

**SILVIA D'ANDRETTA IGLÉZIAS**

**Endomiocardiofibrose : patologia e  
correlação clínica em material de  
ressecção cirúrgica**

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

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Thales de Brito

**SÃO PAULO**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Iglezias, Silvia D'Andretta

Endomiocardiofibrose : patologia e correlação clínica em material de ressecção cirúrgica / Silvia D'Andretta Iglezias. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Thales de Brito.

Descritores: 1.Fibrose endomiocárdica/patologia 2.Cardiomiopatia restritiva/patologia 3.Cardiomiopatia restritiva/etiologia 4.Imunoistoquímica 5.Patologia cirúrgica 6.Reação em cadeia da polimerase 7.Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa 8.Estudos retrospectivos

USP/FM/SBD-399/07

Ao meu marido, **José Carlos**, e às minhas filhas,

**Paola, Flávia e Thaís,**

pelo apoio e incentivo incondicionais.

## Meus sinceros agradecimentos

aos meus pais, **Ana Barini D'Andretta e Vicente D'Andretta**, pelo apoio e carinho que sempre estiveram presentes;

ao meu marido, **José Carlos Rossini Iglézias**, pela paciência e incentivo constantes;

ao **Prof. Dr. Thales de Brito**, a quem devo a orientação não só dessa tese mas também de minha formação profissional. Sua incansável participação, incentivo, entusiasmo e amizade me ajudaram superar os momentos difíceis dessa jornada;

ao **Dr. Luiz Alberto Benvenuti**, do Laboratório de Patologia do InCor, pela confiança, colaboração e participação irrestritas em todas as fases desse trabalho;

à **Dra. Vera Maria Cury Salemi** e ao **Dr. Felix José Alvarez Ramires**, do grupo de Miocardiopatias do InCor, pelo fornecimento dos dados clínicos dos pacientes e revisão de cineangiocoronariografias;

à **Dra. Silvia Vanessa Lourenço**, pelo fornecimento do material que deu início a essa tese;

ao grupo do **Prof. Dr. Gaetano Thiene**, do Laboratório de Patologia da Universidade de Medicina de Pádua, Itália, pela colaboração na pesquisa de agentes infecciosos;

à **Profa. Dra. Vera Demarchi Aiello**, do Laboratório de Patologia do InCor, pelas sugestões oportunas e revisão do texto;

a **Ana Maria Gonçalves da Silva**, do Laboratório de Imunopatologia do IMT, e **Márcia Martins Reis**, do Laboratório de Patologia do InCor, pela inestimável ajuda nas reações imunoistoquímicas;

a **Angelina Bilate** e **Michele Mesquita Soares Gomes**, do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do IMT, pela cooperação e ensinamentos técnicos;

a **Ana Luiza Barreiros Silveira**, do Museu de Patologia do Departamento de Patologia da FMUSP, pelo auxílio na documentação fotográfica;

aos funcionários e colegas do Laboratório de Patologia do InCor e aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia do IMT, pela colaboração e gentileza em tantos momentos;

à colega **Maria Inêz da Silveira Carneiro**, pelo apoio e amizade incondicionais;

à **minha filha Paola**, pela inestimável ajuda na revisão do texto;

às secretárias **Vera Lúcia Carvalho Noya** e **Liduvina da Silva Neto**, do Departamento de Patologia da FMUSP, pela cooperação e boa vontade em inúmeras ocasiões;

ao **Dr. Edmur Flavio Pastorelo** e aos colegas e funcionários da Fundação Oncocentro de São Paulo, pelo apoio e compreensão;

a todos aqueles que de alguma maneira colaboraram na realização dessa tese.

## Normalização Adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

# SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 Casuística .....	20
3.2 Métodos .....	21
3.2.1 Método imunistoquímico para identificação de colágenos tipos I, III e IV .....	22
3.2.2 Método imunistoquímico para caracterização de células inamatórias .....	23
3.2.3 Método imunistoquímico para detecção de linfáticos .....	25
3.2.4 Critérios para avaliação histológica do endocárdio.....	26
3.2.5 Critérios para avaliação histológica do miocárdio subendocárdico .....	32
3.2.6 Método para pesquisa de agentes infecciosos cardiotrópicos .....	33
3.2.7 Critérios para revisão de dados clínicos e de exames subsidiários.....	40
3.2.8 Correlação entre dados clínicos e anatomopatológicos .....	41
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
4.1 Análise do endocárdio.....	45
4.1.1 Componente fibroso endocárdico.....	45
4.1.2 Componente inflamatório endocárdico .....	51
4.1.3 Componente vascular endocárdico .....	55
4.1.4 Calcificação e trombose mural endocárdica .....	61

4.2	Análise do miocárdio subendocárdico.....	63
4.3	Pesquisa de agentes infecciosos cardiotrópicos.....	69
4.4	Análise de dados clínicos e de exames subsidiários.....	71
4.4.1	Análise de prontuários.....	71
4.4.2	Análise de cineangiocoronariografias.....	76
4.5	Correlações clinicopatológicas.....	77
4.5.1	Características clinicopatológicas do 1º subgrupo.....	77
4.5.2	Características clinicopatológicas do 2º subgrupo.....	79
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
5.1	Fibrose endocárdica.....	83
5.2	Alterações inflamatórias do endocárdio.....	88
5.3	Alterações vasculares do endocárdio.....	95
5.4	Alterações do miocárdio subendocárdico.....	99
5.5	Patogenia da EMF.....	99
5.5.1	EMF e agentes infecciosos cardiotrópicos.....	102
5.6	Considerações finais.....	107
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>111</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>123</b>

