

ARTIGO ORIGINAL

Identificação de mecanismos fisiopatológicos em insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida em comparação com preservada



Jasper Tromp, MD,^{a,b,c} B. Daan Westenbrink, MD, PHD,^a Wouter Ouwerkerk, PHD,^d Dirk J. van Veldhuisen, MD, PHD,^a Nilesh J. Samani, MD,^e Piotr Ponikowski, MD,^f Marco Metra, MD,^g Stefan D. Anker, MD, PHD,^h John G. Cleland, MD,ⁱ Kenneth Dickstein, MD, PHD,^j Gerasimos Filippatos, MD,^k Pim van der Harst, MD, PHD,^a Chim C. Lang, MD,^l Leong L. Ng, MD,^e Faiez Zannad, MD, PHD,^m Aelko H. Zwinderman, PHD,^d Hans L. Hillege, MD, PHD,^a Peter van der Meer, MD, PHD,^a Adriaan A. Voors, MD, PHD^a

RESUMO

CONTEXTO São necessárias informações sobre diferenças fisiopatológicas entre insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (ICFER) em comparação com insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (ICFEP).

OBJETIVOS O objetivo deste estudo foi estabelecer vias biológicas especificamente relacionadas a ICFER e ICFEP.

MÉTODOS Os autores conduziram uma análise de rede para identificar correlações únicas de biomarcadores em ICFER e ICFEP, usando 92 biomarcadores de domínios fisiopatológicos diferentes em uma coorte de 1.544 de pacientes com insuficiência cardíaca (IC). Os dados foram validados de forma independente em 804 pacientes com IC. As redes foram enriquecidas com conhecimento existente sobre interações proteína-proteína e convertidos em vias biológicas unicamente relacionadas a ICFER, IC com fração de ejeção intermediária e ICFEP.

RESULTADOS Na coorte de índice (idade média de 74 anos; 34% mulheres), 718 (47%) pacientes apresentavam ICFER [fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) <40%], e 431 (27%) pacientes apresentavam ICFEP (FEVE ≥50%). Um total de 8 (12%) correlações foi única para ICFER e de 6 (9%) para ICFEP. As proteínas centrais na ICFER foram peptídeo natriurético do tipo B N-terminal, fator 15 de diferenciação de crescimento, receptor tipo 1 interleucina 1 e fator 2 de transcrição de ativação, enquanto proteínas centrais na ICFEP foram subunidade da integrina beta 2 e beta 1 catenina. As vias biológicas na ICFER foram relacionadas à atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA, metabolismo de proteína celular e regulação da biossíntese de óxido nítrico. As vias únicas em pacientes com ICFEP foram relacionadas à resposta de citocinas, organização da matriz extracelular e inflamação. As vias biológicas de pacientes com IC com fração de ejeção intermediária estavam entre ICFER e ICFEP.

CONCLUSÕES A análise de redes mostrou que perfis de biomarcadores específicos para ICFER estão relacionados à proliferação celular e metabolismo, enquanto perfis de biomarcadores específicos para ICFEP estão relacionados à inflamação e à reorganização da matriz extracelular. (The BIOlogy Study to Tailored Treatment in Chronic Heart Failure [BIOSAT-CHF]; EudraCT 2010-020808-29) (J Am Coll Cardiol 2018;72:1081-90) © 2018 publicado por Elsevier em nome da American College of Cardiology Foundation.



Ouça o áudio com o resumo deste artigo, apresentado pelo editor-chefe do JACC, Dr. Valentin Fuster.



^aDepartment of Cardiology, University of Groningen, Groningen, Países Baixos; ^bNational Heart Centre Singapore, Cingapura; ^cDuke-NUS Medical School, Singapura, Cingapura; ^dDepartment of Epidemiology, Biostatistics & Bioinformatics, Academic Medical Center, Amsterdam, Países Baixos; ^eDepartment of Cardiovascular Sciences, University of Leicester e NIHR Leicester Biomedical Research Centre, Glenfield Hospital, Leicester, Reino Unido; ^fDepartment of Heart Diseases, Wrocław Medical University e Cardiology Department, Military Hospital, Wrocław, Polónia; ^gInstitute of Cardiology, Department of Medical and Surgical Specialties, Radiological Sciences and Public Health, University of Brescia, Brescia, Itália; ^hDivision of Cardiology and Metabolism-Heart Failure, Cachexia & Sarcopenia, Department of Cardiology (CVK) e Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT), na Charité University Medicine, Berlin, Alemanha; ⁱRobertson Centre for Biostatistics, Institute of Health and Wellbeing, University of Glasgow, Glasgow Royal Infirmary, Glasgow, Reino Unido; ^jUniversity of Bergen, Stavanger University Hospital, Stavanger, Noruega; ^kNational and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, Department of Cardiology, Heart Failure Unit, Athens University Hospital Attikon, Athens, Grécia; ^lDivision of Molecular & Clinical Medicine, University of Dundee, Dundee, Reino Unido; e ^mInserm CIC 1433, Université de Lorraine, CHU de Nancy, Nancy, França. A BIOSAT-CHF foi financiada pela Comissão Europeia (FP7-242209-BIOSAT-CHF; EudraCT 2010-020808-29).

Também foi recebido apoio do Netherlands Cardiovascular Research Initiative: uma iniciativa com apoio do Dutch Heart Foundation, CVON2014-11 RECONNECT. Dr. Westenbrink recebeu pagamentos por consultoria e palestras da Boehringer Ingelheim e da Bayer; e recebeu financiamento para viagem da Novartis. Dr. van Veldhuisen recebeu pagamentos de associação de conselhos ou de despesas de viagem da Novartis, Johnson & Johnson

Insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (ICFER) e insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (ICFEP) foram originalmente consideradas como 2 extremos da mesma doença. No entanto, quando os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), os bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA) e os antagonistas dos receptores mineralocorticoides estão associados a melhora do desfecho clínico em pacientes com ICFER (1, 2, 3), não foi observado esse benefício em pacientes com ICFEP (4, 5, 6). A fisiopatologia subjacente é atualmente considerada diferente entre ICFER e ICFEP (7, 8, 9, 10, 11).

O atual paradigma sobre a fisiopatologia subjacente da ICFEP sugere que um estado pró-inflamatório é responsável pelo enrijecimento do músculo cardíaco e aumento das pressões de enchimento (7). De fato, Paulus et al. (7) sugeriu que a plethora de comorbidades que usualmente afeta pacientes com ICFEP causa inflamação de baixo nível, que afeta o endotélio vascular coronariano e reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico. Sua hipótese sugere que isso afeta diretamente os miócitos cardíacos e causa hipertrofia celular e endurecimento cardíaco (7, 12).

