado é inédito na literatura, uma vez que não há publicações em pacientes com IC relacionando o PG-Rβ1-Ser49Gly a variáveis clínicas evolutivas como a classe funcional pela NYHA. Por isso, não é possível confrontar esse resultado com outras populações, o que seria interessante para validação deste achado.

Apesar do seu reconhecido valor prognóstico, a classe funcional da NYHA é um marcador inexato da gravidade da IC. A falta de reprodutibilidade interexaminador já foi descrita e pode limitar a sua acurácia.<sup>21</sup> Ela também traduz apenas um aspecto clínico da síndrome. É possível que, no futuro, seja mais interessante estudar a relação do genótipo com escores clínicos mais completos como o MAGGIC,<sup>22</sup> no qual há a combinação das variáveis clínicas, laboratoriais e ecocardiográficas.

No presente estudo, a elevada taxa de mortalidade observada, 37,6%, deve-se provavelmente ao tempo de acompanhamento prolongado. Para efeito de comparação, Biolo et al.<sup>10</sup> registraram 27,9% de óbitos no Rio Grande do Sul e Pereira et al.<sup>16</sup> 12,3% de mortalidade no Rio de Janeiro. Apesar da disparidade dessas taxas, notam-se semelhanças nas características basais dessas populações: uma FEVE em torno de 30-35%, uma maioria (65% a 75%) dos pacientes em NYHA I ou II e uma excelente terapêutica adotada. A diferença mais significativa entre os três trabalhos reside no seu tempo de acompanhamento: 80,4 meses no presente estudo, 39,8 meses<sup>10</sup> e 23 meses<sup>16</sup> nos estudos citados, respectivamente.

A avaliação da associação do PG-Rβ1 com óbitos mostrou que o tipo selvagem Ser-Ser concentrou a maioria desses eventos e o alelo Gly foi consistentemente

associado a um efeito protetor. A presença de cada cópia do alelo Gly foi relacionada a uma redução de 63% na chance de morte. Esse efeito protetor se manteve mesmo após ajuste rigoroso para as principais variáveis utilizadas para estratificar o prognóstico em IC. Assim, num modelo híbrido que incorporou variáveis genéticas, clínicas, laboratoriais, ecocardiográficas, de tratamento e de exame físico, o Gly-Gly permaneceu com alto valor preditivo para a menor ocorrência de óbitos.

Na revisão da literatura, os resultados são diversos, mas, na sua maioria, compatíveis com o atual. São trabalhos onde não se observou a associação PG-R $\beta$ 1-Ser49Gly e desfechos clínicos,<sup>10,16,23</sup> estudos com o mesmo padrão protetor do alelo Gly<sup>7,17,24</sup> e até mesmo uma publicação associando paradoxalmente o Gly a mau prognóstico na IC.<sup>13</sup>

Em sintonia com os presentes achados, os trabalhos iniciais de Borjesson et al.<sup>7</sup> (a primeira descrição desse PG-R $\beta$ 1-Ser49Gly), Forleo et al.<sup>24</sup> e Magnusson et al.<sup>17</sup> destacam o perfil protetor do alelo Gly: significativamente menos óbitos nos portadores dos genótipos Ser-Gly ou Gly-Gly, inclusive após ajuste para outras variáveis.

No entanto, há um trabalho indicando o oposto: o alelo Gly associado a mau prognóstico. A publicação de Wang et al.<sup>13</sup> descreve o PG-R $\beta$ 1-Ser49Gly em uma população chinesa de 430 pacientes com IC e características basais similares às do presente trabalho. Os autores relacionaram o alelo Gly a piores desfechos ecocardiográficos e maior mortalidade.

O contraste entre esses resultados pode estar relacionado a um diferente impacto genético entre as etnias. Duas evidências embasam essa teoria. Primeiro, Pereira et al.<sup>16</sup> identificaram, em uma população miscigenada do município de Niterói no Rio de Janeiro, o Ser-Ser como um fator de mau prognóstico. Mas esse padrão foi observado apenas para pacientes com cor da pele preta. Esse resultado também foi reproduzido na meta-análise de Liu et al.<sup>9</sup> A análise de 2979 pacientes genotipados para os PG-R $\beta$ 1 tipo Ar389Gly e Ser49Gly identificou um padrão específico do alelo Gly389 para cada etnia: associação a maior risco de IC em pacientes asiáticos enquanto em brancos, associou-se à redução desse risco.

Nesta mesma direção, o estudo A-HEFT descreveu uma melhor resposta à combinação nitrato e hidralazina para pacientes afro-americanos.<sup>25</sup> Posteriormente, McNamara et al. relacionaram esse benefício a um determinado PG da óxido nítrico-sintase, mais frequente em afro-americanos quando comparados a brancos.<sup>26</sup>

Em comum, a meta-análise de Liu et al.<sup>9</sup> e a publicação de McNamara et al.<sup>26</sup> destacam a variedade de efeitos clínicos entre etnias diferentes no contexto da IC. Isso reforça a necessidade de estudos específicos para o Brasil uma vez que o comportamento desses PG para uma população reconhecidamente miscigenada é imprevisível.

Esses exemplos reafirmam a influência genética na história natural da IC. De uma maneira abrangente, reconhece-se a resposta fisiopatológica da síndrome

como resultado da ativação de sistemas hormonais. Mas, a nível molecular, receptores beta-adrenérgicos e enzimas como a óxido nítrico-sintase são alguns dos fatores importantes envolvidos no remodelamento cardíaco. A alteração funcional desses e de outros agentes em decorrência de polimorfismos genéticos pode explicar essa multiplicidade de evoluções clínicas em pacientes fenotipicamente semelhantes.

O processo de resposta neuro-humoral envolve uma infinidade de elementos, cada um potencialmente sensível a mutações genéticas diversas. Assim, é provável que um painel genético englobando os principais eixos (sistemas nervoso simpático, renina-angiotensina-aldosterona e peptídeo natriurético atrial) seja mais interessante que um polimorfismo específico isolado. O primeiro passo é identificar quais são os principais marcadores genéticos para cada eixo. Em relação ao sistema nervoso simpático e o receptor beta-adrenérgico, esse trabalho reforça o papel destacado do PG Ser49Gly.

No futuro, a construção de um escore genético multissistêmico poderá se demonstrar um poderoso preditor prognóstico. Possivelmente um escore capaz de identificar indivíduos de alto risco, mesmo no início da evolução da doença, quando muitas vezes os achados clínicos e de exames complementares ainda não estão relevantemente alterados.

O número relativamente pequeno de pacientes ( $n=178$ ) é uma limitação do estudo e pode ter influenciado os resultados, principalmente pelo baixo número de pacientes com genótipo Gly-Gly. No entanto, o padrão de distribuição genotípica observado foi o mesmo da maioria dos estudos e é o estudo com o maior tempo de acompanhamento com PG-R $\beta$ 1 no contexto da IC. Destaca-se também que, mesmo com esse número reduzido, foi possível encontrar resultados com significância estatística.

Outra limitação refere-se à coleta de dados em registros de prontuários. No entanto, como todos os indivíduos são acompanhados em Clínica de IC, a padronização das rotinas de atendimento e registro das informações, bem como o atendimento realizado por médicos dedicados ao tratamento e acompanhamento dessa síndrome garantiram maior qualidade nas informações obtidas. Entretanto, se ocorria internação em outra instituição, não havia acesso às informações e mesmo o número de hospitalizações pode estar subestimado. Isso pode ter determinado a ausência de diferenças estatísticas entre os genótipos e limitado a avaliação desse desfecho clínico.

## **CONCLUSÕES**

Em indivíduos com IC com fração de ejeção reduzida, a presença do PG-R $\beta$ 1 Gly-Gly associou-se a melhor evolução clínica avaliada pela classe funcional da NYHA e foi preditor de menor risco de mortalidade, independente de outros fatores, em seguimento de 6,7 anos.

**REFERÊNCIAS**

1. Brasil. Ministério da Saúde. [Internet]. DATASUS. Informações de saúde, epidemiológicas e mortalidade. [acesso 2019 mar. 13]. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br>
2. Luo N, Fonarow GC, Lippmann SJ, Mi X, Heidenreich PA, Yancy CW, et al. Early adoption of sacubitril/valsartan for patients with heart failure with reduced ejection fraction: insights from get with the Guidelines-Heart Failure (GWTG-HF). *JACC Heart Fail.* 2017;5(4):305-9.
3. Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia S, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2002;347(15):1135-42.
4. Abuzaanona A, Lanfear D. Pharmacogenomics of the natriuretic peptide system in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2017;14(6):536-42.
5. Albuquerque FN, Brandão AA, Silva DA, Mourilhe-Rocha R, Duque GS, Gondar AF, et al. Angiotensin-converting enzyme genetic polymorphism: its impact on cardiac remodeling. *Arq Bras Cardiol.* 2014;102(1):70-9.
6. Luzum JA, English JD, Ahmad US, Sun JW, Canan BD, Sadee W, et al. Association of genetic polymorphisms in the beta-1 adrenergic receptor with recovery of left ventricular ejection fraction in patients with heart failure. *J Cardiovasc Transl Res.* 2019 Feb. 12. [Epub ahead of print].
7. Börjesson M, Magnusson Y, Hjalmarsen A, Andersson B. A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J.* 2000;21(22):1853-8.
8. Levin MC, Marullo S, Muntaner O, Andersson B, Magnusson Y. The myocardium-protective Gly-49 variant of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem.* 2002;277(34):30429-35.
9. Liu WN, Fu KL, Gao HY, Shang YY, Wang ZH, Jiang GH, et al.  $\beta$ 1 adrenergic receptor polymorphisms and heart failure: a meta-analysis on susceptibility, response to  $\beta$ -blocker therapy and prognosis. *PLoS One.* 2012;7(7):e37659.
10. Biolo A, Clausell N, Santos KG, Salvaro R, Ashton-Prolla P, Borges A, et al. Impact of  $\beta$ 1-adrenergic receptor polymorphisms on susceptibility to heart failure, arrhythmogenesis, prognosis, and response to beta-blocker therapy. *Am J Cardiol.* 2008;102(6):726-32.
11. Mialet-Perez J, Rathz DA, Petrashevskaya NN, Hahn HS, Wagoner LE, Schwartz A, et al. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med.* 2003;9(10):1300-5.



12. Lanfear DE, Peterson EL, Zeld N, Wells K, Sabbah HN, Williams K. Beta blocker survival benefit in heart failure is associated with ADRB1 Ser49Gly genotype. *J Card Fail.* 2015;21(8 Suppl):S50.
13. Wang L, Lu L, Zhang F, Chen Q, Shen W. Polymorphisms of  $\beta$ -adrenoceptor and natriuretic peptide receptor genes influence the susceptibility to and the severity of idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese cohort. *J Card Fail.* 2010;16(1):36-44.
14. Fiuzat M, Neely ML, Starr AZ, Kraus WE, Felker GM, Donahue M, et al. Association between adrenergic receptor genotypes and beta-blocker dose in heart failure patients: analysis from the HF-ACTION DNA substudy. *Eur J Heart Fail.* 2013;15(3):258-66.
15. Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, Weber SA, Greene SM, Hodne D, et al. A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(30):11288-93.
16. Pereira SB, Velloso MW, Chermont S, Quintão MM, Nunes Abdhala R, Giro C, et al.  $\beta$ -adrenergic receptor polymorphisms in susceptibility, response to treatment and prognosis in heart failure: implication of ethnicity. *Mol Med Rep.* 2013;7(1):259-65.
17. Magnusson Y, Levin MC, Eggertsen R, Nyström E, Mobini R, Schaufelberger M, et al. Ser49Gly of beta1-adrenergic receptor is associated with effective beta-blocker dose in dilated cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(3):221-31.
18. Mangini S, Silveira FS, Silva CP, Grativol PS, Seguro LF, Ferreira SM, et al. Insuficiência cardíaca descompensada na unidade de emergência de hospital especializado em cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* 2008;90(6):400-6.
19. Maqbool A, Hall AS, Ball SG, Balmforth AJ. Common polymorphisms of  $\beta$ 1-adrenoceptor: identification and rapid screening assay. *Lancet.* 1999;353(9156):897.
20. Salanti G, Amountza G, Ntzani EE, Ioannidis JP. Hardy–Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(7):840-8.
21. Raphael C, Briscoe C, Davies J, Ian Whinnett Z, Manisty C, Sutton R, et al. Limitations of the New York Heart Association functional classification system and self-reported walking distances in chronic heart failure. *Heart.* 2007;93(4):476-82.
22. Pocock SJ, Ariti CA, McMurray JJ, Maggioni A, Køber L, Squire IB, et al. Predicting survival in heart failure: a risk score based on 39,372 patients from 30 studies. *Eur Heart J.* 2013;34(19):1404-13.
23. Leineweber K, Frey UH, Tenderich G, Toliat MR, Zittermann A, Nürnberg P, et al. The Arg16Gly- $\beta$ (2)-adrenoceptor single nucleotide polymorphism: exercise capacity and survival in patients with end-stage heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2010;382(4):357-65.