Apêndice

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Anticorpos utilizados na identificação dos colágenos .....	23
Tabela 2 -	Anticorpos utilizados na marcação de células inflamatórias.....	24
Tabela 3 -	“Primers” “sense e antisense” utilizados em RT-PCR e/ou PCR dos genes de 3-GPDH, da $\beta$ globina e dos diversos microorganismos pesquisados, com temperatura de anelamento e tamanho do fragmento gerado após amplificação.....	38
Tabela 4 -	Contagem de células inflamatórias marcadas por imunistoquímica por unidade de área no endocárdio (mm <sup>2</sup> )...	54
Tabela 5 -	Proporção entre o número de linfáticos marcados por imunistoquímica e o número de vasos no endocárdio, em porcentagem.....	59
Tabela 6 -	Contagem de células inflamatórias marcadas por imunistoquímica por unidade de área do miocárdio (mm <sup>2</sup> ).....	67
Tabela 7 -	Correlação entre o número de pacientes com dor precordial e o aparecimento de “blush” na cineangiocoronariografia .....	77
Tabela 8 -	Dados quantitativos (média e desvio padrão) dos grupos de pacientes com e sem “blush” à cineangiocoronariografia .....	78
Tabela 9 -	Dados quantitativos (média e desvio padrão) dos grupos de pacientes com e sem dor precordial .....	79
Tabela 10 -	Características clínicopatológicas dos pacientes do 2º subgrupo.....	80
Tabela 11 -	Resumo das características clínicopatológicas dos pacientes positivos e negativos para agentes infecciosos cardiotrópicos (n=12).....	80

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Imagem de campo microscópico acoplado a sistema de captura de imagem com gradeado de 221 pontos .....	31
<b>Figura 2</b> - Aspecto macroscópico da placa fibrosa endocárdica em ponta de ventrículo esquerdo, poupando a via de saída ventricular, as valvas aórtica e mitral.....	44
<b>Figura 3</b> - Aspecto histológico da faixa fibrosa densa e hialina, escassamente celular.....	46
<b>Figura 4</b> - Aspecto histológico da faixa fibrosa corada pelo tricômico de Masson. As áreas de fibrose hialina assumem tonalidade alaranjada.....	46
<b>Figura 5</b> - Acentuada elastose da faixa endocárdica, caracterizada por faixas irregulares de fibras elásticas sobrepostas, coradas em preto.....	47
<b>Figura 6</b> - Detalhe histológico de fibras reticulínicas coradas em negro (colágeno III), entrelaçadas e misturadas a fibras acinzentadas de colágeno I.....	48
<b>Figura 7</b> - Fibras colágenas marcadas por reação imunoistoquímica (DAB) para colágeno I.....	50
<b>Figura 8</b> - Fibras colágenas marcadas por reação imunoistoquímica (DAB) para colágeno III.....	50
<b>Figura 9</b> - Fibras colágenas marcadas por reação imunoistoquímica (DAB) para colágeno IV, evidente apenas em torno de vasos....	51
<b>Figura 10</b> - Infiltrado inflamatório focal em torno de vasos na faixa de fibrose endocárdica. ....	52
<b>Figura 11</b> - Marcação imunoistoquímica para macrófagos no infiltrado inflamatório endocárdico .....	52
<b>Figura 12</b> - Marcação imunoistoquímica para linfócitos T no infiltrado inflamatório endocárdico .....	53
<b>Figura 13</b> - Marcação imunoistoquímica para linfócitos B no infiltrado inflamatório endocárdico .....	53
<b>Figura 14</b> - Vasos de parede espessa na profundidade da faixa fibrosa endocárdica .....	56

<b>Figura 15</b> - Vaso na faixa fibrosa endocárdica permeando o miocárdio em aparente conexão com a rede coronariana intramiocárdica.....	56
<b>Figura 16</b> - Artéria de pequeno calibre com espessamento fibroso intimal irregular excêntrico ao lado de vaso provavelmente venoso.....	58
<b>Figura 17</b> - Artéria de médio calibre com banda fibrosa intraluminal, sugestiva de trombose recanalizada; acima nota-se vaso provavelmente arterial com espessamento fibroso da média .....	58
<b>Figura 18</b> - Faixa fibrosa endocárdica com proliferação de vasos pequeno calibre e infiltrado inflamatório moderado .....	60
<b>Figura 19</b> - Endotélio de linfáticos marcado pela podoplanina (D2-40/fosfatase alcalina) na faixa fibrosa endocárdica .....	60
<b>Figura 20</b> - Calcificação grosseira na espessura do endocárdio .....	62
<b>Figura 21</b> - Trombo recente de fibrina aderido à faixa fibrosa .....	62
<b>Figura 22</b> - Faixa fibrosa endocárdica permeando o miocárdio.....	64
<b>Figura 23</b> - Granuloma epitelióide mal formado na interface endocárdio-miocárdio, com eosinófilos e poucas células epitelióides.....	65
<b>Figura 24</b> - Agregado linfóide na interface endocárdio-miocárdio.....	65
<b>Figura 25</b> - Aspecto histológico do miocárdio subjacente à faixa fibrosa endocárdica, com discreto alargamento intersticial e infiltrado inflamatório leve .....	66
<b>Figura 26</b> - Linfáticos marcados pela podoplanina (fosfatase alcalina) permeando o miocárdio subjacente à fibrose endocárdica .....	68
<b>Figura 27</b> - Produto de amplificação de RT-PCR para citomegalovirus (CMV) identificado por eletroforese em gel agarose corado com brometo de etídeo mostrando positividade na coluna 8, 275 bp.....	70
<b>Figuras 28 e 29</b> - Cineangiocoronariografia em oblíqua anterior direita mostrando “blush” vascular no território distal do ramo interventricular anterior da coronária esquerda (seta) de paciente com EMF isolada em ventrículo direito. A mesma imagem é vista em branco e preto e em colorido .....	76

## RESUMO

Iglezias SD. *Endomiocardiofibrose: patologia e correlação clínica em material de ressecção cirúrgica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 137p.