A análise de rede é uma ferramenta para obter novo conhecimento sobre vias de doenças e fisiopatologia, estudando as correlações proteína-proteína (biomarcador-biomarcador) (9, 10, 13). Ao enriquecer experimentalmente as redes de biomarcadores de proteínas encontradas com interações proteína-proteína baseadas em conhecimento, as correlações encontradas empiricamente podem ser colocadas no contexto de vias conhecidas (14, 15). Portanto, realizamos uma análise de rede enriquecida por interações baseadas em conhecimento para descobrir mecanismos biológicos que são únicos para pacientes com ICFER e ICFEP.

MÉTODOS

POPULAÇÃO DE PACIENTES. Estudamos pacientes do projeto BIOSTAT-CHF (Biology Study to Tailored Treatment in Chronic Heart Failure), que é descrito em outros estudos (16, 17, 18, 19, 20). Em resumo, o BIOSTAT-CHF inclui 2 coortes de pacientes com insuficiência cardíaca (IC) incluídos na Escócia e na Europa. O objetivo do

estudo BIOSTAT-CHF foi caracterizar as vias biológicas relacionadas à resposta/não resposta à terapia farmacológica recomendada pelas diretrizes para IC. Portanto, os pacientes tiveram que ser tratados de forma subótima na inclusão. Usamos a coorte escocesa do estudo BIOSTAT-CHF como nossa coorte de estudo primária e a coorte europeia do estudo BIOSTAT-CHF como nossa coorte de validação porque essa era uma população menos selecionada. A coorte escocesa consistia em 1.738 pacientes de 6 centros na Escócia, no Reino Unido. Os pacientes deviam ter ≥ 18 anos, com diagnóstico de IC e internados previamente com IC, necessitando de tratamento diurético. Os biomarcadores foram medidos em 1.707 do total de 1.738 pacientes. Desses pacientes, a ecocardiografia estava disponível em 1.544 pacientes. Validamos nossos achados na coorte europeia do estudo BIOSTAT-CHF, que originalmente consistia em 2.516 pacientes com IC de 69 centros em 11 países europeus. Os critérios de inclusão para a coorte europeia abrangem: >18 anos de idade e com sintomas de novo início ou agravamento da IC confirmados por uma FEVE de $\leq 40\%$ ou peptídeo natriurético do tipo B e/ou níveis plasmáticos do peptídeo natriurético tipo pro-B N-terminal (NT-proBNP) >400 ou >2.000 ng/L, respectivamente. Devido a essa diferença nos critérios de inclusão para pacientes com FEVE $>40\%$, excluímos todos os pacientes com ICFER e um nível de NT-proBNP <2.000 ng/L ou pacientes com ICFER e sem nível de NT-proBNP disponível (Figura On-line 1). No total, a coorte europeia consistiu em 808 pacientes com IC com biomarcadores disponíveis em todos os pacientes. Todos os pacientes precisaram ser tratados com diuréticos de alça, mas não tinham sido previamente tratados com IECA/BRA e/ou betabloqueador, ou estavam recebendo $\leq 50\%$ das doses-alvo desses medicamentos no momento da inclusão e início previsto ou titulação mais alta de IECA/BRA e betabloqueadores.

Os pacientes das duas coortes foram tratados de forma subótima com IECA/BRA e/ou betabloqueadores e anteciparam o início ou a titulação mais alta dos IECA/BRA e dos betabloqueadores para doses-alvo recomen-

ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

FDC = fator de diferenciação de crescimento
ICFEI = insuficiência cardíaca com fração de ejeção intermediária
ICFEP = insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada
ICFER = insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida
IL1RL1 = receptor de interleucina 1 tipo 1
ITGB2 = integrina subunidade beta 2
NT-proBNP = peptídeo natriurético do tipo pro-B N-terminal

e Vifor. Dr. Metra recebeu honorários de consultoria da Amgen, AstraZeneca, Bayer, Novartis, Relypsa, Servier, Stealth Therapeutics e Trevena; e pagamentos de palestras da Abbott Vascular, Novartis e Servier. Dr. Anker recebeu financiamentos da Vifor e Abbott Vascular; e pagamentos por consultoria ou palestras da Vifor, V-Wave, Impulse Dynamics, Bayer, Boehringer Ingelheim, Brahms, Janssen, Novartis, Servier, Stealth Peptides e ASTRA. Dr. Cleland atendeu no conselho consultivo da Amgen, Novartis e Medtronic; e recebeu financiamentos de pesquisa da Amgen, Medtronic, Novartis, Philips, Stealth Biotherapeutics e Bristol-Myers Squibb. Dr. Filippatos recebeu pagamentos de comitê e/ou financiamentos de pesquisa da Novartis, Bayer, Medtronic, Vifor e Servier; recebeu financiamento de pesquisa da União Europeia; e é membro do comitê diretor de pesquisas patrocinado pela Novartis e Servier. Dr. Lang recebeu pagamentos de consultoria e/ou financiamentos de pesquisa da Amgen, AstraZeneca, Merck Sharp & Dohme, Novartis e Servier. Dr. Voors recebeu pagamentos de consultoria e/ou financiamentos de pesquisa da Alere, Amgen, Bayer, Boehringer Ingelheim, Cardio3Biosciences, Celladon, GlaxoSmithKline, Merck/Merck Sharp & Dohme, Novartis, Servier, Stealth Peptides, Singulex, Sphingotec, Trevena, Vifor e ZS Pharma. Todos os demais autores informaram não ter relações relevantes para os conteúdos deste artigo a serem declaradas.

Manuscrito recebido em 3 de maio de 2018; manuscrito revisado recebido em 15 de junho de 2018, aceito em 18 de junho de 2018.