24. Forleo C, Resta N, Sorrentino S, Guida P, Manghisi A, De Luca V, et al. Association of beta-adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med.* 2004;117(7):451-8.
25. Taylor AL. The African American Heart Failure Trial: a clinical trial update. *Am J Cardiol.* 2005;96(7B):44-8.
26. McNamara DM, Tam SW, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Venkitachalam L, et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) polymorphisms in African Americans with heart failure: results from the A-HeFT trial. *J Card Fail.* 2009;15(3):191-8.



## 4.2 Genetic risk score with five polymorphisms is an independent predictor of survival in early stage heart failure

### ABSTRACT

**Background:** The use of genetic risk scores has been successfully tested in several clinical settings. Nevertheless, for heart failure (HF), there is still no description of a robust genetic panel for prognostic evaluation of these patients.

**Objectives:** To evaluate the relationship between a genetic risk score (GRS) and clinical outcomes in individuals with HF with reduced ejection fraction. The GRS was elaborated from five multisystemic genetic polymorphisms (GP).

**Methods:** In a cohort of 178 patients, the GP variants of beta-1 adrenergic receptor, angiotensin-converting enzyme, nitric oxide synthase, aldosterone synthase and angiotensinogen were identified. The GRS was calculated by adding the number of risk allele copies of each GP (variation: 0–10). The population was divided into two strata according to disease duration: Early-stage HF (<72 months) or end-stage HF ( $\geq$ 72 months). The main clinical outcomes were death, hospital admission due to HF and NYHA functional class. A p value <0.05 was considered significant.

**Results:** Cohort means were: clinical follow-up  $97.1 \pm 54.7$  months, disease duration  $123.8 \pm 75.8$  months, age  $65.8 \pm 12.7$  years, 63.5% men and 55.1% whites. HF etiologies were predominantly ischemic (31.5%), idiopathic (23.6%) and hypertensive (15.7%). The GRS was divided into two ranges according to the number of risk allele copies: low (0–5) and high (6–10). A total of 123 patients (69.1%) were classified as high GRS. There was a significant and positive relationship between GRS and mean NYHA functional class at the end of follow-up ( $p=0.043$ ). High GRS was predictive of lower survival in early-stage HF ( $p=0.018$ ), and independently associated with twice the risk of death during the first 72 months of the disease (HR=2.01; CI 1.21–3.33;  $p=0.007$ ). There was no significant association between GRS and clinical outcomes or survival after 72 months of disease.

**Conclusion:** The GRS was related to survival in early-stage HF. The subgroup with high GRS was associated with a two-fold increase in the risk of death during the first 72 months after HF diagnosis, irrespective of other factors.

**Keywords:** Heart failure. Genetic polymorphism. Risk score. Mortality. Survival.

## INTRODUCTION

The number of patients with heart failure (HF) continues to increase throughout the World, affecting 6.2 million people in the United States of America alone. With one million new cases per year, almost 200 deaths per day were related to HF in North America in 2013.<sup>1</sup> As such, the disease is a highly relevant public health issue that remains uncontrolled.

Half of the patients diagnosed with HF will die in up to five years after diagnosis.<sup>1</sup> In its early stage, with apparently stable oligosymptomatic patients, sudden death is the main implicated mechanism.<sup>2</sup> In half of these fatal events, there are no previous hospital admissions or other warning signs, and clinical scores are also unable to successfully identify many high risk patients.<sup>3-6</sup> Thus, predicting mortality in early-stage HF remains a challenge.

Among the mechanisms that may justify differences in the natural history of the syndrome, genetic factors has become increasingly relevant.<sup>7</sup> Since it became possible to identify common mutations in DNA segments called single nucleotide polymorphisms (SNP), the number of studies to test the influence of these findings has been expanding.

As the pathophysiology of HF includes metabolic processes of three different neurohumoral systems — sympathetic nervous system (SNS), renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and peptide-natriuretic-atrial system (PNS), many potentially relevant genes are involved. Modifications of these genes could influence pathophysiological responses and determine variable clinical courses. Therefore, using GP to identify these alterations could theoretically provide important prognostic information regarding the disease.

Few studies have analyzed which of the available SNP would be relevant in HF, but they included a limited number of patients, populations of different ethnicities and the results are not always homogeneous. However, when the data is analyzed together, it is possible to highlight some significant polymorphisms:  $\beta$ 1-adrenergic receptor (ADRB1),<sup>8,9</sup> angiotensin-converting enzyme (ACE),<sup>10,11</sup> nitric oxide synthase (NOS),<sup>12,13</sup> aldosterone synthase<sup>14,15</sup> and angiotensinogen (AGT).<sup>16,17,18</sup>

Because of the polygenic nature of HF, the association of genetic markers of these three systems (SNS, RAAS and PNS) may be more appropriate to predict the product of individual pathophysiological responses and, consequently, clinical severity. This strategy has been successfully tested in other scenarios, such as coronary artery disease (CAD).<sup>19</sup>

Publications that have combined different polymorphisms in patients with HF are scarce. In these studies, some limitations were observed: results restricted

within subgroups,<sup>20</sup> low number of patients<sup>21</sup> and the absence of multiple genotyped humoral systems.<sup>22</sup> An exception is the study by Zakrzewski-Jakubiak et al., where 10 different genetic polymorphisms were analyzed simultaneously.<sup>21</sup> However, only the combination of two SNP significantly predicted progression to HF. Thus, there are still many doubts concerning the value of a multisystemic genetic panel on the prognostic evaluation of HF.

The objective of this study is to evaluate the prognostic value of a genetic risk score (GRS) based on a combination of five polymorphisms representing different stages of the pathophysiological process. The relationship between a panel with the genetic polymorphisms of the beta-1 adrenergic receptor, angiotensin-converting enzyme, nitric oxide synthase, aldosterone synthase and angiotensinogen, and relevant clinical outcomes in individuals with HF with reduced ejection fraction (HFrEF) was analyzed.

## **METHODS**

### **Study design and population**

The study consisted of a prospective cohort of patients derived from a HF clinic in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Patients 18 years or older, with symptomatic HF (defined by the Framingham criteria) and left ventricular ejection fraction (LVEF)  $\leq 50\%$  on two-dimensional echocardiography were included. Exclusion criteria comprised those who failed to provide consent, had reduced life expectancy due to other comorbidities or were on the waiting list for a heart transplant at the time of screening. Individuals with unknown clinical status at the end of the study were also excluded from the analysis of survival and clinical outcomes.

Clinical information was collected from medical records dated between January 2015 and April 2019, since the beginning of follow-up. All included patients were submitted to blood sampling for genotyping. The project has been approved by the Research Ethics Committee of Hospital Universitário Pedro Ernesto on 16/12/2009, under no. CAAE-0176.0.228.000-09. An Informed Consent Form (ICF) was signed by all patients.

### **Investigation procedures**

#### Genotyping

DNA was extracted from the blood samples using Salting-Out protocols modified by Miller et al.<sup>23</sup> Genotyping was performed using polymerase chain reaction and restriction of fragment length. The polymorphisms studied were for the genes of

beta1-adrenergic receptor,<sup>24</sup> angiotensin-converting enzyme,<sup>25</sup> nitric oxide synthase,<sup>26</sup> aldosterone synthase<sup>27</sup> and angiotensinogen.<sup>28</sup> For each of these SNP, their two corresponding alleles were identified. With this information, the patient was classified in one of three possible genotypes for each polymorphism.

The details of these procedures followed the specific literature described in Table 1.

Gene and haplotype frequencies were tested for the Hardy Weinberg equilibrium,<sup>29</sup> using a tool available on the Internet at <<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>>.<sup>30</sup> According to this analysis, all loci are in equilibrium, except for the M235T locus, with marginal p-value ( $0.01 < p < 0.05$ ).

Table 1 – Information on gene, polymorphisms and genotyping

Structure	Single nucleotide polymorphism	Genotyping based on	Tested alleles		Possible genotypes		
			Wild	Rec	Dom	Het	Rec
Beta1-adrenergic receptor	Ser49Gly (rs1801252)	Sandilands et al., 2003 <sup>28</sup>	<b>Ser*</b>	Gly	Ser-Ser	Ser-Gly	Gly-Gly
Angiotensin-converting enzyme	Ins-Del (rs4646994)	Odawara et al., 1997 <sup>29</sup>	<b>Del*</b>	Ins	Del-Del	Del-Ins	Ins-Ins
Nitric Oxide Synthase	Glu298Asp (rs1799983)	Dasar et al., 2012 <sup>30</sup>	<b>Glu*</b>	Asp	Glu-Glu	Glu-Asp	Asp-Asp
Aldosterone synthase	-344C>T (rs1799998)	Gu et al., 2004 <sup>31</sup>	<b>C*</b>	T	C-C	C-T	T-T
Angiotensinogen	ATM235T (rs699)	Russ et al., 1993 <sup>32</sup>	Met	<b>Thr*</b>	Met-Met	Met-Thr	Thr-Thr

\*Risk Alleles, Rec – recessive; Dom – dominant; Het – heterozygous; Ins – insertion; Del – deletion

#### Genetic panel & Genetic risk score

From this genotyping, a genetic panel was prepared for each individual with information about the genotypes (five in total: one for each polymorphism) and alleles (10 in total: two for each polymorphism).

In the literature review, alleles related to a worse prognosis in HF were identified for each of these five SNP studied. Thus, these five alleles — called “risk alleles” — served as the basis for the construction of the genetic risk score (GRS) variable.

The GRS represented the total number of risk allele copies identified for the ADRB1, ACE, NOS, aldosterone synthase and AGT polymorphisms. Based on similar models for CAD,<sup>19</sup> the score for each individual was calculated by simple addition (i.e., unweighted) of the risk allele for each of the five SNP studied (2 points if homozygous for risk allele, 1 point if heterozygous for risk allele, no point in the absence of risk alleles in that SNP).

The GRS could range from 0 (no risk allele) to 10 (all possible risk alleles). This variable was classified into two ranges: Low GRS (0 to 5 risk allele copies) and high GRS (6 to 10 risk allele copies).

### **Heart failure etiology**

The etiologies were classified into five groups: ischemic, idiopathic, hypertensive, alcoholic and others by the attending physician at the HF clinic according to previously established criteria.<sup>31</sup>

### Clinical outcomes

Skin color was determined by the attending physician and classified as white, black or other. Functional class was determined according to the New York Heart Association (NYHA) at the beginning and at the end of follow-up.

Since the average duration of disease was greater than 10 years, the cohort was stratified into two subgroups according to the expected survival for these disease duration intervals, representing different moments in the course of HF.

The population was then divided into two strata: Early-stage HF (interval since diagnosis <72 months) or end-stage HF (interval since diagnosis ≥72 months). These two strata had survival analysis performed separately.

The most recent laboratory tests were considered for statistical analysis.

All individuals had their electrocardiograms analyzed for QRS duration, presence of left bundle branch block and atrial fibrillation.

The echocardiographic evaluation was performed at the beginning and at the end of follow-up, and left ventricular (LV) systolic diameter, LV diastolic diameter and LVEF were recorded.

The clinical outcomes of hospital admission due to HF and death were investigated both separately and in combination. Hospital admissions for HF are routinely recorded by the attending physician in the patient's chart and this information was used for analysis.

Death registries were taken from the medical records and, in their absence, active search was conducted in electronic medical records, by phone call or on death certificate databases available on the Internet.

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using the SPSS program for Mac version 25. In all tests, 0.05 or 5% ( $p < 0.05$ ) was defined as the rejection level of the null hypothesis and 95% confidence interval (CI). The measures of central tendency were expressed as mean ± standard deviation. Categorical variables were expressed in absolute and relative frequencies  $n$  (%).

For survival analysis, the Kaplan-Meier curve was used with the log-rank test (Mantel-Cox).

The following statistical tests were used: One-way ANOVA complemented by Tukey's test, chi-squared test and logistic regression. To evaluate the homogeneity of variances, Levene's test was used. When there was no homogeneity of variances, the Kruskal-Wallis test was used to compare the means of three or more independent samples and Mann-Whitney test for up to two independent samples.

Binary logistic regression was used to evaluate the clinical outcomes studied, while multivariate Cox regression was used for survival analysis. Initially, the variables were evaluated separately in order to identify which ones were statistically significant (univariate analysis), after which they were evaluated together as covariables (multivariate analysis). A 95% significance level was considered for entry in the model and 90% for the removal of variables in the stepwise method of choice.