**INTRODUÇÃO:** A endomiocardiofibrose (EMF) é uma miocardiopatia de padrão restritivo de etiologia desconhecida, prevalente em regiões tropicais. Caracteriza-se por espessamento fibroso do endocárdio e miocárdio subjacente, comprometendo ponta e via de entrada de um ou de ambos os ventrículos. Sua etiopatogenia é pouco conhecida e muitos autores a associam à doença infecciosa cardíaca ou sistêmica, à eosinofilia prévia e/ou à carência nutricional. O prognóstico em geral é grave e a ressecção cirúrgica da lesão é indicada aos pacientes com insuficiência cardíaca refratária a tratamento clínico, em classe funcional III ou IV (NYHA). Os estudos anatomopatológicos até o momento foram realizados em material de autópsia ou de biópsia endomiocárdica. **OBJETIVOS:** Este estudo retrospectivo se propõe a (1) descrever os três aspectos morfológicos da lesão endocárdica (fibrose, infiltrado inflamatório e vasos) utilizando microscopia óptica comum e técnicas imunoistoquímicas, assim como correlacioná-los aos dados clínicos, laboratoriais e de imagem dos pacientes (2) comparar os aspectos morfológicos de espécimes de ressecção cirúrgica com os de autópsia a fim de verificar se os primeiros podem ser empregados para diagnóstico histológico da doença; e (3) discutir a patogenia da EMF e realizar pesquisa de agentes infecciosos cardiotrópicos em amostra endomiocárdica incluída em parafina por técnica de biologia molecular. **MÉTODOS:** Foram utilizadas amostras de ressecção cirúrgica endocárdica incluídas em parafina provenientes de 31 pacientes com diagnóstico clínico e cineangiocardiógráfico de EMF, operados no InCor entre 1991 e 2005. As amostras foram coradas por técnicas convencionais (HE, tricômico de Masson, Verhoeff e reticulina) e submetidas a reações imunoistoquímicas para fibras colágenas tipo I, III e IV, para células inflamatórias (CD3, CD20, CD68) e para endotélio de linfáticos (D2-40). Amostras de nove corações de autópsia de pacientes com o mesmo diagnóstico serviram de controle positivo da doença. A pesquisa de agentes infecciosos foi feita por reação de cadeia de polimerase e reação de transcrição reversa de cadeia de polimerase (PCR e RT-PCR) em amostras endomiocárdicas incluídas em parafina, para *T. gondii* e para vírus cardiotrópicos (enterovirus, adenovirus, influenza A e B, citomegalovirus, parvovirus B19 e herpes simples). Para identificar alterações vasculares intramiocárdicas, procedeu-se à revisão de prontuários clínicos dos pacientes e de 16 cineangiocoronariografias. **RESULTADOS:** Foi observado intenso espessamento endocárdico ventricular à custa de fibrose hialina superficial escassamente celular, com fibras colágenas tipos I e III, predominando o tipo I sobre o III. O colágeno tipo IV foi identificado na membrana basal de vasos. Na porção profunda da lesão endocárdica observou-se escasso infiltrado inflamatório crônico com macrófagos, linfócitos T e B em menor número. O infiltrado estava

distribuído ao redor de vasos proliferados com intensas alterações estruturais na parede e com participação de linfáticos. No miocárdio superficial identificou-se miocardite “borderline” (critério de “Dallas”). Foram obtidos ácidos nucléicos em quantidade suficiente para a reação de PCR/RT-PCR em 12/36 (33%) amostras. Genomas de agentes infecciosos foram identificados em 6/12 (50%) pacientes. Dois casos foram positivos para enterovirus (EV), dois para citomegalovirus (CMV), um para ambos (CMV e EV) e um para *T. gondii*. Não foram observadas diferenças histopatológicas entre as amostras cirúrgicas e as de autópsia. Foram detectadas alterações vasculares à cineangiocoronariografia em 9/16 (56%) pacientes. Não houve correlação anatomoclínica definida entre os múltiplos dados comparados. CONCLUSÕES: Os resultados indicam que na EMF ocorre processo inflamatório crônico mantido por rede vascular anômala rica em linfáticos localizada na profundidade da lesão endocárdica. A rede vascular provavelmente contribui para a manutenção da placa fibrótica e deve ser considerada como fator importante na patogenia da doença. O diagnóstico anatomopatológico pode ser feito com segurança em material de ressecção cirúrgica. A análise molecular do endomiocárdio possibilitou a detecção de alta incidência de genomas de agentes infecciosos cardiotrópicos. Seu significado, contudo, permanece controverso.

Descritores: 1.Fibrose endomiocárdica/patologia; 2.Cardiomiopatia restritiva/patologia; 3.Cardiomiopatia restritiva/etiologia; 4.Imunoistoquímica; 5.Patologia cirúrgica; 6.Reação em cadeia da polimerase; 7.Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa; 8.Estudos retrospectivos.

## SUMMARY

Iglezias SD. *Endomyocardial fibrosis: pathological findings in surgical specimens and clinicopathological correlation* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 137p.

**BACKGROUND:** Endomyocardial fibrosis (EMF) is a restrictive cardiomyopathy of unknown etiology prevalent in tropical regions. The disease involves the inflow tract and apex of either one or both ventricles and is characterized by a fibrous thickening of the endocardium and the underlying myocardium. Although its etiology remains unknown, most authors believe it could be related to systemic or heart infection/parasitism, previous blood eosinophilia or malnutrition. Surgical resection of the thickened endocardium is recommended to patients with advanced heart failure of functional class III or IV, New York Heart Association (NYHA). The gross and histological features of the heart have been comprehensively studied in autopsies and endomyocardial biopsies. Studies in surgical samples, however, are still lacking. **AIMS:** This study was conducted to evaluate: (1) the histomorphological changes of EMF as seen in surgical specimens by means of routine histological and immunohistochemical methods in an attempt to correlate them with clinical symptoms and coronary angiographic features; (2) to compare histological data between surgical and autopsy samples, and (3) to discuss probable pathogenetic mechanisms of the disease, as well as to investigate cardiotropic infective agents by means of molecular analysis of endomyocardial surgical samples. **METHODS:** We collected all available clinical records and endomyocardial surgical samples from 31 patients with EMF who had been submitted to surgery between 1991 and 2005 at InCor. The diagnosis was based on clinical, hemodynamic and angiocardiographic findings. The surgical samples were fixed in 10% formalin, submitted to standard processing, and stained with H&E, Masson's trichrome, reticulin and elastic stains. Immunohistochemical methods were employed to detect collagen fibers type I, III, and IV, inflammatory cells (CD3, CD20, CD68) and lymphatic vessels' endothelium (D2-40). Nine samples from autopsied hearts of EMF patients were used as a positive control group. Polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription-PCR were used retrospectively to search for genomes of *T. gondii* and cardiotropic viruses (enterovirus, adenovirus, influenza A e B, cytomegalovirus, parvovirus B19 and herpes simplex) in the surgical material. All clinical and surgical reports were reviewed, including follow-ups and 16 coronary cineangiocardiographies. **RESULTS:** Ventricular endocardium was thickened by superficial acellular hyaline collagen fibers type I and III. Type-IV collagen fibers were seen only around vessels. Focal chronic inflammatory infiltrate with T-lymphocytes, macrophages and a few B-lymphocytes was seen around blood vessels with a peculiar pattern of vascular changes and numerous lymphatics within the endocardium. The superficial myocardium showed borderline myocarditis (Dallas criteria). RNA and DNA were