TABELA 1 Características basais da coorte escocesa em categorias de FEVE				
	ICFER (n = 718)	ICFEI (n = 395)	ICFEP (n = 431)	Valor de p para tendência
Características demográficas				
Idade, anos	72,0 ± 10,9	74,9 ± 10,0	76,2 ± 9,9	<0,001
Feminino	188 (26,2)	137 (34,7)	187 (43,4)	<0,001
IMC, kg/m ²	28,2 ± 6,0	28,9 ± 5,9	30,0 ± 6,8	<0,001
PAS, mmHg	122,7 ± 21,3	127,3 ± 22,3	129,9 ± 23,3	<0,001
PAD, mmHg	69,8 ± 12,3	68,5 ± 13,1	68,0 ± 13,7	0,006
Classe funcional NYHA				
I	6 (0,8)	5 (1,3)	4 (0,9)	<0,001
II	337 (46,9)	160 (40,6)	136 (31,6)	
III	300 (41,8)	176 (44,7)	206 (47,8)	
IV	75 (10,4)	53 (13,5)	85 (19,7)	
FEVE, %	30,1 ± 7,3	43,7 ± 2,8	57,3 ± 6,0	<0,001
Frequência cardíaca, batimentos/min	73,9 ± 16,5	72,3 ± 16,4	75,0 ± 15,8	0,172
Comorbidades				
Anemia	316 (44,4)	142 (36,0)	199 (46,4)	0,001
Diabetes melito	212 (29,6)	133 (34,0)	158 (36,9)	0,009
DPOC	110 (15,5)	61 (15,6)	110 (25,6)	<0,001
Hipertensão	363 (50,8)	249 (63,2)	293 (68,0)	<0,001
DVP	144 (20,5)	88 (23,0)	116 (27,7)	0,007
Acidente vascular cerebral	117 (16,5)	84 (21,5)	84 (19,6)	0,138
Fibrilação atrial na ECG	199 (27,7)	136 (34,4)	162 (37,6)	<0,001
ICP	132 (18,5)	80 (20,5)	74 (17,3)	0,713
RM	137 (19,1)	86 (21,8)	62 (14,4)	0,089
Medidas laboratoriais				
NT-proBNP, ng/L	1.672 (667-4.615)	1.209,5 (428,0-2.942,0)	1.062 (392-2.820)	<0,001
TFGe, ml/min/1,73 m ²	59,8 (43,3-77,4)	59,7 (42,1-76,6)	58,4 (42,0-76,0)	0,310
Ureia, mmol/L	8,6 (6,7-12,3)	8,6 (6,6-11,2)	8,6 (6,4-11,7)	0,289
Hemoglobina, g/dL	13,6 (4,9)	13,5 (6,6)	13,1 (7,6)	<0,001
Medicamentos				
IECA/BRA	538 (74,9)	274 (69,4)	268 (62,2)	<0,001
Betabloqueador	570 (79,4)	293 (74,2)	257 (59,6)	<0,001
ARM	295 (41,1)	109 (27,6)	85 (19,7)	<0,001
Agentes diuréticos	712 (99,2)	391 (99,0)	425 (98,6)	0,375
Os valores são expressos como média ± DP, n (%) ou mediana (intervalo interquartil). Negrito indica p <0,05. ARM = antagonista do receptor mineralocorticoide; BRA = bloqueador do receptor de angiotensina; BRE = bloqueio de ramo esquerdo; DPOC = doença pulmonar obstrutiva crônica; DVP = doença vascular periférica; ECG = eletrocardiografia; FEVE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo; HVE = hipertrofia ventricular esquerda; ICP = intervenção coronária percutânea; IECA = inibidor da enzima conversora de angiotensina; IMC = índice de massa corporal; NT-proBNP = peptídeo natriurético do tipo pro-B N-terminal; NYHA = New York Heart Association; PAD = pressão arterial diastólica; PAS = pressão arterial sistólica; RM = revascularização miocárdica; TFGe = taxa de filtração glomerular estimada.				

dadas pela ESC (21). Além disso, todos os pacientes foram incluídos com piora dos sinais e sintomas de IC, como em pacientes ou em ambulatorios (16). Para caracterizar adequadamente os perfis de biomarcadores em pacientes com ICFER e ICPEP, investigamos os perfis de biomarcadores únicos para pacientes com ICFER e ICPEP, que não mostraram sobreposição com ICFEI. A ICFER foi definida como tendo uma FEVE <40%, a ICFEI foi definida como tendo uma FEVE de 40% a 49%, e a ICPEP foi definida como tendo uma FEVE ≥50%.

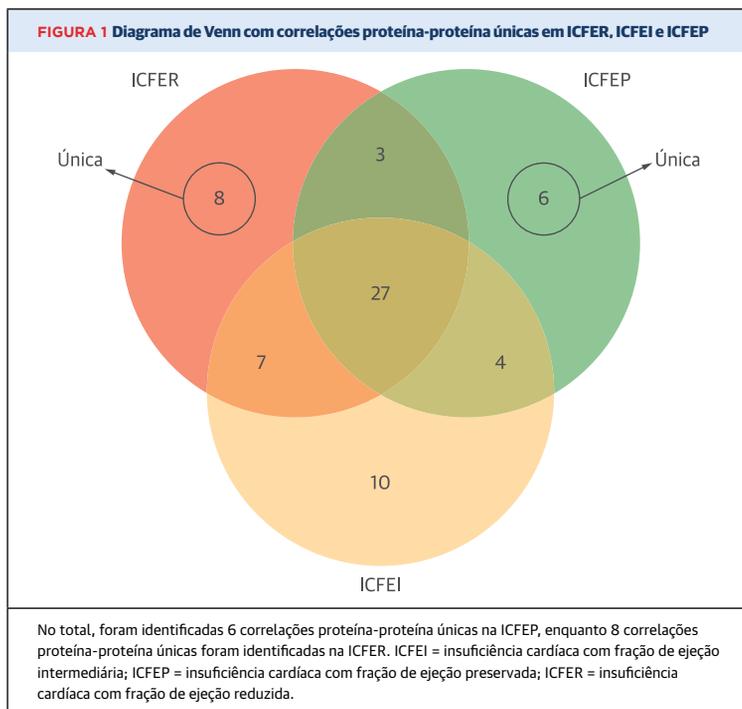
MEDIÇÕES CLÍNICAS E DE BIOMARCADORES. História clínica, uso atual de medicamentos e exame físico foram todos registrados no início do estudo. A ecocardiografia padrão foi fortemente recomendada, mas não obrigatória para inclusão no estudo. Nas coortes combinadas, mais de 80% das ecocardiografias foram

realizadas dentro de 1 ano antes da inclusão, com mais de 70% das ecocardiografias realizadas dentro de 3 meses. O período da ecocardiografia foi semelhante em ICFER e ICPEP nas coortes escocesa e europeia.

Um grande painel com 92 biomarcadores de uma ampla gama de domínios fisiopatológicos foi medido nas coortes escocesas e europeias. Uma visão geral dos biomarcadores e sua função fisiopatológica é apresentada na [Tabela On-line 1](#). As características do ensaio são apresentadas na [Tabela On-line 2](#). Noventa e duas proteínas foram medidas usando uma técnica de alto rendimento com o kit Olink Proseek Multiplex CVD III96X96 (Olink Proteomics, Uppsala, Suécia), que mede proteínas com relação cardiovascular simultaneamente em amostras de plasma de 1-µl (22). O kit utiliza tecnologia de ensaio de extensão de proximidade, em

que 92 pares de sonda de anticorpo marcados com oligonucleótidos são permitidos a ligarem-se ao seu respectivo alvo presente na amostra. O ensaio de extensão de proximidade é um ensaio homogêneo que usa pares de anticorpos equipados com moléculas repórteres de DNA. Quando se ligam aos seus alvos corretos, eles dão origem a novos amplicons de DNA, cada um com o código de barras de identificação do respectivo antígeno. Os amplicons são subsequentemente quantificados usando uma plataforma de PCR em tempo real Fluidigm BioMark HD. Quatro controles internos e dois controles externos (em triplicado) são incluídos no ensaio. Os operadores do laboratório estavam cegos para todas as informações relativas à população do estudo.