This study was partially funded by FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).

## RESULTS

### Characteristics of the study population

A total of 178 patients were included and table 2 shows the baseline characteristics of the study population. Mean age was  $65.8 \pm 12.7$  years (27.5–95.1 years), and there was a higher prevalence of males, white skin color and ischemic HF.

Beta-blockers were used by 97.2% of patients, whereas ACE inhibitor or angiotensin receptor blocker and spironolactone were prescribed in 74.7% and 46.6% of cases, respectively.

Baseline NYHA functional class was II or III in 66.0% of patients with a mean initial LVEF of  $34.8 \pm 10.7\%$ .

Mean follow-up time and disease duration (since the diagnosis) was  $97.1 \pm 54.7$  months (8.1 years) and  $123.8 \pm 75.9$  months (10.3 years), respectively.

Ninety-six patients ( $n=96$ ; 54.5%) had no history of alcoholism and the remaining were either former alcoholics (31.8%) or current alcoholics (13.6%). There was no significant difference between alcoholism and the GRS ranges.

There were no significant differences between the GRS ranges for clinical characteristics, NYHA functional class, electrocardiographic variables, echocardiographic variables or medical treatment, as shown in Table 3. Regarding the laboratory variables, hemoglobin levels were statistically higher for the high GRS group, although not clinically relevant.



Table 2 – Baseline characteristics of the population according to the genetic risk score

Clinical variable*	Total	Genetic risk score			
		Low 0–5 (n=55)	High 6–10 (n=123)	p	
Men n (%)	113 (63.5)	37 (67.3)	76 (61.8)	0.483	
Follow-up (months)	97.1±54.7	91.6±55.4	99.5±54.4	0.371	
HF duration (months)	123.8±75.8 [7–675]	125.1±101.4	123.2±61.6	0.875	
Age (years)	65.8±12.7 [27.5–95.1]	64.2±11.3	66.5±13.2	0.272	
Skin color n (%)	White	98 (55.1)	29 (52.7)	69 (56.1)	0.520
	Other	28 (15.7)	7 (12.7)	21 (17.1)	
	Black	52 (29.2)	19 (34.5)	33 (26.8)	
Etiology n (%)	Alcohol	19 (10.7)	5 (9.1)	14 (11.4)	0.592
	Idio	42 (23.6)	13 (23.6)	29 (23.6)	
	CAD	56 (31.51)	19 (34.5)	37 (30.1)	
	Hypert	28 (15.7)	11 (20.0)	17 (13.8)	
	Other	33 (18.5)	7 (12.7)	26 (21.1)	
Initial NYHA† n (%)	I	47 (26.6)	15 (27.3)	32 (26.2)	0.470
	II	70 (39.5)	18 (32.7)	52 (42.6)	
	III	47 (26.6)	16 (29.1)	31 (25.4)	
	IV	13 (7.3)	6 (10.9)	7 (5.7)	
	Mean	2.15±0.9 [1–4]	2.24±1.0	2.11±0.9	0.375
Initial LVEF n (%)	34.8±10.7 [15–75]	33.2±12.5	35.6±9.8	0.178	
Hypertension n (%)	134 (75.7)	40 (72.7)	94 (77.0)	0.535	
DM n (%)	60 (33.7)	21 (38.2)	39 (31.7)	0.398	
AF n (%)	41 (24.0)	11 (20.8)	30 (25.4)	0.681	
Lab	Hb (mg/dL)	<b>13.2±1.9 [6.6–18.1]</b>	<b>13.8±1.9</b>	<b>13.0±1.9</b>	<b>0.011</b>
	Na (mEq/L)	139.8±3.4 [132–146]	139.8±3.4	139.4±3.5	0.264
	K (mEq/L)	4.47±0.7 [2.9–6.7]	4.5±0.6	4.5±0.6	0.856
	Cr (mg/dL)	1.41±1.0 [0.7–3.1]	1.41±1.1	1.41±1.0	0.988
Treatment	BB n (%)	173 (97.2)	54 (98.2)	119 (96.7)	0.593
	ACEI n (%)	79 (44.4)	29 (52.7)	50 (40.7)	0.134
	ARB n (%)	54 (30.3)	14 (25.5)	40 (32.5)	0.343
	Spiro n (%)	83 (46.6)	30 (54.5)	53 (43.1)	0.157
	Furosemide (dose-mg)	90.8±64.3 [20–240]	76.5±56.6	98.7±67.2	0.061
	Digoxin n (%)	47 (26.4)	14 (25.5)	33 (26.8)	0.848
	Low adherence n (%)	81 (46.0)	25 (46.3)	56 (45.9)	0.961

\*Numerical variables are expressed as mean ± standard deviation [variation]; categorical variables expressed as [n (%)]

Follow-up – follow-up time; HF duration – duration of disease course from the date of diagnosis; Idio – idiopathic; CAD – coronary artery disease; Hypert – systemic arterial hypertension; NYHA – New York Heart Association functional class; LVEF – left ventricular ejection fraction; DM – diabetes mellitus; AF – atrial fibrillation; LBBB – left bundle branch block; Hb – hemoglobin; BB – betablocker; ACEI – angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB – angiotensin receptor blocker; Spiro – spironolactone. †Initial NYHA class data was not available for 1 patient from the Allele Weight 0–4 group

Table 3 – Genetic profile of the study population

Beta1 adrenergic receptor			Angiotensin-converting enzyme			Nitric oxide synthase			Aldosterone synthase			Angiotensinogen		
Ser49Gly			Deletion/Insertion			Glu298Asp (G894T)			CYP11B2:344C>T			ATM235T		
Genotypes			Genotypes			Genotypes			Genotypes			Genotypes		
Ser.Ser	Ser.Gly	Gly.Gly	Del.Del	Del.Ins	Ins.Ins	Glu-Glu	Glu-Asp	Asp-Asp	CC	CT	TT	MM	MT	TT
122	51	5	80	86	12	117	57	4	17	82	79	48	119	11
68.5%	28.7%	2.8%	44.9%	48.3%	67.0%	65.7%	32.0%	2.2%	9.6%	46.1%	44.4%	27.0%	66.9%	6.2%
Allele frequency			Allele frequency			Allele frequency			Allele frequency			Allele frequency		
Ser*	Gly		Del*	Ins		Glu*	Asp		C*	T		Met	Thr*	
295	61		246	110		291	65		116	240		215	141	
82.9%	17.1%		69.1%	30.9%		81.7%	18.3%		32.6%	67.4%		60.4%	39.6%	

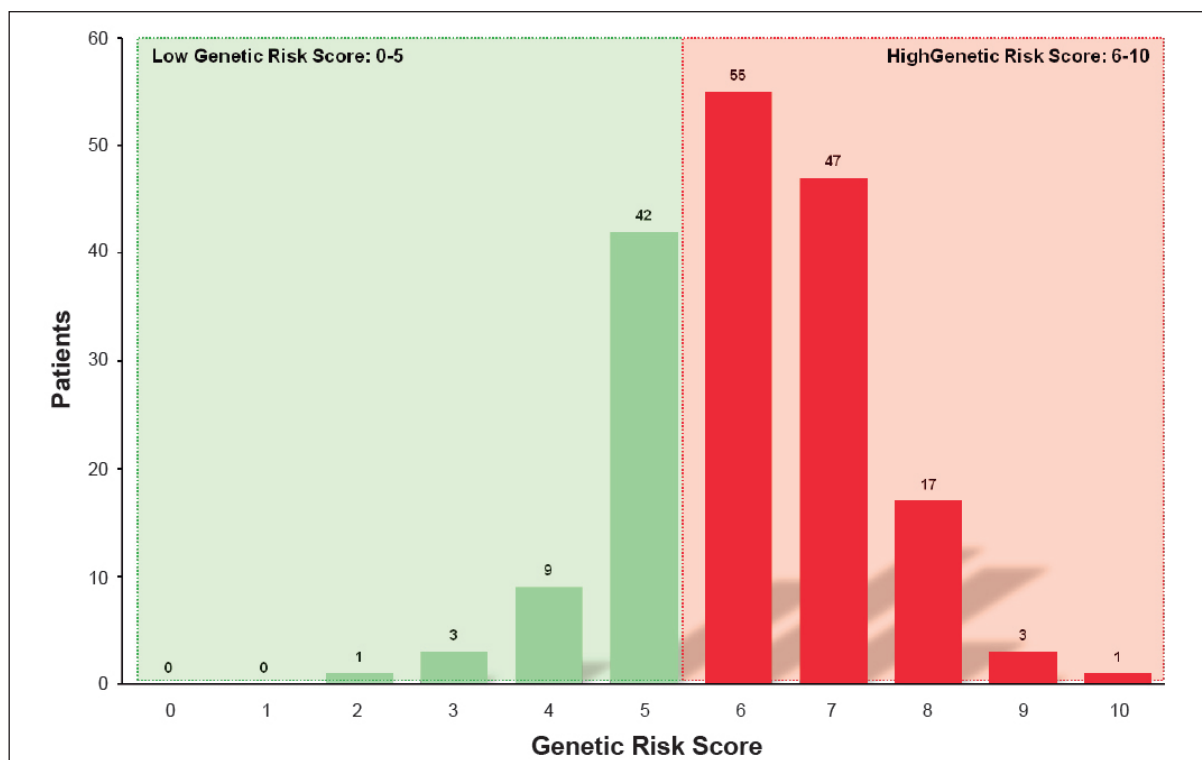
\*Risk allele; Del – deletion; Ins – insertion; GRS – genetic risk score



The genotype distribution of ADRB1, ACE, aldosterone synthase, NOS and AGT is shown in Table 3.

In relation to the number of allele copies at risk, 123 (69.1%) patients had high GRS and 55 (30.9%) had low GRS (Figure 1).

Figure 1 – Distribution of genetic risk score of the study population



#### Clinical course

The GRS demonstrated a significant relationship with the final mean NYHA functional class ( $p=0.043$ ): high GRS was associated with higher mean NYHA compared to low GRS:  $2.03 \pm 1.0$  x  $1.80 \pm 0.6$ , respectively (Table 4).

As for the change in functional class, there was no significant difference between the GRS ranges. During follow-up, 36.2% of patients had an improvement in functional class, 38.4% remained stable and 25.4% had worsening of NYHA.

#### Outcomes: total deaths and hospital admissions due to HF

A total of 86 patients were hospitalized for HF throughout the study, and the mortality rate was 57.1%, corresponding to 96 deaths during the follow-up period. There were no significant differences between clinical outcomes and GRS (Table 4). The group with high GRS had 71 deaths (60.7%) x 25 (49.0%) in the low GRS group. Among these outcomes, 30 deaths occurred within 72 months of HF diagnosis: 21 events with high GRS and 9 events with low GRS.

Table 4 – Clinical outcomes according to the genetic risk score

Clinical variable*		Total	Genetic risk score		
			High	Low	p
Final NYHA n (%)	I	68 (38.2)	41 (33.3)	27 (49.1)	0.223
	II	57 (32.0)	41 (33.3)	16 (29.1)	
	III	35 (19.7)	27 (22.0)	8 (14.5)	
	IV	18 (10.1)	14 (11.4)	4 (7.3)	
	Average	<b>2.03±1.0 [1–4]</b>	<b>2.13±1.0</b>	<b>1.80±0.55</b>	<b>0.043</b>
Final LVEF (%) <sup>†</sup>		<b>35.7±13.8 [14–69]</b>	36.5±13.8	33.8±13.8	0.220
Hospital admission		86 (48.3)	60 (48.8)	26 (47.3)	0.852
Death		96 (57.1)	71 (60.7)	25 (49.0)	0.160
Hospital admission + Death		130 (73.0)	88 (71.5)	42 (76.4)	0.503

\*Numerical variables are expressed as mean ± standard deviation; categorical variables expressed as [n (%)]. NYHA – New York Heart Association functional classification; LVEF – left ventricular ejection fraction. <sup>†</sup>7 patients from the high GRS Group did not have final LVEF information available.

Finally, the combined outcome of death and hospital admission due to HF occurred 128 times: 88 (71.5%) and 40 (76.4%) with high and low GRS, respectively, with no significant difference.