successfully extracted from 12/36 samples. Infective agents were detected in 6/12 (50%) patients; two of them were positive for cytomegalovirus (CMV), two for enterovirus (EV), one for both (CMV and EV) and one for *T. gondii*. No histopathological differences between surgical samples and autopsy fragments were observed. Vascular blush or neovascularity was detected in 9 of the 16 coronary cineangiographies reviewed. Clinicopathologic characteristics are associated neither with infective genomes in the endocardium nor with vascular blush. CONCLUSIONS: Results indicate that there is a non-specific chronic inflammatory process maintained by an anomalous vascular net rich in lymphatics situated deep within the endocardium. This angiolymphatic web probably contributes to the maintenance of the fibrotic plaque and might be considered an important pathological finding concerning the pathogenesis of EMF. Histopathological changes as seen in surgical material are diagnostic of EMF. Molecular analysis of the endomyocardium revealed a high incidence of cardiotropic infective agents, but their role in the pathogenesis of the disease is still controversial.

Descriptors: 1.Endomyocardial fibrosis/pathology; 2.Restrictive cardiomyopathy/pathology; 3.Restrictive cardiomyopathy/etiology; 4.Immunohistochemistry; 5.Surgical pathology; 6.Polymerase chain reaction (PCR); 7.Reverse transcription - polymerase chain reaction; 8.Retrospective studies.

# 1

## 1. INTRODUÇÃO

---

A endomiocardiofibrose (EMF) é uma forma rara de miocardiopatia de etiologia desconhecida. Sua característica mais marcante consiste no espessamento maciço e por vezes calcificado do endocárdio do ápice e via de entrada de um ou de ambos os ventrículos. Essa lesão provoca dificuldade no enchimento da câmara ventricular correspondente, causando sintomas de insuficiência cardíaca de padrão restritivo.

Deve-se a descrição da EMF a partir de dados macroscópicos de casos de necropsia a um grupo de médicos ingleses que trabalharam em Uganda na época colonial, em meados do século XX. A primeira notificação foi feita em 1938 pelo cardiologista inglês Arthur Williams<sup>1</sup>, citado por Somers [Somers, 1993], que identificou placas extensas de fibrose na parede ventricular do coração em dois pacientes que faleceram por insuficiência cardíaca e insuficiência mitral. As alterações eram inusitadas e foram interpretadas, de acordo com os conhecimentos da época, como decorrentes de miocardite sífilítica.

Oito anos depois, em 1946, Bedford e Kostam fizeram um breve relato à Sociedade Britânica de Cardiologia sobre um grupo heterogêneo de quarenta soldados africanos jovens, todos eles com vinte a trinta anos de idade, provenientes da costa oeste africana e portadores de insuficiência

---

<sup>1</sup> Williams A.W. Heart disease in the native population of Uganda. Part I: Syphilitic Heart Disease. *East Afr Med J* 1938, 15:279.

cardíaca de causa desconhecida. Em alguns dos 17 que faleceram em ambiente hospitalar (número indefinido no original), os autores observaram "*necrose subendocárdica extensa e fibrose sem reação inflamatória apreciável*" [Bedford e Konstam, 1946].

O significado dessas lesões foi definitivamente reconhecido em 1947 por JNP Davies, que na época trabalhava no Hospital Mulago, em Kampala, Uganda. Ele realizou três autópsias sucessivas em pacientes jovens portadores de insuficiência cardíaca grave, cujos corações exibiam fibrose mural do endocárdio ventricular. Após uma revisão dos casos de autópsia da mesma instituição, demonstrou que a condição era relativamente comum na região e ocasionava alto índice de mortalidade, sendo sobrepujada apenas pela aortite sífilítica como causa de morte cardíaca. Davies dedicou-se exaustivamente ao estudo da entidade, que se tornou objeto de tese defendida em Bristol, Inglaterra, em 1948<sup>2</sup>, em seguida publicada com o nome "fibrose endocárdica" ("Endocardial fibrosis in Africans" no original) [Davies, 1948]. Nos anos seguintes, Ball e Williams, auxiliados pelo próprio Davies, fizeram a correlação anatomoclínica, estabeleceram critérios clínicos diagnósticos e publicaram estudo detalhado sobre a clínica e a patologia da doença, já com o nome definitivo de "endomiocardiofibrose" ("Endomyocardial Fibrosis") [Ball et al, 1954] [Davies e Ball, 1955]. Constataram também a maior prevalência da doença entre os imigrantes ao sul de Uganda, região de floresta quente e úmida que atualmente corresponde a Rwanda e Burundi.

---

<sup>2</sup> Davies JNP. *Endomyocardial necrosis. A heart disease of obscure aetiology in Africans*. MD Thesis: University of Bristol. 1948.

Na década de 60, a África central concentrou pesquisadores provenientes de diversos países interessados em Cardiologia, os quais definiram as características eletrocardiográficas, hemodinâmicas, radiológicas, além de aspectos da história natural da EMF [Williams e Somers, 1960] [Shillingford e Somers, 1961] [Cockshott, 1965]. Na mesma época, entre 1963 e 1967, Connor, financiado pela AFIP (Armed Forces Institute of Pathology) e pela OMS, realizou em Uganda o estudo clinicopatológico mais completo e minucioso da doença, o qual foi publicado em 1967 e 1968 em duas partes. Além disso, propôs, em homenagem ao patologista inglês, que a EMF fosse chamada "Doença de Davies", nome pelo qual ainda é conhecida [Connor et al, 1967, 1968].