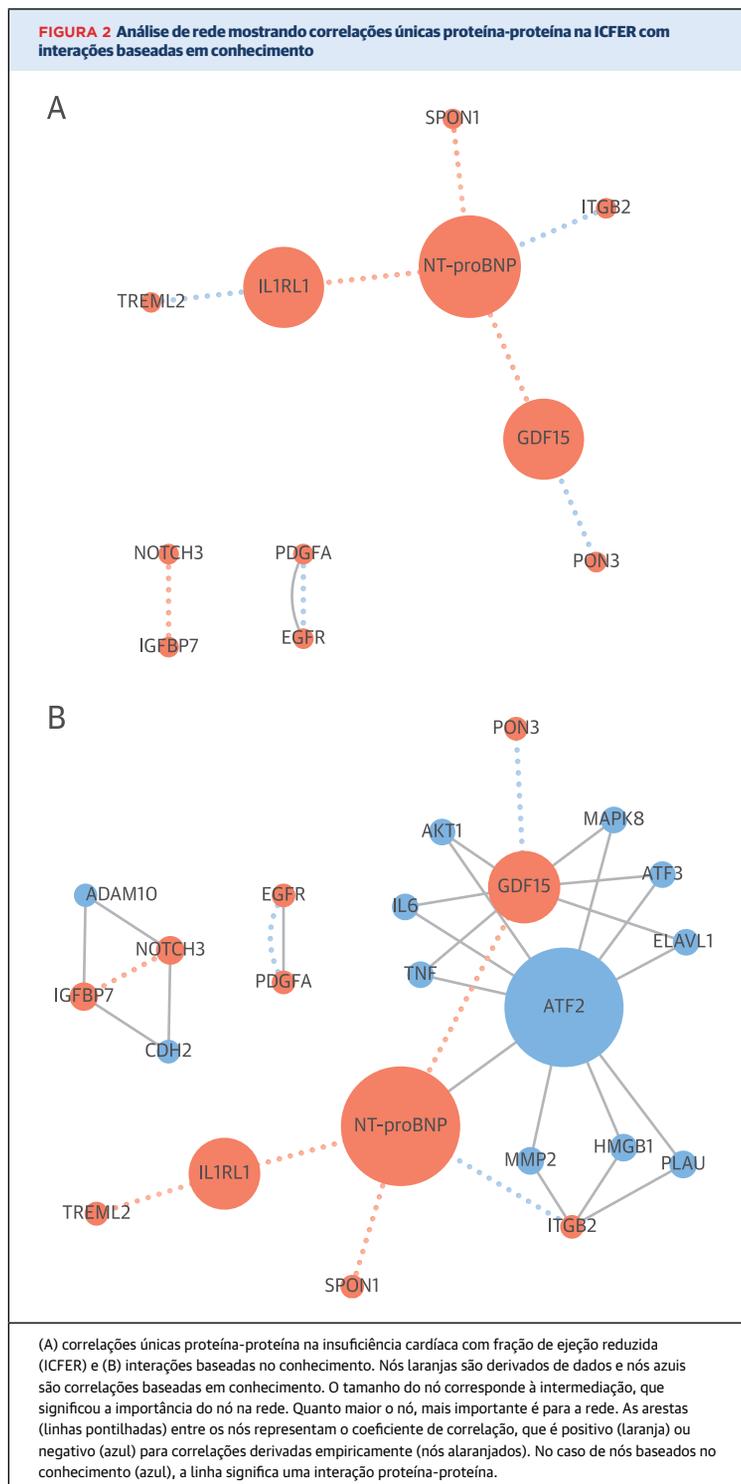
ANÁLISE ESTATÍSTICA. Um teste de tendência foi realizado para investigar as tendências nas características basais entre ICFER, ICPEI e ICPEP. Uma descrição detalhada dos métodos utilizados para a análise de rede pode ser encontrada no [Apêndice On-line](#). Em resumo, realizamos análise de rede utilizando correlações únicas entre proteínas (biomarcadores) dentro da ICFER, ICPEI e ICPEP. Mantivemos apenas os biomarcadores que passaram no ponto de corte do valor p após a correção de múltiplas comparações. O ponto de corte do valor p foi baseado no número de componentes principais após análises de componentes principais, que determinaram >95% da variância entre os biomarcadores nas coortes separadas (10). Um total de 51 PCs foi encontrado, do qual os autovalores explicaram cumulativamente >95% da variação observada no conjunto de dados de descoberta. Para corrigir a comparação múltipla para correlações interbiomarcadores, foi utilizado $0,05 / ([PC \times PC - 1] / 2)$ para o valor de corte p ajustado, em que PC é o número de componentes principais encontrados. Esse procedimento foi repetido para a coorte europeia independente. Aqui, 50 PCs explicaram >95% da variação nos biomarcadores. Em seguida, apenas as correlações pareadas foram retidas, tanto na descoberta quanto na coorte de validação. Em análises de sensibilidade, testamos se as correlações biomarcador-biomarcador eram dependentes dos níveis de NT-proBNP, realizando análises separadas em pacientes com níveis de NT-proBNP acima e abaixo de 2.000 ng/L na coorte escocesa. Além disso, em análises de sensibilidade adicionais, testamos se as correlações biomarcador-biomarcador eram semelhantes entre pacientes com ICFER da coorte europeia e pacientes com ICFER que foram excluídos com base nos valores ausentes de NT-proBNP ou valores de NT-proBNP abaixo do ponto de corte de 2.000 ng/L em nossa coorte europeia. Por fim, como uma análise de sensibilidade adicional, repetimos nossas análises em pacientes com ICFER, ICPEI ou ICPEP incluída apenas em pacientes ambulatoriais e internados. Para



explorar se a realização de análises de correlação era adequada para nossas análises de rede, comparamos os valores de R2 com os valores de informação mútua de acordo com Steuer et al. (23). Devido à diferença em n da ICFER, ICPEI e ICPEP, as correlações retidas após o ponto de corte do valor de p tinham uma média R2 menor em comparação com as correlações retidas na ICPEI e ICPEP ([Figura On-line 1](#)). Para tornar as redes de correlação comparáveis, um corte adicional foi aplicado, baseado na força de correlação (R2). Para ajustar o parâmetro de corte, optou-se pelo ponto de corte mais baixo que reduziu a relação entre o tamanho amostral e o R2, mantendo ainda um número razoável de correlações. [A Figura On-line 2](#) mostra a relação entre o número de correlações e o tamanho amostral para 6 pontos de corte diferentes de R2. Com base nessas observações, um ponto de corte de R2 >0,2 foi escolhido. A seguir, identificamos correlações únicas entre biomarcadores para ICFER e ICPEP, que não mostraram sobreposição com ICPEI e enriqueceram-nas, utilizando interações de proteína baseadas em conhecimento de uma lista abrangente de fontes ([Tabela On-line 3](#)). Em seguida, realizamos uma análise de super-representação do via para examinar as vias super-representadas em ICFER e ICPEP.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS BASAIS. As características basais são apresentadas em [Tabela 1](#). No geral, os pacientes



tinham uma idade média de $73,7 \pm 10,7$ anos, e 34,2% eram mulheres. De um total de 1.544 pacientes, 718 (47%) tinham ICFER, 395 (26%) tinham ICPEI, e 431 (28%) tinham ICPEP. Com o aumento da FEVE, os pacientes eram mais velhos; eram mais frequentemente mulheres; tiveram maiores taxas de diabetes, doença

pulmonar obstrutiva crônica, hipertensão e fibrilação atrial na eletrocardiografia; foram menos frequentemente em IECA/BRA e antagonistas dos receptores de mineralocorticoides; e tinham níveis mais baixos de NT-proBNP.