### Survival analysis using GRS and disease duration

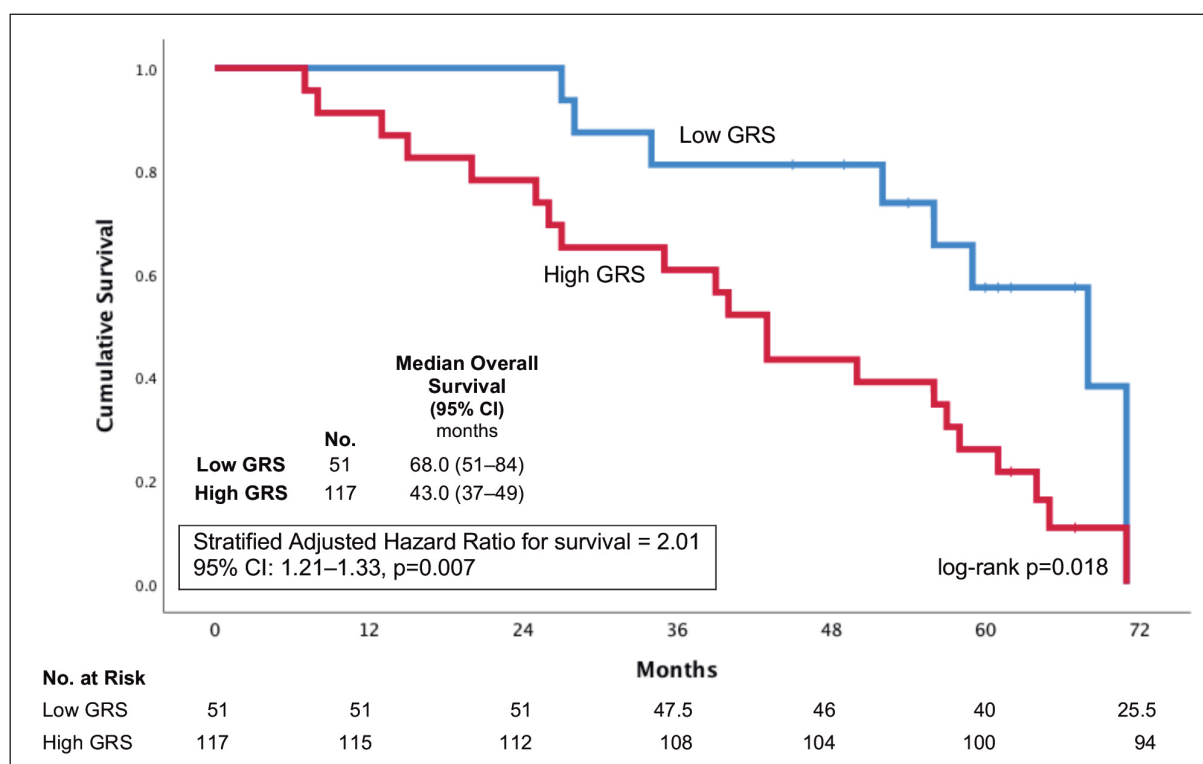
The Kaplan-Meier curve showed no significant difference in survival according to the GRS (low x high) over 8.1 years of follow-up or in the total disease duration.

When the analysis was performed according to the early-stage HF and end-stage HF strata, a significant difference of survival was observed for early-stage HF only: high GRS was associated with lower survival in this period (p=0.018).

This analysis was complemented with the Cox regression, which defined, among other variables, GRS as a predictor of survival. High GRS was associated with a 74% higher risk of death during this period (HR 1.74, CI: 1.08–2.80; p=0.022). (Table 5)

This result was confirmed by multivariate analysis: high GRS maintained a predictor effect for survival after adjustment for final NYHA, final LVEF, creatinine, use of furosemide, and age. Thus, high GRS (6–10 risk allele copies) was related to twice the risk of death during the first 72 months after HF diagnosis (HR=2.01; CI 1.21–3.33, p=0.007) regardless of skin color, and other clinical, echocardiographic, laboratory and medical treatment (Figure 2 and Table 5).

Figure 2 - Survival according to genetic risk score in patients with HF duration &lt;6 years



GRS – genetic risk score; Low GRS – 0–5 risk allele copies; High GRS – 6–10 risk allele copies; HF – heart failure; CI – confidence interval; No. – Number

Table 5 – Univariate and multivariate analysis of survival for patients with early-stage HF

Univariate analysis				Multivariate analysis			
Variable	Hazard ratio	95% CI	P	Variable	Hazard ratio	95% CI	p
High GRS	1.74	1.08–2.80	<b>0.022</b>	High GRS	<b>2.01</b>	<b>1.21–3.33</b>	<b>0.007</b>
Final NYHA	1.55	1.29–1.87	<b>&lt;0.001</b>	Final NYHA	<b>1.39</b>	<b>1.10–1.77</b>	<b>0.008</b>
Creatinine	1.23	1.04–1.45	<b>0.017</b>	Creatinine	<b>1.25</b>	<b>1.01–1.55</b>	<b>0.04</b>
Final LVEF	0.97	0.95–0.99	<b>0.004</b>	Final LVEF	0.99	0.97–1.01	0.38
Furosemide	3.92	2.02–7.59	<b>&lt;0.001</b>	Furosemide	<b>2.44</b>	<b>1.13–5.27</b>	<b>0.02</b>
Age	0.99	0.98–1.01	0.683	Age	0.99	0.97–1.01	0.45
Men	0.73	0.49-1.10	0.135	Men	0.86	0.54–1.35	0.50
Non-white	1.49	0.99–2.23	0.054	Non-white	1.22	0.77–1.93	0.40

Early-stage HF – heart failure with time since diagnosis <6 years; CI – confidence interval; GRS – genetic risk score; NYHA – New York Heart Association functional class; LVEF – left ventricular ejection fraction.

## DISCUSSION

This study describes the relationship between the combined genotypes of the genetic polymorphisms of  $\beta$ 1-adrenergic receptor, angiotensin-converting enzyme, nitric oxide synthase, aldosterone synthase and angiotensinogen, and survival in 178 patients with HFrEF and average disease duration of 10.3 years. The main finding was the construction of a genetic risk score that was independently associated with the survival of patients in the early stage of the disease. High GRS was associated with twice the risk of death in this scenario.

This is the first study to investigate the combined prognostic value of five genes responsible for the codification of different determinants of pathophysiological processes in a population with HFrEF.

The concept of a genetic panel to stratify prognosis in HF is not original. Pilbrow et al. found that the association of two AGT genotypes was a predictor of mortality.<sup>17</sup> Accordingly, Biolo et al. described the same pattern, combining the genotypes of type 1 and 2 beta-adrenergic receptors.<sup>22</sup> However, in other studies this was not observed.<sup>32</sup>

Petersen et al. provided further information, by evaluating a combination of genes in two different neurohumoral systems.<sup>9</sup> In this study, the composite of AGT and ADRB1 polymorphisms was a predictor of mortality, although this effect was restricted to patients on carvedilol. Metra et al. designed a similar study by associating genotypes of beta and alpha-adrenergic receptors, though no relationship with clinical outcomes was established.<sup>33</sup>

The simultaneous analysis of an even larger number of SNP has been described by Zakrzewski-Jakubiak et al.<sup>21</sup> Ten different genes were evaluated in a population with HF and healthy individuals. Among all individuals, only two genetic polymorphisms remained relevant when analyzed together.

Thus, the first challenge in this area of research is to identify the most relevant genes involved in the pathophysiology of HF. The complex neurohumoral response includes a number of proteins which are responsible, at a molecular level, for the action of the three main hormonal systems in HF (SNS, RAAS and PNS). Additionally, each of these elements is sensitive to multiple mutations that can modify the disease phenotype.<sup>34</sup> Hence, there are several potential candidates to be studied.

Secondly, the behavior of polymorphisms can be influenced by ethnicity. Liu et al. found an inversion of the protective effect of an ADRB1 genotype by comparing populations of different ethnicities.<sup>35</sup> This is another factor associated with the difficulty of identifying a protective genotype for each SNP. Inconsistent results in the literature are not uncommon.

Finally, the interaction between these genetic mutations is unpredictable. Some studies were able to identify the alleles associated with poor prognosis (“risk alleles”) for each polymorphism.<sup>8-17</sup> Even so, the combination of this information through a genetic risk score with multiple genes has remained uncharted in HF research. In other diseases, such as CAD<sup>19,36</sup> and colon neoplasia,<sup>37</sup> this tool has been widely tested.

Theoretically, an optimal panel of genetic markers should involve the different neurohumoral systems activated in HF. Accordingly, the key elements within this pathophysiology should be represented by their most studied polymorphisms. Therefore, the following five SNP were chosen in the construction of the genetic risk score presented here: ADRB1, ACE, NOS, aldosterone synthase and AGT.

The GRS identified a population with a two-fold increase risk of death within six years of HF diagnosis (early-stage HF). In the multivariate analysis, when tested with the main known prognostic factors in HF, the GRS remained a significant predictor of survival. Considering there were no important baseline clinical differences between the GRS ranges, this finding suggests that genetic variations could influence the course of the disease and reinforces its potential to complement the current model of prognostic evaluation, which is based only on clinical phenotypic characteristics.

A significant association of high GRS with final mean NYHA functional class was also found. Patients with high GRS presented worse final mean NYHA compared to low GRS. As there was no functional class difference at the beginning of follow-up, the difference of this surrogate outcome may corroborate the survival analysis findings described above.

Despite this important relationship with survival at early-stage HF and end NYHA functional class, the GRS showed no association with death or hospital admission for HF. One of the explanations could be related to the long follow-up time and disease duration.

In an interim analysis of this previously published cohort, an isolated GP, GPR $\beta$ 1-Ser49Gly,<sup>8</sup> was found to be predictive of death. The Gly allele was associated with lower mortality at the end of 6.7 years of follow-up ( $p=0.03$ ).

The main difference between the two analyses is follow-up time and disease duration. At the early stage of HF, only the most severe patients are expected to progress unfavorably. Recent data revealed a sustained mortality rate of approximately 50% at the end of five years after diagnosis.<sup>1</sup> This is probably the group in which the GRS may be useful for stratifying risk.

Nevertheless, even those with less severe heart disease may have poor outcomes with longer disease duration. At the end stage of HF, most patients present the same pattern: hospital admission and death due to disease progression.<sup>2</sup> Perhaps because of this, no significant differences were found between GRS and clinical outcomes at the end of the present study.

The cause of death in HF varies according to its stage. At the early stages (NYHA functional class I or II and shorter disease duration), sudden death from malignant

ventricular arrhythmia is the main cause.<sup>2</sup> Clinical scores are currently unable to identify patients at higher risk in this context. More than half of deaths of patients classified at low risk by MAGGIC are related to fatal arrhythmias.<sup>6</sup> Potentially, this would be a valuable scenario for the use of GRS: to identify individuals at early-stage HF with higher risk of death.

Unfortunately, a detailed analysis of the 96 deaths was limited, since many of these events were only recovered by searching for death certificates in electronic records where there was no access to the cause of death. Therefore, this hypothesis could be tested after the follow-up of the remaining cohort or in future studies.

Because it is an unprecedented genetic panel, its validation in a larger number of patients is essential. Despite the need for genotyping five different polymorphisms, the cost of these procedures is relatively low, as well as their complexity.

Nevertheless, it is possible to anticipate some limitations to the genetic risk score. Firstly, the influence of ethnicity can determine specific responses to the same genetic pattern. In this study, the fact that GRS remained relevant even after correction in multivariate analysis for skin color is a good indicator for its use in other populations. However, as discussed earlier, there are publications with genotypes reversing a benign pattern of clinical behavior predicted by race/skin color.<sup>35</sup> Consequently, the definition of the risk alleles used in the GRS construction may be different.

Secondly, a simple arithmetic model without adding different weights for the SNP was chosen in the construction of the GRS. As such, all risk alleles would represent the same degree of harm. Although this model has been successfully described for CAD,<sup>19</sup> this simplification may not be appropriate. The polygenic nature of HF would be included in the GRS, but the influential differences of each genotype would not be adequately represented. An alternative would be to develop a genetic score with different arithmetic weights based on the relative risk of clinical outcomes of each polymorphism. However, the limited number of patients and inconsistent results may restrict this form of analysis.

Finally, the GRS can be considered as a model still under development and with potential for improvement. The genes that were selected are probably preliminary components of a panel that will have new elements incorporated and tested in the future. As such, the absence of genotyping for the atrial natriuretic peptide system<sup>38</sup> is an important limitation, and should be analyzed in further studies.

## **CONCLUSION**

In individuals with HFrEF, the GRS built from five single nucleotide polymorphisms independently identified a subgroup with a two-fold increase in the risk of death at an early stage of the disease.