À medida que os novos conhecimentos se difundiam na literatura mundial, casos semelhantes foram sendo descritos em outras regiões, a princípio em países africanos vizinhos de Uganda, como Nigéria, Congo, Tanzânia, Sudão, Costa do Marfim e mais tarde nos demais continentes, sobretudo em regiões tropicais como Índia, Brasil, Colômbia, Venezuela, México, Ceilão (atual Sri Lanka), Egito, e outros. Com isso, foi-se delineando uma distribuição geográfica peculiar e intrigante, praticamente restrita à região equatorial, entre os paralelos 15° e a linha do equador. No Brasil, curiosamente, o primeiro caso foi relatado no Rio Grande do Sul em 1963, por Mattos et al. No ano seguinte, Andrade e Guimarães descreveram quatro outros casos de necropsia em Salvador, Bahia, e em seguida novos casos foram identificados em todo o país [Andrade e Guimarães, 1964].

Em 1965, num encontro promovido pela OMS em Kampala, a EMF foi reconhecida como uma nova entidade e foram definidos nomenclatura e critérios diagnósticos, inclusive para o diagnóstico diferencial com outras miocardiopatias e com a pericardite constrictiva.

Cerca de 60 anos após sua identificação, a EMF permanece como a principal causa de miocardiopatia restritiva da região tropical. A doença continua a ter maior prevalência na África equatorial, especialmente em Uganda, Nigéria e países vizinhos, onde constitui uma das principais causas de insuficiência cardíaca [Mayosi, 2007]. Nessa região, 15 a 25% dos óbitos por doença cardíaca são atribuídos à EMF [Kushwaha et al, 1997]. Em Uganda é tida como a doença cardíaca mais comum nos hospitais da região, respondendo por quase 20% dos diagnósticos dos serviços de ecocardiografia [Mayosi, 2007]. Também é encontrada esporadicamente em regiões temperadas. No Brasil sua incidência é intermediária se comparada a outros países, porém constitui a primeira causa de miocardiopatia restritiva. Embora considerada mais freqüente no norte e nordeste do país, faltam estudos epidemiológicos conclusivos a respeito do tema. Guimarães (1993) fez referência à EMF como causa de óbito por doença cardíaca em 1,6% de 734 autópsias de pacientes cardíacos realizadas no Hospital da Universidade de Medicina da Bahia, num período de 20 anos. Em São Paulo, o Instituto do Coração (InCor) atendeu no ambulatório num período de 25 anos (de 1978 a 2003) cerca de 220 pacientes com EMF provenientes de várias regiões do país. A partir de 2000, aparentemente, a incidência da doença vem diminuindo em todo o país, talvez em decorrência da melhoria das condições de vida da população nas últimas décadas.

A EMF acomete preferencialmente indivíduos jovens, de baixo nível socioeconômico, em geral da zona rural e com carência nutricional [Rutakingirwa et al, 1999]. Apresenta dois picos de incidência, um em crianças e adolescentes dos 10 aos 15 anos, com incidência semelhante entre os dois sexos, como ocorre na Índia e Uganda; outro em adultos jovens em torno dos 30 anos. Em nosso meio é mais freqüente em adultos jovens do sexo feminino na proporção de até 5:1 [Guimarães, 1993], enquanto em alguns outros países, como na Nigéria ocorre predomínio do sexo masculino na proporção de 2:1 [Rutakingirwa et al 1999] [Sliwa et al, 2005]. Em países africanos a EMF foi também descrita em europeus que moraram na região temporariamente, o que evidenciou que a doença não pode ser explicada apenas por fator étnico [Beck e Schrire, 1972]. Além disso, nos últimos anos a eclosão da epidemia de AIDS não alterou a incidência da EMF no continente africano [Mayosi, 2007].

A lesão anatomopatológica clássica, típica e inconfundível especialmente ao exame macroscópico do coração, consiste no espessamento fibroso acentuado do endocárdio do ápice ventricular. Tal espessamento se estende para a via de entrada, porém poupa sistematicamente a via de saída ventricular. Frequentemente ocorrem focos de calcificação e trombos recentes superficiais. Essa capa fibrosa envolve também músculos papilares, provocando espessamento e encurtamento das cordas tendíneas, porém sem comprometer os folhetos valvares. Pode ocorrer adesão tanto do folheto septal da tricúspide quanto do mural da mitral ao endocárdio ventricular subjacente. A fibrose penetra no miocárdio

superficial em forma de septos delicados, mas o miocárdio e o pericárdio não mostram alterações macroscópicas. O envolvimento biventricular é mais comum em quase todas as regiões, ocorrendo em média em torno de 50% dos casos. Entretanto, o comprometimento isolado do ventrículo esquerdo é mais freqüente no Brasil, ocorrendo em cerca de 30% dos pacientes [Pereira Barretto et al, 1996]. Nos demais países predomina a doença biventricular ou isolada do ventrículo direito [Mayosi e Somers, 2007]. Curiosamente, no Egito a doença acomete apenas o ventrículo direito [Rashwan et al, 1995]. A doença não compromete outros órgãos além do coração.

Ao exame histológico notam-se duas camadas: uma mais superficial de fibrose densa e hialina e outra de tecido conjuntivo frouxo com proliferação de vasos e escasso infiltrado inflamatório de permeio, localizada junto ao miocárdio. A fibrose é acompanhada ainda por proliferação exuberante e desordenada de fibras elásticas. Essas alterações correspondem à lesão crônica e são vistas em pacientes que faleceram após longo período de evolução. Não se tem descrição até o momento das lesões anatomopatológicas da fase inicial da doença. As descrições macroscópicas e histológicas foram tão ricamente detalhadas por Davies e Ball (1955) e depois por Connor et al (1967, 1968) que outros patologistas em décadas seguintes pouco tiveram a acrescentar. Em relação ao componente fibroso propriamente dito pouco se avançou. Somente em 2001, Radhakumary et al realizaram uma análise gel-eletroforética em macerado das lesões após digestão péptica, e demonstraram que existe predomínio do colágeno I em relação ao III. O infiltrado inflamatório, por ser escasso, permaneceu pouco explorado; é

interessante notar que os eosinófilos são raros à histologia apesar da ocorrência de eosinofilia periférica em alguns pacientes [Patel et al, 1977]. Ressaltamos que as alterações vasculares receberam pouca atenção na literatura, muito embora os estudos originais tivessem indicado sua presença na lesão. Isso se deve em parte ao fato de ter ficado evidente que a EMF não é uma doença de origem primariamente isquêmica, como demonstraram Ferrer-Brown et al em 1972. Connor et al, em 1968, e Andrade e Teixeira, em 1973, chamaram a atenção para a presença de alterações morfológicas em arteríolas e vasos coronarianos de pequeno calibre, tanto nas áreas de fibrose endocárdica como na espessura do miocárdio. Uma década depois, com o avanço da cineangiocoronariografia, Balakrishan et al (1983) indicaram alterações de imagem na circulação coronariana terminal, sugestivas de neovascularização. Mais recentemente, Higuchi et al, em 1999, e Bestetti, em 2003, discutiram a relevância de lesões estruturais da microcirculação em outras miocardiopatias, especialmente nas formas chagásica, dilatada idiopática e hipertrófica, sem contudo se referirem especificamente à EMF. Desde então o tema não voltou a ser mencionado na literatura.