Os pacientes da coorte europeia apresentaram maiores níveis de NT-proBNP (5.122 ng/L em comparação a 1.334 ng/L); outras características eram geralmente comparáveis (Tabela On-line 4). As diferenças entre pacientes de acordo com os estratos da FEVE na coorte europeia são apresentadas na Tabela On-line 5.

ANÁLISE DE REDE. Para investigar as diferenças nos perfis de biomarcadores entre ICFER e ICPEP, foram extraídas correlações pareadas que passaram um ponto de corte do valor *p* corrigido para comparações múltiplas. Não encontramos valores elevados de *R*² com baixos valores de informação mútua, o que sugere que as análises de correlação de Pearson são adequadas (Figura On-line 3). Estudamos a correlação única para ICFER e ICPEP, que não mostrou sobreposição a ICPEI. Essas comparações pareadas refletem potenciais proteínas em interação dentro de ICFER e ICPEP. No total, 65 correlações de biomarcadores passaram o ponto de corte do valor de *p* em ICFER, ICPEI e ICPEP em ambas as coortes escocesa e europeia (Figura 1). Dessas, 45 correlações de biomarcadores passaram o ponto de corte do valor *p* em ICFER e poderiam ser validadas com sucesso na coorte europeia. Das 45 correlações significativas, 8 foram únicas para ICFER apenas (Figura 1). Pacientes com ICPEP mostraram 40 correlações significativas que poderiam ser validadas com sucesso; do total de 40 correlações, 6 eram únicas para ICPEP (Figura 1). Houve considerável sobreposição entre ICFER, ICPEI e ICPEP com um total de 27 correlações significativas que foram compartilhadas. Nas análises de sensibilidade, as correlações biomarcador-biomarcador foram independentes do período da ecocardiografia e foram semelhantes em ambos os pacientes com níveis de NT-proBNP abaixo e acima de 2.000 ng/L. Além disso, descobrimos que as correlações biomarcador-biomarcador foram semelhantes em pacientes com ICFER que foram excluídos da coorte europeia devido à falta de valores de NT-proBNP ou valores de NT-proBNP abaixo de 2.000 ng/L em comparação com pacientes com ICFER incluídos. Por fim, análises de sensibilidade restritas a pacientes internados ou ambulatoriais não afetaram nossos resultados.

Os resultados da análise de rede para ICFER e ICPEP são apresentados nas Figuras 2 e 3. O tamanho do nó (*hub*) está relacionado à centralidade e importância do *hub* na rede particular. Em outras palavras, os biomarcadores que formam grandes *hubs* dentro de uma rede podem ser considerados biologicamente mais

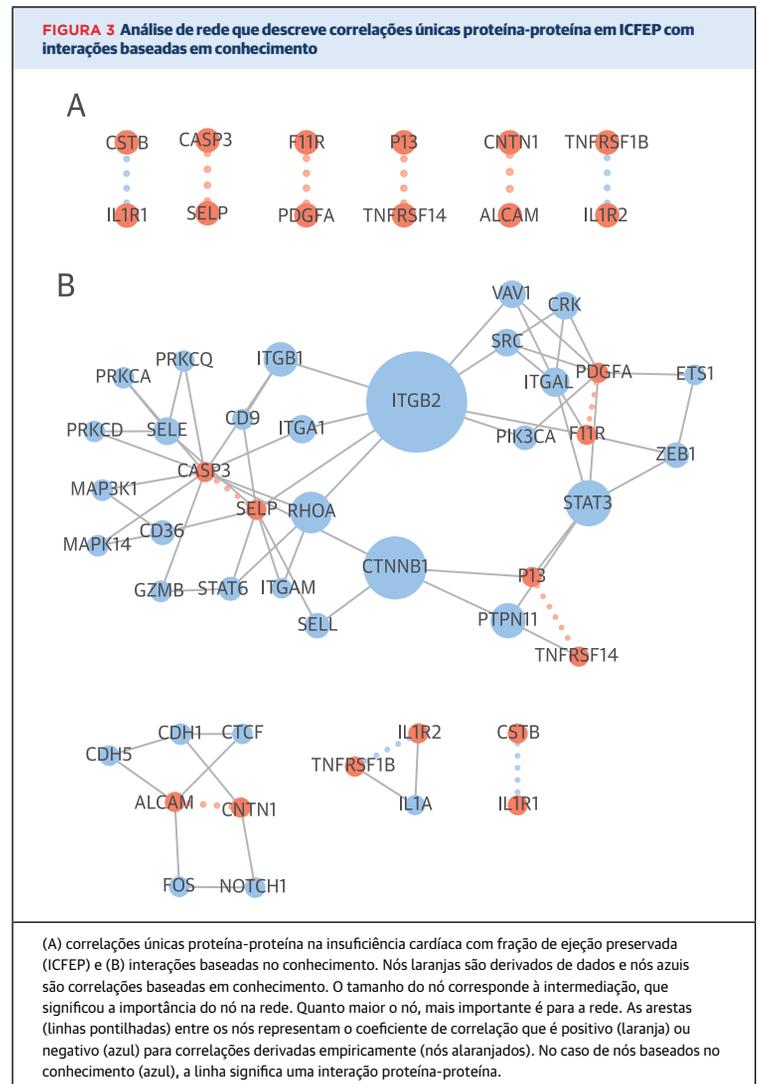
importantes em comparação com os biomarcadores que são *hubs* menores. A análise de rede mostrou que os principais centros de ICFER eram NT-proBNP, fator de diferenciação de crescimento (FDC)-15 e receptor de interleucina 1 tipo 1 (IL1RL1) (Figura 2A). Na ICFEP, não foram observados *hubs* claros entre as correlações únicas nos biomarcadores medidos (Figura 3A).

ENRIQUECIMENTO BASEADO EM CONHECIMENTO DA ANÁLISE DE REDE. Nós enriquecemos as redes encontradas experimentalmente com proteína-proteína associada com base em vários bancos de dados independentes, conforme descrito no Apêndice On-line. Ao incluir a análise de dados baseada em conhecimento, o fator de transcrição dependente de AMP cíclico ativando o fator de transcrição 2 (ATF2) tornou-se um *hub* adicional em ICFER (Figura 2B). Ao adicionar interações baseadas em conhecimento às redes de biomarcadores em ICFEP, a integrina subunidade beta 2 (ITGB2) e a beta-1 catenina tornaram-se *hubs* proeminentes na ICFEP (Figura 3B). Nas redes enriquecidas de ICFEP, descobrimos que o receptor de plasminogênio uroquinase, o transdutor de sinal e o ativador da transcrição 1, o fator de transcrição AP-1 e o IL-1B eram possíveis *hubs* (Figura On-line 4).