**REFERENCES**

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139(10):e56-e528.
2. MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL randomised intervention trial in congestive heart failure (MERIT-HF). *Lancet*. 1999;353(9169):2001-7.
3. Desai AS, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Rouleau JL, Chen F, et al. Effect of the angiotensin-receptor-neprilysin inhibitor LCZ696 compared with enalapril on mode of death in heart failure patients. *Eur Heart J*. 2015;36(30):1990-7.
4. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, et al; PARADIGM-HF Investigators and Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*. 2014;371(11):993-1004.
5. Solomon SD, Claggett B, Packer M, Desai A, Zile MR, Swedberg K, et al. Efficacy of sacubitril/valsartan relative to a prior decompensation: The PARADIGM-HF Trial. *JACC Heart Fail*. 2016;4(10):816-22.
6. Canepa M, Ameri P, Lucci D, Nicolosi GL, Marchioli R, Porcu M, et al; GISSI-HF Investigators. Modes of death and prognostic outliers in chronic heart failure. *Am Heart J*. 2019;208:100-9.
7. McNamara DM. Genomic variation and neurohormonal intervention in heart failure. *Heart Fail Clin*. 2010;6(1):35-43.
8. Albuquerque FN, et al. O Polimorfismo genético do receptor beta-adrenérgico tipo 1 Ser49Gly é preditor de morte em pacientes brasileiros com insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*. 2019 [In press].
9. Petersen M, Andersen JT, Jimenez-Solem E, Broedbaek K, Afzal S, Nyegaard M, et al. Effect of specific ADRB1/ADRB2/AGT genotype combinations on the association between survival and carvedilol treatment in chronic heart failure: a substudy of the ECHOS trial. *Pharmacogenet Genomics*. 2012;22(10):709-15.
10. Albuquerque FN, Brandão AA, Silva DA, Mourilhe-Rocha R, Duque GS, Gondar AF, et al. Impacto do polimorfismo genético da enzima conversora da angiotensina no remodelamento cardíaco. *Arq Bras Cardiol*. 2014;102(1):70-9.
11. Duque GS, Silva DA, Albuquerque FN, Schneider RS, Gimenez A, Pozzan R, et al. Influence of angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism on echocardiographic data of patients with ischemic heart failure. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(5):446-54.



12. Azzam N, Zafrir B, Fares F, Smith Y, Salman N, Nevzorov R, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism and prognosis in systolic heart failure patients. *Nitric Oxide*. 2015;47:91-6.
13. Matsa LS, Rangaraju A, Vengaldas V, Latifi M, Jahromi HM, Ananthapur V, et al. Haplotypes of NOS3 gene polymorphisms in dilated cardiomyopathy. *PloS One*. 2013;8(7):e70523.
14. McNamara DM, Tam WS, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Taylor AL, et al. Aldosterone synthase promoter polymorphism predicts outcome in African Americans with heart failure: results from the A-HeFT trial. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(6):1277-82.
15. Feola M, Monteverde M, Vivenza D, Testa M, Leto L, Astesana V, et al. Prognostic value of different allelic polymorphism of aldosterone synthase receptor in a congestive heart failure European continental ancestry population. *Arch Med Res*. 2017;48(2):156-61.
16. Chen S, Zhang L, Wang HW, Wang XY, Li XQ, Zhang LL. The M235T polymorphism in the angiotensinogen gene and heart failure: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2014;15(2):190-5.
17. Pilbrow AP, Palmer BR, Frampton CM, Yandle TG, Troughton RW, Campbell E, et al. Angiotensinogen M235T and T174M gene polymorphisms in combination doubles the risk of mortality in heart failure. *Hypertension*. 2007;49(2):322-7.
18. Zakrzewski-Jakubiak M, de Denus S, Dubé MP, Bélanger F, White M, Turgeon J. Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;65(5):742-51.
19. Beaney K, Drenos F, Humphries SE. How close are we to implementing a genetic risk score for coronary heart disease? *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(10):905-15.
20. Jimenez-Solem E. Effect of specific ADRB1/ADRB2/AGT genotype combinations on the association between survival and carvedilol treatment in chronic heart failure. *Pharmacogenet Genom*. 2012;22(10):709-715.
21. Zakrzewski-Jakubiak M, de Denus S, Dubé M-P, Bélanger F, White M, Turgeon J. Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;65(5):742-751.
22. Biolo A, Salvaro R, Clausell N, Silvello D, Santos KG, Rohde LE. Impact of  $\beta$ -2 Thr164Ile and combined  $\beta$ -adrenergic receptor polymorphisms on prognosis in a cohort of heart failure outpatients. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(6):565-71.
23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.



24. Sandilands AJ, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. Greater inotropic and cyclic AMP responses evoked by noradrenaline through Arg389  $\beta$ 1-adrenoceptors versus Gly389  $\beta$ 1-adrenoceptors in isolated human atrial myocardium. *Br J Pharmacol*. 2003;138(2):386-92.
25. Odawara M, Matsunuma A, Yamashita K. Mistyping frequency of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and an improved method for its avoidance. *Hum Genet*. 1997;100(2):163-6.
26. Dasar N, Ghaderian SM, Azargashb E. Human evaluation of the Glu298Asp polymorphism in NOS3 gene and its relationship with onset age of ESRD in Iranian patients suffering from ADPKD. *Int J Mol Cell Med*. 2012;1(2):105-12.
27. Gu D, Ge D, He J, Li B, Chen J, Liu D, et al. Haplotypic analyses of the aldosterone synthase gene CYP11B2 associated with stage-2 hypertension in northern Han Chinese. *Clin Genet*. 2004;66(5):409-16.
28. Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated Met235→Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Genet*. 1993;2(5):609-10.
29. Salanti G, Amountza G, Ntzani EE, Ioannidis JP. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(7):840-8.
30. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*. 2009;169(4):505-14.
31. Mangini S, Silveira FS, Silva CP, Grativvol PS, Seguro LF, Ferreira SM, et al. Decompensated heart failure in the emergency department of a cardiology hospital. *Arq Bras Cardiol*. 2008;90(6):400-6.
32. Sehnert AJ, Daniels SE, Elashoff M, Wingrove JA, Burrow CR, Horne B, et al. Lack of association between adrenergic receptor genotypes and survival in heart failure patients treated with carvedilol or metoprolol. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(8):644-51.
33. Metra M, Zani C, Covolo L, Nodari S, Pezzali N, Gelatti U, et al. Role of  $\beta$ 1- and  $\alpha$ 2c-adrenergic receptor polymorphisms and their combination in heart failure: a case-control study. *Eur J Heart Fail*. 2006;8(2):131-5.
34. Mottet F, Vardeny O, de Denus S. Pharmacogenomics of heart failure: a systematic review. *Pharmacogenomics*. 2016;17(16):1817-58.
35. Liu WN, Fu KL, Gao HY, Shang YY, Wang ZH, Jiang GH, et al.  $\beta$ 1 adrenergic receptor polymorphisms and heart failure: a meta-analysis on susceptibility, response to  $\beta$ -blocker therapy and prognosis. *PloS One*. 2012;7(7):e37659.
36. Labos C, Wang RH, Pilote L, Bogaty P, Brophy JM, Engert JC, et al. Traditional risk factors and a Genetic Risk Score are associated with age of first acute coronary syndrome. *Heart*. 2014;100(20):1620-4.

37. Xin J, Chu H, Ben S, Ge Y, Shao W, Zhao Y, et al. Evaluating the effect of multiple genetic risk score models on colorectal cancer risk prediction. *Gene*. 2018;673:174-80.
38. Abuzaanona A, Lanfear D. Pharmacogenomics of the natriuretic peptide system in heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2017;14(6):536-42.

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho analisou a relação entre variantes genéticas associadas a cinco elementos-chave na fisiopatologia da IC e a evolução clínica de 178 pacientes com ICFER. Os dois estudos apresentados discutem aspectos complementares na elaboração de um painel genético como potencial marcador biológico de prognóstico.

Foram dois momentos de fechamento do banco de dados para o exame estatístico com médias de 6,7 anos e 8,1 anos para o primeiro e segundo artigos, respectivamente. Em ambos os casos, são os maiores registros de seguimento clínico de pacientes com ICFER e genotipagem que se tem conhecimento.

Na primeira publicação, destaca-se a associação do PG-R $\beta$ 1-Ser49Gly com desfechos clínicos: o alelo Gly foi relacionado a um efeito protetor com menor risco de óbito e melhor evolução clínica avaliada pela classe funcional NYHA. Cada cópia do alelo Gly representou uma redução na chance de óbito de 63% ( $p=0,03$ ; Odds Ratio: 0,37 - IC95%: 0,15-0,91).

No segundo artigo, o principal achado foi a construção de um inédito escore de risco genético. Foi demonstrada uma associação de maneira independente à sobrevida de pacientes na fase inicial da síndrome. O ERG identificou um subgrupo com o dobro de risco de morte durante os primeiros 72 meses da doença. O grupo de ERG alto também foi relacionado a uma média da classe funcional da NYHA mais elevada no final do seguimento.

O objetivo maior deste projeto de pesquisa envolvia a concepção de um painel genético multissistêmico. Para isso, era imprescindível identificar os alelos de risco de cada polimorfismo utilizado no escore. Como há descrição de impactos genéticos diferentes entre as etnias,<sup>18,25</sup> a investigação do comportamento desses genótipos deveria ser, idealmente, realizada na mesma população em que o ERG fosse aplicado.

Na fisiopatologia da IC, é inegável o papel de destaque dos sistemas nervoso simpático e renina-angiotensina-aldosterona. Assim, era natural que polimorfismos dos protagonistas desses sistemas despertassem maior interesse dos pesquisadores. A enzima conversora de angiotensina e o receptor beta-adrenérgico do tipo-1 preenchem esses critérios para o SRAA e o SNS, respectivamente.

Este grupo de pesquisa publicou anteriormente o valor do PG-ECA-Inserção/Deleção como preditor independente para desfechos ecocardiográficos.<sup>8</sup> À época da primeira análise (em 2013), foram incluídos 111 pacientes com um tempo médio de seguimento de 5,4 anos. Observou-se que o alelo deleção associou-se de maneira significativa a pior padrão evolutivo do ecocardiograma. Esses resultados são compatíveis com a maioria das publicações internacionais<sup>21</sup> e nacionais<sup>19</sup> e dessa forma, este foi o primeiro PG selecionado para integrar o escore genético de risco.

Pelo seu papel central modulando o sistema nervoso simpático,<sup>17</sup> optou-se pelo receptor beta-adrenérgico do tipo 1 como o segundo integrante do ERG. Por isso o PG-R $\beta$ 1-Ser49Gly foi foco de análise da primeira publicação deste projeto de pesquisa.<sup>73</sup> A evolução clínica dos 178 pacientes foi significativamente diferente entre os genótipos. O alelo Ser foi relacionado a maior chance de óbitos e pior classe funcional NYHA, caracterizando esse alelo como de risco. Esse resultado está em harmonia com as principais publicações do tema.<sup>58,84-85</sup>

Como havia descrição de impactos genéticos diferentes entre as etnias,<sup>18,25</sup> era importante definir o comportamento dos PG nessa população. Assim, o PG-ECA e o PG-R $\beta$ 1 foram testados nos mesmos indivíduos em que o ERG seria aplicado. Em tese, essa primeira fase verificaria quem eram os alelos de risco corretos para os pacientes do estudo.

No Brasil, é possível antecipar algumas limitações ao generalizar os genótipos de risco observados nesses 178 pacientes. Primeiro, porque há uma intensa miscigenação com diferenças regionais importantes. Como exemplo, pode-se citar a composição da cor da pele para dois estados com trabalhos publicados na área: Rio de Janeiro<sup>8,18</sup> e Rio Grande do Sul.<sup>59</sup> Pelo censo do IBGE de 2010<sup>86</sup> o percentual de brancos era composto por 47,4% e 83,2%, respectivamente: uma diferença expressiva.

Em segundo lugar, como foi discutido no artigo do PG-R $\beta$ 1,<sup>73</sup> mesmo em populações similares do ponto de vista da cor da pele, a distribuição genotípica pode ser diferente.<sup>18</sup> Na verdade, o perfil genotípico da presente coorte esteve mais próximo de estudos internacionais<sup>25,58,84</sup> e não ao trabalho de Pereira et al.<sup>18</sup> que também foi realizado no Rio de Janeiro. Assim, a cor da pele não deve ser um indicador isolado para a definição do perfil genético.

Na continuação da construção do modelo do painel genético havia a necessidade de determinar localmente os alelos de risco para outros três polimorfismos: a óxido nítrico-sintase, aldosterona-sintase e angiotensinogênio. Assim, todos esses PG foram testados na coorte mas, em nenhum desses casos, foi possível estabelecer uma associação significativa com desfechos clínicos ou ecocardiográficos, dados ainda não publicados.

A alternativa encontrada foi a definição dos genótipos de mau prognóstico para o PG-ONS, PG-ALDOS e PG-AGT através de dados da literatura. Esses achados foram resumidos no Quadro 1. Optou-se por estudos com desfechos mais relevantes (clínicos e ecocardiográficos), com maior população estudada e com características basais mais próximas da presente coorte. O painel de alelos de risco então foi completado com: alelo Glu (PG-ONS), alelo C (PG-ALDOS) e alelo T (PG-AGT).