Os estudos anatomopatológicos realizados em material de biópsia endomiocárdica na EMF são raros e em geral envolvem pequena casuística [Somers et al, 1971] [Chopra et al, 1990]. As lesões encontradas são semelhantes às descritas em material de necropsia, porém, em nosso meio, devido à dificuldade de obtenção de amostras significativas e ao avanço de métodos diagnósticos não invasivos, o método foi praticamente abandonado [Pereira Barretto et al, 1986]. Curiosamente, ao longo destes anos, não

foram identificadas, quer em necropsias quer em material de biópsia, lesões morfológicas que pudessem corresponder de forma inequívoca às fases iniciais da doença [Lira, 1996].

Do ponto de vista clínico, a EMF é considerada doença grave, de evolução lenta e fatal, apesar dos avanços recentes tanto no diagnóstico como no seu tratamento. A história natural ainda não está bem esclarecida e permanecem pontos obscuros, especialmente referentes ao início da doença. Nos países africanos é comum o relato de episódio de febre, calafrios, edema facial e urticária precedendo o quadro cardíaco em 20 a 30% dos casos, enquanto que no Brasil e na Índia essa ocorrência é rara [Sliwa et al, 2005]. As características clínicas dependem do estágio da doença, do envolvimento anatômico do coração e da presença de insuficiência valvar atrioventricular. Em geral, o quadro clínico tem início insidioso, caracterizado por sinais e sintomas de insuficiência cardíaca. No comprometimento ventricular direito ou biventricular, que compreende cerca de 70% dos pacientes no Brasil, os sintomas predominantes são decorrentes de insuficiência tricúspide, sendo freqüentes ascite, hepatoesplenomegalia, estase jugular, derrame pericárdico e edema refratário de membros inferiores [Pereira Baretto e Pilleggi, 1988]. A ascite nesses casos é o sintoma mais comum (52%), sendo freqüentemente volumosa e acompanhada por discreto edema de membros inferiores. Sua presença indica comprometimento mais intenso do ventrículo direito e é fator de pior prognóstico [Pereira Barretto et al, 2002]. Já a insuficiência valvar mitral na vigência de quadro de insuficiência cardíaca direita é

indício de comprometimento biventricular [Salemi e Mady, 2003]. No comprometimento preponderante do ventrículo esquerdo, predominam os sintomas de insuficiência mitral, com dispnéia, ortopnéia e edema pulmonar [Connor et al, 1967] [Gupta et al, 1989]. Entre nós, 32% dos pacientes com doença isolada de ventrículo esquerdo são pouco sintomáticos e o diagnóstico é feito por acaso, durante investigação de insuficiência mitral ou de dor precordial [Pereira Barretto e Pilleggi, 1988]. Os mesmos autores referiram a presença de dor precordial atípica em 17,9% dos pacientes oligossintomáticos com doença acometendo isoladamente o ventrículo esquerdo. As arritmias supraventriculares são comuns (60%), principalmente a fibrilação atrial, presente em 32% dos casos com doença biventricular ou do ventrículo direito. A fibrilação atrial constitui fator de pior prognóstico em pacientes clinicamente tratados [Pereira Barretto et al, 1998]. Uma vez instalado o quadro de insuficiência cardíaca, o prognóstico geral é grave, com alta taxa de mortalidade. D'Arbela et al, em 1972, referiram óbito de 50% dos pacientes nos primeiros dois anos de evolução principalmente por insuficiência cardíaca refratária. Em Kerala, na Índia, Balakrishnan et al relataram sobrevida de 5 anos em 53% dos pacientes com tratamento clínico [Balakrishnan et al, 1993].

O aprimoramento técnico dos métodos diagnósticos através de imagem a partir dos anos 80, com o advento do ecocardiograma bidimensional, do transesofágico e do ecodopplercardiograma, tornou possível avaliação mais acurada e completa do sistema cardiovascular, com baixo custo e menor risco para o paciente. Esses métodos facilitaram o

diagnóstico e o manuseio da EMF [Brindeiro e Cavalcanti, 1996]. A identificação de fibrose ventricular associada a sinais de restrição diastólica ou de refluxo valvar praticamente define a doença, porém o “padrão ouro” para os casos duvidosos continua a ser o estudo hemodinâmico com ventriculografia. Mais recentemente, a cineangiressonância nuclear magnética tem colaborado no diagnóstico, porém a tecnologia não é de fácil acesso em nosso meio [Cury, 2005].

O diagnóstico clínico diferencial da EMF com acometimento predominante de câmara direita deve ser feito com a pericardite constrictiva e especialmente com a anomalia de Ebstein [Alipour et al, 1980]. Para a doença predominante à esquerda, o diagnóstico diferencial se impõe com a insuficiência mitral, a doença reumática e a miocardiopatia dilatada (idiopática, chagásica ou isquêmica) com trombo apical [Salemi e Mady, 2003]. Do ponto de vista anatomopatológico devem ser diferenciadas da EMF outras lesões que causam espessamento endocárdico, tais como a fibroelastose endocárdica, a lesão endocárdica da síndrome carcinóide e os trombos murais pós infarto do miocárdio ou associados à miocardiopatia chagásica [Kushwaha et al, 1997]. Para tanto, os critérios macroscópicos e histológicos descritos por Davies continuam fundamentais.