CONVERSÃO EM VIAS BIOLÓGICAS. As proteínas encontradas em nossa análise de rede, que foi enriquecida pelo conhecimento existente sobre as interações de biomarcadores, foram traduzidas em vias biológicas que eram tipicamente relacionadas a ICFER e ICFEP (Figura 4). As 10 vias mais representadas na ICFER foram caracterizadas por processos relacionados à atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA, fosforilação de peptidil-serina, processos metabólicos de proteínas celulares, bem como a regulação em processos biossintéticos de óxido nítrico. Em contraste, as 10 vias super-representadas em pacientes com ICFEP foram caracterizadas por processos inflamatórios, incluindo resposta a citocinas, organização da matriz extracelular, bem como resposta a lipopolissacarídeos e inflamação. Na ICFEI, as 10 vias reguladas para cima foram relacionadas à degranulação de neutrófilos, migração de leucócitos e atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA (Figura On-line 5).

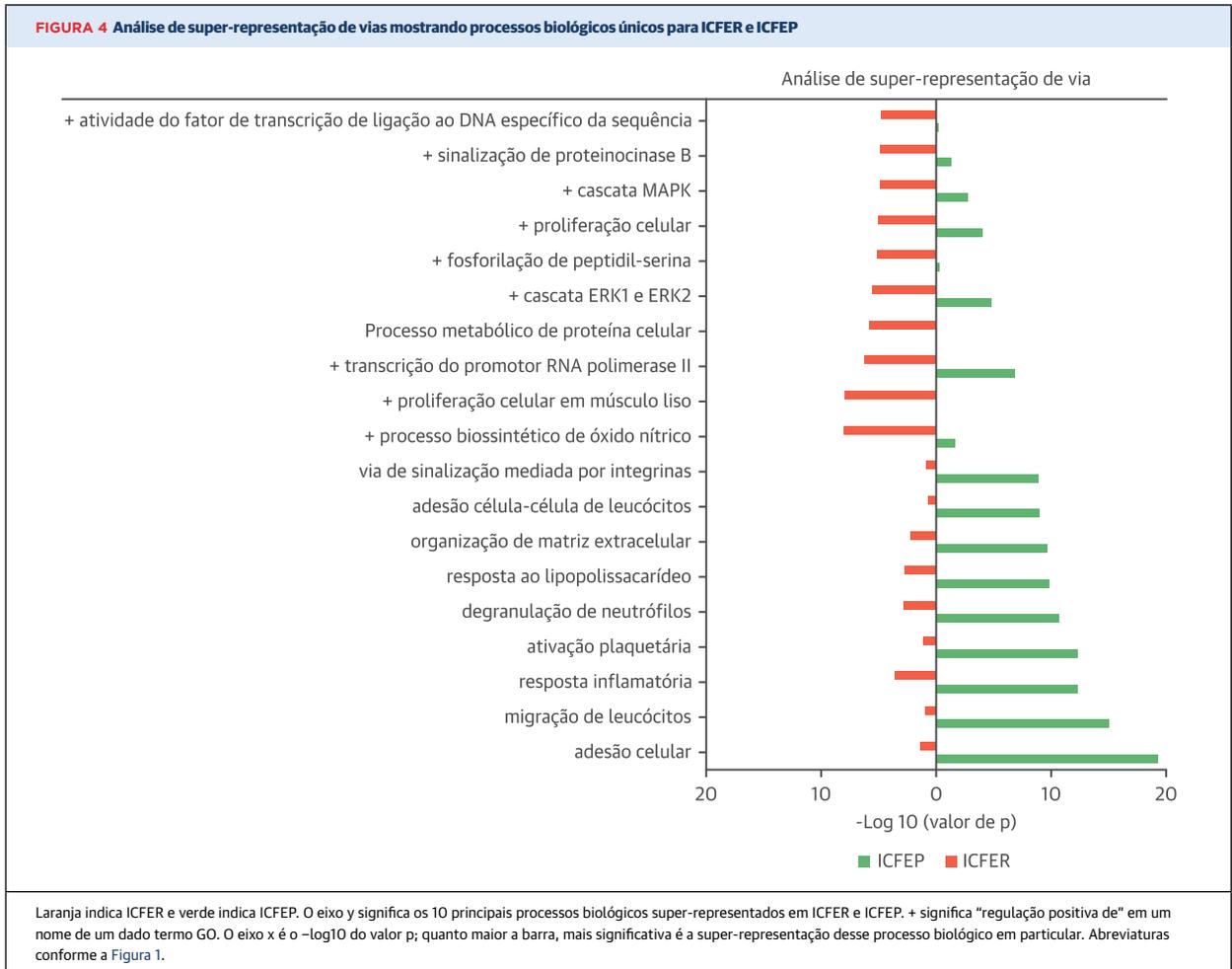
DISCUSSÃO

De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo utilizando uma abordagem abrangente de análise de rede baseada em conhecimento para caracterizar as diferenças nas assinaturas de biomarcadores circulantes entre os pacientes com ICFER, ICFEI e ICFEP. No geral, houve uma sobreposição importante entre as correlações proteína-proteína em ICFER, ICFEI e ICFEP. Isso



sugere que uma grande proporção dessas correlações proteína-proteína pertence a vias comuns relacionadas à IC. No entanto, também encontramos diferenças distintas, que são resumidas em Ilustração Central. Nossos achados mostram que as vias especificamente super-reguladas para cima em pacientes com ICFER estavam relacionadas ao metabolismo e crescimento celular. As vias que foram especificamente super-reguladas em pacientes com ICFEP estavam relacionadas à inflamação e à reorganização da matriz extracelular.

A análise de rede de correlações únicas de biomarcadores em ICFER mostrou que o NT-proBNP, o FDC-15 e o IL1RL1 eram *hubs* centrais. O NT-proBNP está associado a estiramento cardíaco e foi previamente identificado como um *hub* específico na análise de rede na ICFER em 2 estudos independentes (9, 10). O FDC-15 já foi anteriormente associado a desfechos mais adversos na ICFER (24, 25). Além disso, os resultados do nosso



estudo mostram que o IL1RL1 é um *hub* potencial em pacientes com ICFER. Em pacientes com ICPEI, a IL1-B era um *hub*, sugerindo que a inibição da IL1 nesses pacientes poderia valer ser investigada. A análise de rede em ICPEP mostrou uma combinação mais difusa de correlações de biomarcadores sem *hubs* centrais específicos. Isso está de acordo com estudos anteriores, que sugerem que a ICPEP pode ser mais heterogênea do que a ICFER (26, 27). A maioria dos biomarcadores encontrada na ICPEP estava relacionada à inflamação, que é uma característica da fisiopatologia subjacente da ICPEP (7). Depois de adicionar interações proteína-proteína baseadas em conhecimento para nossas redes experimentalmente encontradas, observamos que o ATF2 era um importante *hub* adicional na ICFER. O ATF2 é uma proteína envolvida na hipertrofia cardíaca, desencadeado pelo TGF- β . Um estudo experimental anterior descobriu que a supressão do ATF2 atenuava a resposta hipertrófica do ventrículo esquerdo (28). Na ICPEP, observamos que o ITGB2 e a beta catenina eram