A presença desses três polimorfismos sem associação significativa a qualquer desfecho clínico ou de marcador substituto é uma limitação na construção do escore genético. Afinal, o painel seria composto de uma mistura de dois PG com papel preditor

definido (ECA e R $\beta$ 1) e três polimorfismos (ONS, ALDOS e AGT) sem essa relação definida para a população estudada.

Como descrito anteriormente, há divergência de achados na literatura para todos os cinco polimorfismos, quando analisados isoladamente. É possível que a influência individual de cada genótipo seja insuficiente para determinar variações significativas na história natural da IC. Como a maioria dos trabalhos compreende baixo número de pacientes, essa diferença seria ainda mais difícil de ser detectada.

Parece mais razoável que a influência genética combinada de múltiplos polimorfismos possa ter um impacto maior, grande o suficiente para alterar a evolução clínica desses pacientes. Nesses casos, seria possível observar uma diferença de eventos clínicos até mesmo em pequenos estudos. Assim, a combinação de PG adotada na elaboração do ERG pode ser interessante. Como essas variantes genéticas foram selecionadas de forma complementar do ponto de vista fisiopatológico, teoricamente seu valor preditor poderia ser ainda maior.

No segundo artigo apresentado, analisou-se o uso de um painel genético como preditor prognóstico em 178 pacientes com ICFER, com média de tempo de doença de  $10,3 \pm 6,3$  anos. De uma maneira inédita, um escore – composto por cinco polimorfismos genéticos, foi analisado no cenário da IC. Em pacientes com IC inicial o ERG identificou uma população com dobro de risco de morte durante o período até 72 meses do diagnóstico de IC.

Contudo, na avaliação dos desfechos clínicos, não foi observada associação do ERG com óbito ou internação por IC. Como discutido no artigo, a combinação de alta letalidade e prolongado tempo de doença pode ter sido a responsável por esse achado. Em fase mais tardia da síndrome, até aqueles com um padrão inicialmente benigno da cardiopatia poderiam evoluir mais gravemente.<sup>87,88</sup>

É possível que a influência genética na história natural da IC ocorra com maior intensidade em sua fase inicial. O dano celular – resultado da ação dos SNS e SRAA seria limitado e potencialmente reversível. Variações nas atividades desses sistemas poderiam influir na extensão da lesão miocárdica, manifestando-se com fenótipos diferentes de gravidade evolutiva.

Mas, no decorrer de anos, a ação incessante de hormônios como a adrenalina ou a renina – ainda que em níveis reduzidos naqueles com perfil genético benigno, determinaria um remodelamento cardíaco para todos. Os grupos geneticamente diferentes iniciam suas histórias naturais da doença de forma desigual e se equiparam no longo prazo.

A divisão da população em estratos segundo o tempo de doença adotada na análise estatística testou essa hipótese. O ponto de corte – 72 meses desde o diagnóstico da IC – foi definido a partir das características da curva de sobrevida de Kaplan-Meier em acordo com o tempo total de doença. Ao observar uma relação entre ERG e sobrevida apenas na fase inicial da IC (<72 meses), foi reforçada a impressão de maior influência genética nessa etapa da doença.

Esse achado foi complementado com uma análise multivariada com ajuste para fatores prognósticos conhecidos: NYHA final, FEVE final, creatinina, uso de furosemida e idade. O ERG alto (isto é, com mais de seis cópias de alelo de risco) se manteve associado a menor sobrevida confirmando um interessante papel preditor de prognóstico independente (Hazard Ratio=2,01; IC95%: 1,21-3,33; p=0,007).

Como forma de avaliar a utilização do escore em outras populações, optou-se por incluir nesse modelo de análise multivariada a cor da pele. Apesar da etnia estar associada a uma variação na atuação genética de cada polimorfismo individualmente, a análise combinada com o ERG não foi influenciada pela cor da pele. O fato do ERG ter permanecido relevante após esse ajuste, seria um bom indicador para seu uso em outras populações.

O modelo matemático adotado pode favorecer a aplicação do ERG em outras populações. Como não foram atribuídos pesos diferentes para o alelo de risco de cada PG, as influências genéticas dos cinco elementos estudados foram igualadas. Apesar de reconhecer a diversidade do impacto de cada PG segundo a população, um escore equiparado teria a vantagem de não superestimar nenhum dos eixos humorais.

Baseado em outros modelos de escores conceituados, é possível projetar alguns recursos para aperfeiçoamento do ERG. Assim, a utilização de um fator de correção de acordo com a população testada pode ser interessante. Esse método é utilizado por exemplo na estimativa do *clearance* de creatinina<sup>89</sup> através das fórmulas de Cockcroft-Gault (um fator específico para mulheres) e na de *The Modification of Diet in Renal Disease Study* (MDRD) (um fator próprio para afro-americanos).

Apesar do grande número de ferramentas publicadas, ainda não existe para a IC um escore clínico de risco definitivo, fidedigno e universalmente adotado.<sup>90,91</sup> A estimativa do risco individual ainda é imperfeita e não há uma estratégia eficaz para identificar pacientes com alto risco de morte súbita na fase inicial, por exemplo.<sup>92</sup>

A busca pela estratificação de risco ideal é antiga. A primeira citação na literatura sobre escores de risco foi publicada em 1981 no editorial de Califf e Rosati.<sup>93</sup> Uma nova etapa nesse processo pode ser inaugurada a partir da proposta desse inédito escore genético de risco.

Apesar de se tratar de uma ferramenta ainda preliminar, é possível identificar um racional para a sua criação: os elementos-chave na fisiopatologia, alguns genótipos de interesse e um modelo matemático.

É provável que a incorporação de novos polimorfismos melhore a performance desse painel e um gene do sistema peptídeo natriurético atrial seria candidato interessante para tal.<sup>94</sup>

Por último, o painel genético isolado provavelmente não será a melhor maneira de estratificar o prognóstico desses pacientes. A combinação de informações fenotípicas, através dos atuais escores clínicos, e o ERG configurando um escore misto deverá ser o modelo ideal.

## CONCLUSÕES

As principais conclusões deste estudo são:

- a) em indivíduos com IC com fração de ejeção reduzida, a presença do PG-R $\beta$ 1 Ser-Ser associou-se a pior evolução clínica avaliada pela classe funcional da NYHA e foi preditor de mortalidade, independente de outros fatores, em seguimento de 6,7 anos;
- b) um escore de risco genético construído a partir de cinco polimorfismos genéticos identificou, de maneira independente, um subgrupo com ERG  $\geq 6$  com o dobro de risco de morte durante a fase inicial da insuficiência cardíaca.



## REFERÊNCIAS

1. Ziaeeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13(6):368-78.
2. Brasil. Ministério da Saúde. [Internet]. DATASUS. Informações de saúde, epidemiológicas e mortalidade [acesso 2019 mar. 13]. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br>
3. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart disease and stroke statistics-2019 Update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2019;139(10):e56-528.
4. Comitê Coordenador da Diretriz de Insuficiência Cardíaca. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. *Arq Bras Cardiol.* 2018;111(3):436-539.
5. McNamara DM. Genomic variation and neurohormonal intervention in heart failure. *Heart Fail Clin.* 2010;6(1):35-43.
6. Xin J, Chu H, Ben S, Ge Y, Shao W, Zhao Y, et al. Evaluating the effect of multiple genetic risk score models on colorectal cancer risk prediction. *Gene.* 2018;673:174-80.
7. Beaney K, Drenos F, Humphries SE. How close are we to implementing a genetic risk score for coronary heart disease? *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(10):905-15.
8. Albuquerque FN, Brandão AA, Silva DA, Mourilhe-Rocha R, Duque GS, Gondar AF, et al. Impacto do polimorfismo genético da enzima conversora da angiotensina no remodelamento cardíaco. *Arq Bras Cardiol.* 2014;102(1):70-9.
9. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Ann Rev Med.* 2005;56:303-20.
10. Danieli GA. Cardiovascular genetics and genomics for the cardiologist. The Netherlands: Kluwer Academic; 2002.
11. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med.* 2010;363(2):166-76.
12. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndt SI, Weedon MN, Rivadeneira F, et al. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature.* 2010;467(7317):832-8.
13. Shuldiner AR, Pollin TI. Genomics: variations in blood lipids. *Nature.* 2010;466(7307):703-4.
14. Mottet F, Vardeny O, de Denus S. Pharmacogenomics of heart failure: a systematic review. *Pharmacogenomics.* 2016;17(16):1817-858.
15. Lopes LR, Elliott PM. Genetics of heart failure. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2451-61.



16. Bai Y, Wang L, Hu S, Wei Y. Association of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism with heart failure: a meta-analysis. *Mol Cell Biochem.* 2012;361(1-2):297-304.
17. Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SL, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of  $\beta$ 1- and  $\alpha$ 2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2002;347(15):1135-42.
18. Pereira SB, Velloso MW, Chermont S, Quintão MM, Nunes Abdhala R, Giro C, et al.  $\beta$ -adrenergic receptor polymorphisms in susceptibility, response to treatment and prognosis in heart failure: implication of ethnicity. *Mol Med Rep.* 2013;7(1):259-65.
19. Duque GS, Silva DA, Albuquerque FN, Schneider RS, Gimenez A, Pozzan R, et al. Influence of angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism on echocardiographic data of patients with ischemic heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2016;107(5):446-54.
20. Cuoco MA, Pereira AC, de Freitas HF, de Fátima Alves da Mota G, Fukushima JT, Krieger JE, et al. Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism modulation of onset of symptoms and survival rate of patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 2005;99(1):97-103.
21. Andersson B, Sylvén C. The DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with increased mortality in idiopathic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28(1):162-7.
22. Azzam N, Zafrir B, Fares F, Smith Y, Salman N, Nevzorov R, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism and prognosis in systolic heart failure patients. *Nitric Oxide.* 2015;47:91-6.
23. McNamara DM, Tam WS, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Taylor AL, et al. Aldosterone synthase promoter polymorphism predicts outcome in African Americans with heart failure: results from the A-HeFT trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(6):1277-82.
24. Pilbrow AP, Palmer BR, Frampton CM, Yandle TG, Troughton RW, Campbell E, et al. Angiotensinogen M235T and T174M gene polymorphisms in combination doubles the risk of mortality in heart failure. *Hypertension.* 2007;49(2):322-7.
25. Liu WN, Fu KL, Gao HY, Shang YY, Wang ZH, Jiang GH, et al.  $\beta$ 1 adrenergic receptor polymorphisms and heart failure: a meta-analysis on susceptibility, response to  $\beta$ -blocker therapy and prognosis. *PloS One.* 2012;7(7):e37659.
26. Rau T, Dungen HD, Edelmann F, Waagstein F, Lainščak M, Dimković S, et al. Impact of the  $\beta$  1-adrenoceptor Arg389Gly polymorphism on heart-rate responses to bisoprolol and carvedilol in heart-failure patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(1):21-8. Erratum in: *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(3):397.

27. Smart NA, Kwok N, Holland DJ, Jayasinghe R, Giallauria F. Bucindolol: a pharmacogenomic perspective on its use in chronic heart failure. *Clin Med Insights Cardiol.* 2011;5:55-66.
28. McNamara DM, Tam SW, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Venkitachalam L, et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) polymorphisms in African Americans with heart failure: results from the A-HeFT Trial. *J Card Fail.* 2009;15(3):191-8.
29. Beitelshes AL, Zineh I. Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) pharmacogenomics: implications in heart failure management. *Heart Fail Rev.* 2010;15(3):209-17.
30. Chang SN, Lin JW, Juang JM, Tsai CT, Hwang JJ, Chiang FT. Association between genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system and systolic heart failure revised by a propensity score-based analysis. *Cardiology.* 2010;116(4):279-85.
31. Zakrzewski-Jakubiak M, de Denus S, Dubé MP, Bélanger F, White M, Turgeon J. Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;65(5):742-51.
32. Sanderson JE, Yu CM, Young RP, Shum IO, Wei S, Arumanayagam M, et al. Influence of gene polymorphisms of the renin-angiotensin system on clinical outcome in heart failure among the Chinese. *Am Heart J.* 1999;137(4 Pt 1):653-7.
33. Fernández-Solà J, Nicolás JM, Oriola J, Sacanella E, Estruch R, Rubin E, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with vulnerability to alcoholic cardiomyopathy. *Ann Intern Med.* 2002;137(5 Pt 1):321-6.
34. Girnita DM, Ohmann EL, Brooks MM, Webber SA, Burckart GJ, Ferrell RE, et al. Gene polymorphisms impact the risk of rejection with hemodynamic compromise: a multicenter study. *Transplantation.* 2011;91(12):1326-32.
35. Candy GP, Skudicky D, Mueller UK, Woodiwiss AJ, Sliwa K, Luker F, et al. Association of left ventricular systolic performance and cavity size with angiotensin-converting enzyme genotype in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1999;83(5):740-4.
36. Walker WG, Whelton PK, Saito H, Russell RP, Hermann J. Relation between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension.* 1979;1(3):287-91.
37. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, Guilanueuf MT, Courbon D, Dumont C, et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet.* 1997;99(1):66-73.