A evolução natural da moléstia foi modificada nas últimas décadas devido a progressos importantes tanto no diagnóstico como no tratamento, em particular no tratamento cirúrgico, o qual acompanhou a evolução recente da especialidade. Em 1976, Dubost et al descreveram a técnica para ressecção cirúrgica da fibrose endocárdica. Nos casos de insuficiência

valvar associada, a ressecção era acompanhada de troca das valvas atrioventriculares por prótese. A técnica abriu uma nova perspectiva para os doentes graves, fortemente sintomáticos, que responderam bem ao tratamento [Mady et al 1989]. A técnica original foi modificada em 1990 por Oliveira et al. Esses autores propuseram novo acesso à cavidade ventricular através da parede anterior do ventrículo esquerdo ou do próprio anel valvar tricuspídeo para atingir o ventrículo direito, bem como recurso à plastia valvar em lugar da troca das valvas. As inovações permitiram preservar as valvas atrioventriculares e a função ventricular, tendo contribuído para a queda das complicações cirúrgicas tardias decorrentes da troca valvar. Os pacientes evoluíram com regressão importante da classe funcional da insuficiência cardíaca, havendo raros casos de recidiva da lesão [Oliveira et al, 1996] [Moraes et al, 1999]. Com o advento das ressecções cirúrgicas, um material diferente do obtido por necropsias foi ofertado aos patologistas, aparentemente abrindo um novo caminho no estudo do diagnóstico e etiopatogenia da doença.

Ao longo desses anos, surgiram sucessivos estudos sobre a etiologia da doença, todos, contudo, inconclusivos. Em um dos seus trabalhos, Davies apontou como possíveis fatores etiológicos as infecções virais, as reações antígeno-anticorpo e a desnutrição [Davies e Ball, 1955]. As pesquisas se aprofundaram nos anos subseqüentes a partir dessas hipóteses. Acreditou-se inicialmente que a EMF fosse uma manifestação incomum da doença reumática, freqüente na África, o que não se comprovou [Shaper, 1966]. Surgiram estudos relacionando a doença a

agentes infecciosos, inicialmente ao plasmódio, já que a malária é endêmica na região equatorial, mas a hipótese não se confirmou nem clínica nem experimentalmente [Shaper, 1993]. Os agentes virais e os protozoários também foram lembrados. Em 1990, Ijaola e Falase na Nigéria, investigaram a presença de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* e para o vírus coxsackie B e o arbovirus no soro de pacientes portadores da doença e compararam os resultados com os de indivíduos normais de zona endêmica. Encontraram resultado negativo para vírus e positivo em todas as amostras para *T. gondii*. Os resultados positivos, todavia, não apresentaram valor estatístico em relação ao grupo controle.

Aventou-se a possibilidade de relação da EMF com desnutrição crônica associada a excesso de vitamina D decorrente de dieta rica em carboidrato e pobre em proteínas, pela ingestão de “cassava”, um tipo de tubérculo semelhante à mandioca muito comum na África central [Davies H; 1993]. Considerou-se igualmente a possibilidade de a doença decorrer da ingestão regular de alimentos como um tipo de banana com alta concentração de 5-hidroxi-triptamina e pouco triptofano [Ojo, 1970]. Ambas as hipóteses não foram comprovadas por outros autores. A origem auto-imune também foi aventada, sem sucesso [van der Geld, et al, 1966] [Kartha et al, 1984]. No final da década de 80, Valiathan et al propuseram uma teoria patogénica alternativa baseada na distribuição da EMF no sudoeste da Índia em regiões de solo rico em minério monazítico, como Kerala. A EMF seria a expressão cardíaca da interação de elementos químicos envolvendo a substituição do magnésio por cerium e torium na fibra miocárdica

[Valiathan e Kartha, 1990]. A teoria geoquímica foi bem recebida naquele país, mas não foi comprovada em outras regiões, inclusive no Brasil.

Nenhuma das teorias propostas se sustentou por muito tempo, exceto a de Brockington e Olsen (1973) que chamaram a atenção para a semelhança morfológica entre a EMF tropical e os estádios finais da doença endomiocárdica de Löffler, considerando-as estádios diferentes da mesma doença [Brockington e Olsen, 1973]. Tal teoria ficou conhecida como unicista [Oakley e Olsen, 1977]. O mesmo grupo de pesquisadores sugeriu que a agressão tecidual inicial ocorreria na interface endocárdio/miocárdio pela ação direta de eosinófilos ou por produtos cardiotoxicos de sua degranulação, seguida de trombose mural e substituição por fibrose [Olsen e Spry, 1985]. De acordo com essa teoria, as lesões na EMF poderiam ser causadas por infestações parasitárias via eosinofilia. Apesar de válida em alguns aspectos, principalmente para a doença de Löffler, a teoria unicista foi contestada por mais de duas décadas por vários grupos de pesquisadores dedicados ao estudo da variante tropical, sendo ainda hoje controversa [Mayosi e Somers, 2007]. De início, porque na EMF as três fases são meramente especulativas, pois até o momento não se identificou a lesão anatomopatológica inicial. Quanto ao papel dos eosinófilos, ainda não se tem uma conclusão definitiva. De fato, os pacientes portadores de EMF freqüentemente apresentam eosinofilia periférica, reconhecida desde a descrição da doença. Todavia ela é uma característica inconstante e só raramente os eosinófilos são encontrados à histologia [Patel et al, 1977]. Deve-se notar que a eosinofilia periférica é muito comum em indivíduos

sadios da região tropical, e dificilmente poderia ser considerada fator causal da EMF [Viana et al, 1990]. Vários pesquisadores, particularmente na Nigéria e no Egito, tentaram correlacionar a EMF a agentes infecciosos parasitários que desencadeariam eosinofilia inicial, sem contudo, obter comprovação definitiva [Andy et al, 1977 e 1981] [Jaiyesimi et al, 1982] [Andy, 2001]. Além desses aspectos, existem também diferenças epidemiológicas, geográficas e clínicas entre as duas entidades. Por todos esses motivos, embora a EMF e a doença de Löffler tenham aspectos comuns, atualmente a tendência mundial é de considerá-las como doenças distintas até que novos dados surjam na literatura [Braunwald, 2001].