hubs importantes. Estudos anteriores mostram que o ITGB2 está envolvido em processos inflamatórios crônicos e disfunção endotelial (29). Além disso, um estudo experimental mostrou que os níveis de beta catenina foram aumentados em ratos dahl sensíveis ao sal quando desenvolveram um fenótipo ICPEP (30). Isso sugere que a beta catenina em particular pode ser uma proteína de interesse na ICPEP. O enriquecimento baseado em conhecimento de nossas redes foi realizado com dados combinados de vários repositórios bioinformáticos disponíveis publicamente, que juntos fornecem uma fonte de dados abrangente sobre todas as interações proteína-proteína conhecidas. A combinação desses recursos reduziu o viés geral em nosso enriquecimento. No entanto, sem o enriquecimento baseado no conhecimento, o ICPEP não mostrou *hubs* significativos. Isso sugere que a fisiopatologia geral da ICPEP é mais heterogênea em comparação com a ICFER.

O último passo em nossa análise foi realizar uma análise de super-representação de via das proteínas

ILUSTRAÇÃO CENTRAL Biomarcadores na insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida em comparação à preservada

Insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida

Processos biológicos:

- Regulação da transcrição de ligação ao DNA específica da sequência
- Proliferação celular de músculo liso
- Biossíntese de óxido nítrico

Marcadores específicos:

- Fator de transcrição dependente de AMP, ativando o fator de transcrição 2
- Peptídeo natriurético do tipo pro-B N-terminal
- Fator de diferenciação de crescimento 15 (FDC-15)
- Receptor de interleucina 1 tipo 1

Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada

Processos biológicos:

- Adesão celular
- Migração de leucócitos
- Resposta inflamatória
- Degranulação de neutrófilos
- Vias de sinalização mediadas por integrinas
- Organização de matriz extracelular

Marcadores específicos:

- Integrina subunidade beta 2
- Beta 1 catenina

Tromp, J. et al. J Am Coll Cardiol. 2018; 72(10):1081-1090

encontradas em nossas redes enriquecidas por conhecimento. Os resultados mostraram que, em ICFER, os processos biológicos estavam relacionados com a ligação ao DNA específico da sequência, a fosforilação da peptidil-serina e a proliferação de células do músculo liso. Em conjunto, esses processos estão relacionados à proliferação celular. Além disso, as vias biológicas relacionadas à sinalização da proteinocinase B e à cascata da MAPK também foram enriquecidas. Tanto a sinalização da proteinocinase B quanto a MAPK estão relacionadas à proliferação celular e ao aumento do metabolismo (31, 32, 33). Em contraste, os processos biológicos na ICPEP estão relacionados à inflamação, sinalização da integrina e organização da matriz extracelular (33). Esses dados confirmam achados anteriores em relação a ICPEP, mas também permitem que estudos futuros se concentrem na interação proteína-proteína em certas vias existentes, como sinalização mediada por integrina e organização da matriz extracelular (7). As vias biológicas que foram super-reguladas em pacientes com ICPEI estavam entre pacientes com ICFER e ICPEP. Isso está de acordo com um estudo anterior que sugeriu que os perfis de biomarcadores de pacientes com ICPEI estão entre pacientes com ICFER e ICPEP (34). Nossa abordagem

pode ser usada para identificar pacientes com ICPEI com um perfil de biomarcador semelhante a ICFER, que poderiam gerar mais benefícios do tratamento direcionado por diretrizes.

Este estudo tem várias implicações clínicas. Primeiro, os resultados deste estudo fornecem um contexto biológico para a presença de síndromes claramente distintas, o que pode potencialmente explicar a resposta divergente à terapia da IC. Em segundo lugar, os processos de resposta ao estresse cardíaco e a proliferação celular são enriquecidos em pacientes com ICFER, enquanto os processos relacionados à inflamação são enriquecidos em ICPEP. Particularmente, o ATF2 poderia ser um alvo novo de tratamento em potencial de ICFER, enquanto ITGB2 e beta catenina poderiam ser novos alvos de tratamento para ICPEP; essa possibilidade merece um estudo mais aprofundado.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO. Primeiro, a ecocardiografia não foi realizada na inclusão. No entanto, a análise de sensibilidade mostrou que o período da ecocardiografia não influenciou os níveis de biomarcadores em ICFER e ICPEP. Além disso, fomos capazes de validar nossos achados em uma coorte independente, reduzindo significativamente o efeito potencial dessa limitação.

Infelizmente, faltavam valores para o NT-proBNP em nossa coorte de validação. Isso pode ter introduzido um viés potencial em nossa coorte europeia, porque esses pacientes tiveram que ser excluídos. Em contraste com nossa coorte escocesa, nossa coorte europeia teve pacientes com ICFER e ICFEP com um valor de NT-proBNP >2.000 ng/L. Essa é uma limitação, porque pode aumentar o erro do tipo II. No entanto, essa é também uma força particular deste estudo porque as correlações proteína-proteína, bem como as diferenças nos níveis de biomarcadores encontradas para ICFER e ICFEP neste estudo são relativamente estáveis em todo o espectro de gravidade da doença. Por último, os pacientes em BIostat-CHF foram suboptimamente tratados, o que pode introduzir um viés potencial.

CONCLUSÕES

Vias biológicas únicas para ICFER estão associadas a aumento do metabolismo e hipertrofia celular. Um alvo novo em potencial para ICFER é o ATF2. Vias biológicas únicas para ICFEP estão relacionadas à inflamação, degranulação de neutrófilos e sinalização de integrinas. Novos alvos de tratamento em potencial na ICFEP são IGTB2 e beta catenina. Essas profundas diferenças nos

processos biológicos subjacentes enfatizam a necessidade de programas distintos de desenvolvimento de medicamentos na ICFER e ICFEP.

AGRADECIMENTO. Os autores agradecem a M.F.G.A Hoes, do University Medical Centre Groningen, pela ajuda com a figura conceitual.

PERSPECTIVAS

COMPETÊNCIA NO CONHECIMENTO MÉDICO. As principais diferenças nos processos fisiopatológicos se distinguem na ICFER e ICFEP. Os pacientes com ICFER exibem atividade de fator de transcrição de ligação ao DNA, metabolismo de proteína celular e regulação do óxido nítrico, enquanto a ICFEP está associada a resposta de citocinas, organização da matriz extracelular e inflamação.

PANORAMA TRANSLACIONAL. O tratamento de pacientes com ICFEP deve focar na inflamação como um mecanismo fisiopatológico central, e futuras análises de rede baseadas em biomarcadores podem identificar mecanismos adicionais da doença.