38. Tavares A. Polimorfismos dos genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona e as moléstias cardiovasculares. *Rev Bras Hipertens.* 2000;7(3):237-42.
39. Bettinaglio P, Galbusera A, Caprioli J, Orisio S, Perna A, Arnoldi F, et al. Single strand conformation polymorphism (SSCP) as a quick and reliable method to genotype M235T polymorphism of angiotensinogen gene. *Clin Biochem.* 2002;35(5):363-8.
40. Chen S, Zhang L, Wang HW, Wang XY, Li XQ, Zhang LL. The M235T polymorphism in the angiotensinogen gene and heart failure: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014;15(2):190-5.
41. Imen T, Grissa MH, Boubaker H, Beltaief K, Messous S, Tounsi N, et al. AGT M235t polymorphism and heart failure in a cohort of Tunisian population: diagnostic and prognostic value. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(9):16346–51.
42. Feola M, Monteverde M, Vivenza D, Testa M, Leto L, Astesana V, et al. Prognostic value of different allelic polymorphism of aldosterone synthase receptor in a congestive heart failure European continental ancestry population. *Arch Med Res.* 2017;48(2):156-61.
43. Tiago AD, Badenhorst D, Skudicky D, Woodiwiss AJ, Candy GP, Brooksbank R, et al. An aldosterone synthase gene variant is associated with improvement in left ventricular ejection fraction in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2002;54(3):584-9.
44. Amir O, Amir RE, Paz H, Mor R, Sagiv M, Lewis BS. Aldosterone synthase gene polymorphism as a determinant of atrial fibrillation in patients with heart failure. *Am J Cardiol.* 2008;102(3):326-9.
45. Biolo A, Chao T, Duhaney TA, Kotlyar E, Allensworth-Davies D, Loscalzo J, et al. Usefulness of the aldosterone synthase gene polymorphism C-344-T to predict cardiac remodeling in African-Americans versus non-African-Americans with chronic systolic heart failure. *Am J Cardiol.* 2007;100(2):285-90.
46. Pall ML. The NO/ONOO-cycle as the central cause of heart failure. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):22274-330.
47. Tavares AC, Bocchi EA, Guimarães GV. Detailing peripheral arterial tonometry in heart failure. an endothelial function evaluation. *Int J Cardiovasc Sci.* 2017;30(4):354-8.
48. Malinski T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. *Am J Cardiol.* 2005;96(7B):13i-24i.
49. Luo JQ, Wen JG, Zhou HH, Chen XP, Zhang W. Endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and myocardial infarction: a meta-analysis of 34 studies involving 21,068 subjects. *PLoS One.* 2014;9(1):e87196.

50. Velloso MW, Pereira SB, Gouveia L, Chermont S, Tardin OM, Gonçalves R, et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in a multi-ethnic population with heart failure and controls. *Nitric Oxide*. 2010;22(3):220-5.
51. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, Ramani R, Janosko K, Mathier M, et al. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation*. 2003;107(12):1598-602.
52. Matsa LS, Rangaraju A, Vengaldas V, Latifi M, Jahromi HM, Ananthapur V, et al. Haplotypes of NOS3 gene polymorphisms in dilated cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013;8(7):e70523.
53. Martinelli NC, Santos KG, Biolo A, La Porta VL, Cohen CR, Silvello D, et al. Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: an haplotype analysis. *Nitric Oxide*. 2012;26(3):141-7.
54. Tardin OM, Pereira SB, Velloso MW, Balieiro HM, Costa B, Alves TO, et al. Polimorfismo G894T da óxido nítrico-sintetase endotelial e o prognóstico na insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(4):352-8.
55. Wang L, Lu L, Zhang F, Chen Q, Shen W. Polymorphisms of  $\beta$ -adrenoceptor and natriuretic peptide receptor genes influence the susceptibility to and the severity of idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese cohort. *J Card Fail*. 2010;16(1):36-44.
56. Lanfear DE, Peterson EL, Zeld N, Wells K, Sabbah HN, Williams K. Beta blocker survival benefit in heart failure is associated with ADRB1 Ser49Gly genotype. *J Card Fail*. 2015;21(8 Suppl):S50.
57. Luzum JA, English JD, Ahmad US, Sun JW, Canan BD, Sadee W, et al. Association of genetic polymorphisms in the beta-1 adrenergic receptor with recovery of left ventricular ejection fraction in patients with heart failure. *J Cardiovasc Transl Res*. 2019. [Epub ahead of print].
58. Börjesson M, Magnusson Y, Hjalmarson A, Andersson B. A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J*. 2000;21(22):1853-8.
59. Biolo A, Clausell N, Santos KG, Salvaro R, Ashton-Prolla P, Borges A, et al. Impact of  $\beta$ 1-adrenergic receptor polymorphisms on susceptibility to heart failure, arrhythmogenesis, prognosis, and response to beta-blocker therapy. *Am J Cardiol*. 2008;102(6):726-32.
60. Liggett SB. Pharmacogenomics of beta1-adrenergic receptor polymorphisms in heart failure. *Heart Fail Clin*. 2010;6(1):27-33.
61. Sehnert AJ, Daniels SE, Elashoff M, Wingrove JA, Burrow CR, Horne B, et al. Lack of Association between adrenergic receptor genotypes and survival in heart failure patients treated with carvedilol or metoprolol. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(8):644-51.

62. Orteg VE, Meyers DA. Pharmacogenetics: implications of race and ethnicity on defining genetic profiles for personalized medicine. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(1):16-26.
63. Narod SA. BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(12):702-7.
64. Grindedal E, Heramb C, Karsrud I, Ariansen SL, Mæhle L, Undlien DE, et al. Current guidelines for BRCA testing of breast cancer patients are insufficient to detect all mutation carriers. *BMC Cancer*. 2017;17(1):438.
65. Li X, Zhang P. Genetic determinants of myocardial dysfunction. *J Med Genet*. 2017;54(1):1-10.
66. van der Ende MY, Said MA, van Veldhuisen DJ, Verweij N, van der Harst P. Genome-wide studies of heart failure and endophenotypes: lessons learned and future directions. *Cardiovasc Res*. 2018;114(9):1209-25.
67. Tayal U, Prasad S, Cook SA. Genetics and genomics of dilated cardiomyopathy and systolic heart failure. *Genome Med*. 2017;9(1):20.
68. Westphal S, Stoppe C, Gruenewald M, Bein B, Renner J, Cremer J, et al. Genome-wide association study of myocardial infarction, atrial fibrillation, acute stroke, acute kidney injury and delirium after cardiac surgery – a sub-analysis of the RIPHeart-Study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2019;19(1):26.
69. Horvat C, Johnson R, Lam L, Munro J, Mazzarotto F, Roberts AM, et al. A gene-centric strategy for identifying disease-causing rare variants in dilated cardiomyopathy. *Genet Med*. 2019;21(1):133-43.
70. Xu H, Gerald DI, Dorn GW 2<sup>nd</sup>, Parihar A, Dave T, Robinson SW, et al. A genome-wide association study of idiopathic dilated cardiomyopathy in African Americans. *J Pers Med*. 2018;8(1) pii:E11.
71. Evans KL, Wirtz HS, Li J, She R, Maya J, Gui H, et al. Genetics of heart rate in heart failure patients (GenHRate). *Hum Genomics*. 2019;13(1):22.
72. Westphal JG, Rigopoulos AG, Bakogiannis C, Ludwig SE, Mavrogeni S, Bigalke B, et al. The MOGE(S) classification for cardiomyopathies: current status and future outlook. *Heart Fail Rev*. 2017;22(6):743-52.
73. Albuquerque FN, et al. O polimorfismo genético do receptor beta-adrenérgico tipo 1 ser49gly é preditor de morte em pacientes brasileiros com insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*. 2019 [In press].
74. Winkelmann BR, Russ AP, Nauck M, Klein B, Böhm BO, Maier V, et al. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease. *Am Heart J*. 1999;137(4 Pt 1):698-705.
75. Mangini S, Silveira FS, Silva CP, Grativvol PS, Seguro LF, Ferreira SM, et al. Decompensated heart failure in the emergency department of a cardiology hospital. *Arq Bras Cardiol*. 2008;90(6):400-6.

76. Kubo SH, Schulman S, Starling RC, Jessup M, Wentworth D, Burkhoff D. Development and validation of a patient questionnaire to determine New York Heart Association classification. *J Card Fail.* 2004;10(3):228-35.
77. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr.* 2015;28(1):1-39.e14.
78. Sandilands AJ, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. Greater inotropic and cyclic AMP responses evoked by noradrenaline through Arg389  $\beta$ 1-adrenoceptors versus Gly389  $\beta$ 1-adrenoceptors in isolated human atrial myocardium. *Br J Pharmacol.* 2003;138(2):386-92.
79. Dasar N, Ghaderian SM, Azargashb E. Human evaluation of the Glu298Asp polymorphism in NOS3 gene and its relationship with onset age of ESRD in Iranian patients suffering from ADPKD. *Int J Mol Cell Med.* 2012;1(2):105-12.
80. Gu D, Ge D, He J, Li B, Chen J, Liu D, et al. Haplotypic analyses of the aldosterone synthase gene CYP11B2 associated with stage-2 hypertension in northern Han Chinese. *Clin Genet.* 2004;66(5):409-16.
81. Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated Met<sup>235</sup>→Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Genet.* 1993;2(5):609-10.
82. Odawara M, Matsunuma A, Yamashita K. Mistyping frequency of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and an improved method for its avoidance. *Hum Genet.* 1997;100(2):163-6.
83. Stern C. The Hardy-Weinberg law. *Science.* 1943;97(2510):137-8.
84. Magnusson Y, Levin MC, Eggertsen R, Nyström E, Mobini R, Schaufelberger M, et al. Ser49Gly of beta1-adrenergic receptor is associated with effective beta-blocker dose in dilated cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(3):221-31.
85. Forleo C, Resta N, Sorrentino S, Guida P, Manghisi A, De Luca V, et al. Association of beta-adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med.* 2004;117(7):451-8.
86. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [Internet]. Censo 2010. [acesso em 2019 maio 15]. Disponível em: <https://censo2010.ibge.gov.br>
87. Chaudhry SP, Stewart GC. Advanced heart failure: prevalence, natural history, and prognosis. *Heart Fail Clin.* 2016;12(3):323-33.
88. MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL randomised intervention trial in congestive heart failure (MERIT-HF). *Lancet.* 1999;353(9169):2001-7.



89. Levey AS, Inker LA. Assessment of glomerular filtration rate in health and disease: a state of the art review. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;102(3):405-19.
90. Alba AC, Agoritsas T, Jankowski M, Courvoisier D, Walter SD, Guyatt GH, et al. Risk prediction models for mortality in ambulatory patients with heart failure: a systematic review. *Circ Heart Fail.* 2013;6(5):881-9.
91. Canepa M, Fonseca C, Chioncel O, Laroche C, Crespo-Leiro MG, Coats AJS, et al. Performance of prognostic risk scores in chronic heart failure patients enrolled in the European Society of Cardiology Heart Failure Long-Term Registry. *JACC Heart Fail.* 2018;6(6):452-62.
92. Canepa M, Ameri P, Lucci D, Nicolosi GL, Marchioli R, Porcu M, et al. Modes of death and prognostic outliers in chronic heart failure. *Am Heart J.* 2019;208:100-9.
93. Califf RM, Rosati RA. The doctor and the computer. *West J Med.* 1981;135(4):321-3.
94. Abuzaanona A, Lanfear D. Pharmacogenomics of the natriuretic peptide system in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2017;14(6):536-42.