REFERÊNCIAS

1. P. Ponikowski, A.A. Voors, S.D. Anker, et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*, 18 (2016), pp. 891-975.
2. J.J.V. McMurray, M. Packer, A.S. Desai, et al. Angiotensin-nephrilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*, 371 (2014), pp. 993-1004.
3. J.J. McMurray, J. Östergren, K. Swedberg, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet*, 362 (2003), pp. 767-771.
4. B.M. Massie, P.E. Carson, J.J. McMurray, et al. Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med*, 359 (2008), pp. 2456-2467.
5. B. Pitt, M.A. Pfeffer, S.F. Assmann, et al. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*, 370 (2014), pp. 1383-1392.
6. S. Yusuf, M.A. Pfeffer, K. Swedberg, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet*, 362 (2003), pp. 777-781.
7. W.J. Paulus, C. Tschoepe. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*, 62 (2013), pp. 263-271.
8. J. Tromp, A. Van Der Pol, I.T. Klip, et al. Fibrosis marker syndecan-1 and outcome in patients with heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail*, 7 (2014), pp. 457-462.
9. J. Tromp, M.A.F. Khan, R.J. Mentz, et al. Biomarker profiles of acute heart failure patients with a mid-range ejection fraction. *J Am Coll Cardiol HF*, 5 (2017), pp. 507-517.
10. J. Tromp, M.A.F. Khan, I.T. Klip, et al. Biomarker profiles in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *J Am Heart Assoc*, 6 (2017), p. e003989.
11. S. Sanders-van Wijk, V. van Empel, N. Davarzani, et al. Circulating biomarkers of distinct pathophysiological pathways in heart failure with preserved vs. reduced left ventricular ejection fraction. *Eur J Heart Fail*, 17 (2015), pp. 1006-1014.
12. B.A. Borlaug. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*, 11 (2014), pp. 507-515.
13. A. Sharma, B.G. Demissei, J. Tromp, et al. A network analysis to compare biomarker profiles in patients with and without diabetes mellitus in acute heart failure. *Eur J Heart Fail*, 19 (2017), pp. 1310-1320.
14. J. Felgueiras, J.V. Silva, M. Fardilha. Adding biological meaning to human protein-protein interactions identified by yeast two-hybrid screenings: a guide through bioinformatics tools. *J Proteomics*, 171 (2018), pp. 127-140.
15. G. Alanis-Lobato, M.A. Andrade-Navarro, M.H. Schaefer. HIPPIE v2.0: enhancing meaningfulness and reliability of protein-protein interaction networks. *Nucleic Acids Res*, 45 (2017), pp. D408-D414.
16. A.A. Voors, S.D. Anker, J.G. Cleland, et al. A systems BIOlogy Study to Tailored Treatment in Chronic Heart Failure: rationale, design, and baseline characteristics of BIostat-CHF. *Eur J Heart Fail*, 18 (2016), pp. 716-726.
17. W. Ouwerkerk, A.A. Voors, S.D. Anker, et al. Determinants and clinical outcome of uptitration of ACE-inhibitors and beta-blockers in patients with heart failure: a prospective European study. *Eur Heart J*, 38 (2017), pp. 1883-1890.
18. A. Bayes-Genis, A.A. Voors, F. Zannad, J.L. Januzzi, A. Mark Richards, J. Diez. Transitioning from usual care to biomarker-based personalized and precision medicine in heart failure: call for action. *Eur Heart J*, 133 (2017), pp. 226-231.
19. J.P. Ferreira, P. Rossignol, J.-L. Machu, et al. Mineralocorticoid receptor antagonist pattern of use in heart failure with reduced ejection fraction: findings from BIostat-CHF. *Eur J Heart Fail*, 19 (2017), pp. 1284-1293.
20. A.A. Voors, W. Ouwerkerk, F. Zannad, et al. Development and validation of multivariable models to predict mortality and hospitalization in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*, 19 (2017), pp. 627-634.

21. P. Ponikowski, A.A. Voors, S.D. Anker, et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*, 37 (2016), pp. 2129-2200.
22. E. Assarsson, M. Lundberg, G. Holmquist, et al. Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability. *PLoS One*, 9 (2014), p. e95192.
23. R. Steuer, J. Kurths, C.O. Daub, J. Weise, J. Selbig. The mutual information: detecting and evaluating dependencies between variables. *Bioinformatics*, 18 (2002), pp. S231-S240.
24. M.M.Y. Chan, R. Santhanakrishnan, J.P.C. Chong, et al. Growth differentiation factor 15 in heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction. *Eur J Heart Fail*, 18 (2016), pp. 81-88.
25. A. Sharma, S.R. Stevens, J. Lucas, et al. Utility of growth differentiation factor-15, a marker of oxidative stress and inflammation, in chronic heart failure: insights from the HF-ACTION study. *J Am Coll Cardiol HF*, 5 (2017), pp. 724-734.
26. S.J. Shah, D.H. Katz, S. Selvaraj, et al. Phenomapping for novel classification of heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*, 131 (2015), pp. 269-279.
27. D.P. Kao, J.D. Lewsey, I.S. Anand, et al. Characterization of subgroups of heart failure patients with preserved ejection fraction with possible implications for prognosis and treatment response. *Eur J Heart Fail*, 17 (2015), pp. 925-935.
28. J.Y. Lim, J.P. Sung, H.Y. Hwang, et al. TGF- β 1 induces cardiac hypertrophic responses via PKC-dependent ATF-2 activation. *J Mol Cell Cardiol*, 39 (2005), pp. 627-636.
29. A. Ducat, L. Doridot, R. Calicchio, et al. Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Sci Rep*, 6 (2016), p. 19196.
30. D. Kamimura, K. Uchino, T. Ishigami, M.E. Hall, S. Umemura. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ prevents development of heart failure with preserved ejection fraction; inhibition of wnt- β -catenin signaling as a possible mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol*, 68 (2016), pp. 155-161;
31. A.R. Wende, B.T. O'Neill, H. Bugger, et al. Enhanced cardiac Akt/protein kinase B signaling contributes to pathological cardiac hypertrophy in part by impairing mitochondrial function via transcriptional repression of mitochondrion-targeted nuclear genes. *Mol Cell Biol*, 35 (2015), pp. 831-846.
32. A. Plotnikov, E. Zehorai, S. Procaccia, R. Seger. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*, 1813 (2011), pp. 1619-1633.
33. S. Israeli-Rosenberg, A.M. Manso, H. Okada, R.S. Ross. Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circ Res*, 114 (2014), pp. 572-586.
34. J. Tromp, A.A. Voors, C.S.P. Lam. Heart failure with mid-range ejection fraction: causes and consequences. *Eur J Heart Fail*, 20 (2018), pp. 660-662.

PALAVRAS-CHAVE biomarcadores, IC-FEP, ICFER, análise de rede, fisiopatologia

APÊNDICE Para acesso a uma seção de Métodos expandida, bem como a figuras e tabelas suplementares, consulte a versão *on-line* deste artigo.