## ANEXO A – Parecer da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

Planos de Saúde - Servidor

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS** **FR - 301213**

Projeto de Pesquisa  
Avaliação do Impacto de polimorfismos genéticos sobre a morbidade e mortalidade cardiovasculares em pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia não-Isquêmica

Área de Conhecimento 4.00 - Ciências da Saúde - 4.01 - Medicina - Diag.	Grupo Grupo II	Nível Diagnóstico		
Área(s) Temática(s) Especial(s) Genética Humana.		Fase Não se Aplica		
Unitermos Insuficiência Cardíaca, Genética, Polimorfismo Genético, Prognóstico, Morbidade, Mortalidade, Etiologia não-isquêmica				
<b>Sujeitos na Pesquisa</b>				
Nº de Sujeitos no Centro 100	Total Brasil 100	Nº de Sujeitos Total 100	Grupos Especiais	
Placebo NÃO	Medicamentos HIV / AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Sem Tratamento Específico NÃO	Banco de Materiais Biológicos SIM
<b>Pesquisador Responsável</b>				
Pesquisador Responsável FELIPE NEVES DE ALBUQUERQUE		CPF 082.529.657-92	Identidade 102048634	
Área de Especialização CARDIOLOGIA		Maior Titulação RESIDENCIA MEDICA	Nacionalidade BRASILEIRO	
Endereço RUA VOLUNTARIOS DA PATRIA, 445/1402		Bairro BOTAFOGO	Cidade RIO DE JANEIRO - RJ	
Código Postal 22270-000	Telefone 22662606 / 81332221	Fax 22662606	Email FNALBUQUERQUE@HOTMAIL.COM	
<b>Termo de Compromisso</b>				
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.				
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.				
Data: 03/11/2009		<i>Felipe Albuquerque</i> Assinatura		
<b>Instituição Onde Será Realizado</b>				
Nome Hospital Universitário Pedro Ernesto/HUPE - RJ		CNPJ 33.540.014/0001-56	Nacional/Internacional Nacional	
Unidade/Órgão Serviço de Cardiologia		Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO	
Endereço Av. 28 de Setembro 77 Térreo		Bairro Viã Isabel	Cidade Rio de Janeiro - RJ	
Código Postal 20551030	Telefone 21 25876100	Fax 21 25876100	Email hupe@uerj.br	
<b>Termo de Compromisso</b>				
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.				
Nome: _____		Assinatura _____		
Data: _____				



**ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



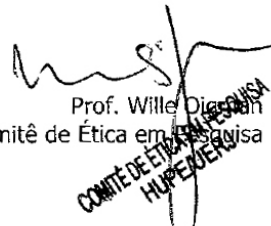
Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2009

Do: Comitê de Ética em Pesquisa  
Prof. Wille Oigman  
Para: Aut. Felipe Neves de Albuquerque  
Orient. Prof<sup>a</sup>. Andréa de Araújo Brandão

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2541-CEP/HUPE – CAAE: 0176.0.228.000-09) "AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS SOBRE A MORBIDADE E MORTALIDADE CARDIOVASCULARES EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DE ETIOLOGIA NÃO-ISQUÊMICA", aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S<sup>a</sup>., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

  
Prof. Wille Oigman  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030  
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br

**ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO POR ESCRITO  
AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA

---

PROJETO DE PESQUISA:

**Avaliação da importância do polimorfismo genético no prognóstico e resposta terapêutica em pacientes com insuficiência cardíaca.**

Professor responsável: Prof. Felipe Neves de Albuquerque

Colaboradores: Prof. Gustavo Salgado Duque, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dayse Aparecida da Silva, Prof. Dr. Ricardo Mourilhe Rocha e Prof. Dr. Denilson Campos de Albuquerque

Instituição: Hospital Universitário Pedro Ernesto, Faculdade de Ciências Médicas | UERJ – Disciplina/Serviço de Cardiologia e Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia

**O QUE É INSUFICIÊNCIA CARDÍACA?**

A insuficiência cardíaca é uma doença que se caracteriza pela falha no funcionamento normal do coração. A função de bomba exercida normalmente é prejudicada pelo aumento de tamanho do coração, causando cansaço, falta de ar, inchaço nas pernas e dificuldade para realizar as tarefas comuns. São várias as causas, mas a principal é a doença arterial coronariana (ex: infarto agudo do miocárdio).

**QUAL É O PAPEL DA GENÉTICA NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA?**

O papel atual da genética no tratamento da insuficiência cardíaca é cada vez maior. O estudo do perfil genético de pacientes com insuficiência cardíaca já possibilitou a identificação de alguns marcadores diretamente ligado a esta doença. Assim, indivíduos com determinadas características genéticas tem maior chance de apresentar e evoluir com insuficiência cardíaca. O mesmo acontece com o tratamento: alguns indivíduos tem melhor resposta do que outros utilizando o mesmo tratamento.

Você está sendo convidado (a) para participar de um estudo. Antes de você decidir participar, é importante que você entenda porque a pesquisa está sendo feita, quais são as etapas do estudo e os possíveis benefícios e riscos que pode causar. Leia com calma as informações abaixo e converse com seu médico esclarecendo todas as dúvidas que tiver. O seu médico discutirá estas informações com você e, se for necessário, explicará todas as suas dúvidas.

Se, depois de ler e entender todas as informações, você decidir participar, favor assinar o termo de consentimento no local indicado. Você receberá uma cópia deste documento de consentimento.

### **1) FUNDAMENTO E OBJETIVO DESTE ESTUDO**

Esse estudo pretende verificar se as pessoas acompanhadas na Cardiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto por insuficiência cardíaca apresentam alterações genéticas responsáveis pela evolução e diferença de resposta ao tratamento, que favoreçam a piora da doença ou que possam alterar o tratamento da mesma.

### **2) VOLUNTARIEDADE**

Você tem o direito de não participar deste estudo ou de se retirar do estudo a qualquer momento. Sua não participação não prejudicará o seu atendimento e o tratamento de sua doença neste hospital em qualquer momento.

### **3) RISCOS E DESCONFORTOS**

Este estudo não oferece quaisquer riscos ao paciente ou dificuldades adicionais à rotina assistencial de um paciente com insuficiência cardíaca, além do desconforto relacionado a coleta de sangue.

### **4) BENEFÍCIOS DA PESQUISA**

Aquele que participar deste estudo contribuirá para melhorar o conhecimento da influência genética na insuficiência cardíaca. Adicionalmente, há a possibilidade, após a comprovação da relação entre genética e resposta terapêutica, de individualização do tratamento permitindo a adequação do seu tratamento para uso apenas de fármacos comprovadamente com benefícios.

### **5) CONFIDENCIALIDADE**

Qualquer informação relacionada a esse projeto com respeito ao senhor(a), tais como, história médica, exame físico, resultados de exames complementares, serão mantidos em sigilo e apenas as pessoas envolvidas neste estudo e o seu médico assistente terão acesso.

### **6) CUSTOS**

A participação neste estudo não tem objetivo de submeter você a um tratamento, e não terá custo para você. **Pelo fato deste projeto de acompanhamento ser voluntário, nem você ou os médicos que dele participam receberão qualquer compensação financeira.**

### **7) DIREITOS PELA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO**

Você entende que a participação neste estudo é voluntária e que se decidir não participar, você não sofrerá nenhuma penalidade ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Se resolver participar, você poderá mudar de idéia sobre continuar no estudo. Caso isso aconteça, você entende que terá de informar seu médico sobre esta decisão imediatamente. Está ciente de que tal decisão de sua parte não terá nenhuma influência sobre a disponibilidade de cuidados médicos futuros ou outros benefícios aos quais você tem direito, independente de sua participação neste grupo.

**8) AS INFORMAÇÕES COLETADAS NO ESTUDO SERÃO CONFIDENCIAIS?**

Sim. Você está ciente de que todos os registros médicos e materiais de pesquisa que poderiam identificá-lo (a) serão mantidos em segredo e que, dentro do que é permitido pelas leis e/ou regulamentos aplicáveis, não estarão disponíveis publicamente. Você compreende que se os resultados deste estudo forem publicados na literatura médica, sua identidade não será revelada.

**9) CONTATO**

Se você tiver alguma dúvida durante o estudo, entre em contato com os médicos da Disciplina de Cardiologia na Av. 28 de Setembro, 77 – 2º andar - cardiologia e no telefone (21) 2587-6684.

Se você tiver dúvidas em relação aos seus direitos como participante da pesquisa entre em contato com do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto na Av. 28 de Setembro, 77 – Térreo e no telefone (21) 2587-6775.

**O QUE ACONTECERÁ COM VOCE SE DECIDIR PARTICIPAR?**

O médico irá ler este Termo de Consentimento com você. Após a assinatura do mesmo, será feita uma coleta única de aproximadamente 10 (dez) mililitros de sangue por um profissional especializado. Esta coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o seu tratamento. Esta amostra será encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Geral onde será guardado e utilizado no período de dois anos, período este da pesquisa.

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

PROJETO DE PESQUISA:

**Avaliação da importância do polimorfismo genético no prognóstico e resposta terapêutica em pacientes com insuficiência cardíaca.**

Investigador Principal: Dr. Felipe Neves de Albuquerque & Dr. Gustavo Salgado Duque

Instituição: Hospital Universitário Pedro Ernesto - Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Eu esclareci todas as dúvidas que tinha a respeito deste projeto de pesquisa.

Eu li e entendi o que está escrito neste formulário. Eu aceito participar deste projeto.

---

Nome do paciente por extenso

---

Assinatura do paciente

data

---

Assinatura do investigador

data

---

Nome da testemunha\* por extenso

---

Assinatura da testemunha\*

data

\* A assinatura da testemunha é necessária quando o paciente for analfabeto e /ou assinar com impressão datiloscópica.



## ANEXO D – Comprovação de aceite do 1º artigo

Arquivos Brasileiros de Cardiologia

**Carta de decisão (ABC-2019-0187.R3)**

**De:** rochitte@cardiol.br

**Para:** felipenalbuquerque@gmail.com, felipe.albuquerque@uerj.br

**CC:**

**Assunto:** Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Decision on Manuscript ID/Decisão sobre ID do Manuscrito ABC-2019-0187.R3

**Corpo:** Dear Dr. Albuquerque:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "O Polimorfismo Genético do Receptor Betadrenérgico tipo 1 Ser49Gly é preditor de morte em pacientes brasileiros com Insuficiência Cardíaca" in its current form for publication in the Arquivos Brasileiros de Cardiologia. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the bottom of this letter.

Send the following forms below completed and signed to revista@cardiol.br and inform the Manuscript ID:

Transfer of Author's Copyright: <https://bit.ly/2KB8kSq>  
Statement of Potential Conflict of Interest: <https://bit.ly/2rPnb54>  
Author Contribution: <https://bit.ly/2rSk05z>  
Statement of Informed Consent and Statement of Human and Animal Rights: <https://bit.ly/2IOhH3X>

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Arquivos Brasileiros de Cardiologia, we look forward to your continued contributions to the journal.

Sincerely,  
Dr. Carlos Rochitte  
Editor-in-Chief  
rochitte@cardiol.br, abc@cardiol.br  
Arquivos Brasileiros de Cardiologia

Associate Editor  
Comments to the Author:  
(There are no comments.)

Entire Scoresheet:

---

Prezado(a) Dr. Albuquerque:

É uma satisfação aceitar seu manuscrito intitulado "O Polimorfismo Genético do Receptor Betadrenérgico tipo 1 Ser49Gly é preditor de morte em pacientes brasileiros com Insuficiência Cardíaca" na sua forma atual para publicação nos Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Os comentários dos avaliadores que revisaram seu manuscrito estão ao fim desta carta.

Envie os seguintes formulários abaixo preenchidos e assinados para revista@cardiol.br, informando o ID do Manuscrito:

Transferência de Direitos Autorais: <https://bit.ly/2wPf0dP>  
Conflito de interesses: <https://bit.ly/2k5TBUt>  
Contribuição dos Autores: <https://bit.ly/2k65h9C>  
Consentimento Livre e Esclarecido e Declaração de Direitos Humanos e Animais: <https://bit.ly/2IvLc7I>


Obrigado por sua excelente contribuição. Em nome dos editores dos Arquivos Brasileiros de Cardiologia, aguardamos suas novas contribuições para o periódico.

Atenciosamente,  
Dr. Carlos Rochitte  
Editor-Chefe  
rochitte@cardiol.br, abc@cardiol.br  
Arquivos Brasileiros de Cardiologia

Associate Editor  
Comments to the Author:  
(There are no comments.)

Formulário de Avaliação Completo:

**Data do envio:** 05-jun-2019

 Fechar janela

**ANEXO E – Comprovação de submissão do 2º artigo**

**From:** European Journal of Heart Failure em@editorialmanager.com  
**Subject:** A manuscript number has been assigned - EURJHF-19-626  
**Date:** 16 June 2019 19:30  
**To:** Felipe Neves de Albuquerque felipenalbuquerque@gmail.com



Dear Dr Albuquerque,

Your submission entitled "GENETIC RISK SCORE WITH FIVE POLYMORPHISMS AS AN INDEPENDENT PREDICTOR OF SURVIVAL IN EARLY STAGE HEART FAILURE" has been assigned the following manuscript number: EURJHF-19-626.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.  
The URL is <https://www.editorialmanager.com/eurjhf/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office  
European Journal of Heart Failure

Please be aware that if you ask to have your user record removed, we will retain your name in the records concerning manuscripts for which you were an author, reviewer, or editor.

---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/eurjhf/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.