Desde que ficou comprovada a ocorrência relativamente freqüente da EMF no Brasil, o país tem contribuído para o estudo da doença em três grandes centros: Salvador, Recife e São Paulo. Nas décadas de 60 e 70, o grupo de Salvador se destacou principalmente em estudos anatomopatológicos e clínicos [Andrade et al, 1964, 1973] [Guimarães et al, 1971]. O grupo atuante em Recife permanece em evidência principalmente nas áreas de patologia, cirurgia e métodos diagnósticos [Lira, 1996] [Brindeiro et al, 1996] [Moraes et al, 1999]. No que diz respeito a São Paulo, a partir da década de 80 o InCor passou a acompanhar um número considerável de pacientes portadores de EMF provenientes de todo o país, tendo assumido com isso um lugar de destaque na literatura. A dedicação dos pesquisadores do grupo de miocardiopatias possibilitou avanços importantes nas áreas clínica e cirúrgica, como a identificação de fatores prognósticos da doença [Pereira Barretto et al, 1989], o desenvolvimento de técnica operatória menos

agressiva e a avaliação do resultado dos diferentes tratamentos da doença, trabalhos já citados anteriormente. As pesquisas têm prosseguido nas áreas clínica e de métodos de imagem [Salemi, 2002] [Salemi e Mady, 2004] [Senra et al, 2007]. Apesar disso, os estudos sobre patologia e patogenia permaneceram, de certa forma, estagnados.

O avanço da biologia molecular na década de 90 permitiu que genomas de agentes infecciosos fossem detectados em várias outras miocardiopatias através da reação de cadeia da polimerase (PCR). Verificou-se a participação dos chamados vírus cardiotrópicos (enterovirus, adenovirus, citomegalovirus, parvovirus B19) na fibroelastose, na miocardiopatia dilatada, nas miocardites agudas da infância, na miocardite fatal e na displasia ventricular direita arritmogênica entre outras [Keeling e Tracy, 1994] [Ni, 1997] [Li et al, 2000] [Bowles et al, 2002] [Calabrese et al, 2002] [Kytö et al, 2005]. Por isso achamos oportuna a investigação pioneira de agentes infecciosos cardiotrópicos em tecido cardíaco proveniente de ressecção cirúrgica de EMF. Semelhante pesquisa poderia contribuir para o esclarecimento de sua etiopatogenia.

# 2

## **2. OBJETIVOS**

---

Os objetivos do presente trabalho são:

- 1- descrever os aspectos morfológicos de espécimes provenientes de ressecção cirúrgica de EMF, comparando-os com aqueles provenientes de autópsias, a fim de verificar se aqueles podem ser efetivamente empregados para diagnóstico histológico da doença. Os aspectos morfológicos devem ser correlacionados aos dados clínicos, laboratoriais e de imagem dos pacientes;
- 2- avaliar de forma descritiva e, quando possível, quantitativa os três aspectos morfológicos principais da doença: colágeno, infiltrado inflamatório e vasos coronarianos terminais, utilizando a microscopia óptica comum e técnicas de imunohistoquímica;
- 3- avançar na discussão da etiopatogenia da moléstia pela investigação de ácidos nucleicos de agentes infecciosos cardiotrópicos no tecido cardíaco. Para tanto devem ser utilizadas técnicas de biologia molecular em material proveniente de ressecção cirúrgica.

# 5

## 3. MÉTODOS

---

O protocolo desse estudo retrospectivo, tipo série de casos, teve a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número SDC 2354/03/148 (Apêndice).

### 3.1 Casuística

Os laudos dos pacientes submetidos à **ressecção cirúrgica** de EMF no período compreendido entre 1991 e 2005 foram obtidos nos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor. Todos os pacientes foram acompanhados na Instituição com diagnóstico clínico de EMF comprovada por ecocardiografia e cineangiocardiografia. A partir do número de identificação dos laudos, obtivemos os blocos de parafina e lâminas correspondentes. Inicialmente foram excluídos os casos cujos blocos não estavam disponíveis ou com qualidade técnica comprometida. A partir de análise preliminar das lâminas, foram selecionadas 35 amostras provenientes de 31 pacientes, que integraram a casuística de acordo com os seguintes critérios: (1) amostras contendo

obrigatoriamente representação da lesão endocárdica ventricular e do miocárdio adjacente, sempre a maior possível; (2) amostras com menor quantidade de trombos e de material calcificado, não submetidas à descalcificação química severa prolongada.

Também foram selecionados nove corações provenientes de **autópsias completas** de pacientes com diagnóstico clínico e anatomopatológico prévio de EMF, não submetidos à cirurgia de ressecção e que faleceram na Instituição por intercorrência clínica no período compreendido entre 1980 a 1992. Esses casos compuseram o grupo controle positivo da doença, e foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: (1) órgãos completos e adequadamente conservados em solução fixadora de formalina a 10%; e (2) presença de todos os critérios clássicos característicos da EMF, descritos por JNP Davies, em pelo menos uma cavidade ventricular [Davies e Ball, 1955]. Foram feitos cortes histológicos desses corações compreendendo a parede livre e ponta de ambos os ventrículos, que serviram como padrão de referência positivo da doença. Os cortes em questão abrangeram a lesão endocárdica e o miocárdio vizinho.

### 3.2 Métodos

Cortes histológicos de 4µm de espessura foram corados pela hematoxilina–eosina (HE), tricômico de Masson, Verhoeff e reticulina, de acordo com padronizações habituais.

Para a realização de reações imunoistoquímicas, cortes histológicos de 4µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro tratadas com 3-amino-propil-trietoxisilano. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol até água destilada.

### **3.2.1 Método imunoistoquímico para identificação de colágenos tipos I, III e IV**

A recuperação antigênica foi feita de forma diferenciada: para a marcação dos colágenos I e III os cortes foram imersos em solução de 1mg/ml de pepsina em 0,5M de ácido acético, por 180 minutos em banho-maria, a 37°C; para a marcação do colágeno IV as lâminas foram colocadas em tampão citrato de sódio 0,01M/l em pH 6,0 e aquecidos em banho-maria por 45 minutos. A seguir os cortes foram lavados em PBS (“phosphate buffer saline”). A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%, em 3 banhos de 5 minutos cada. Para bloqueio das proteínas não específicas, as lâminas foram incubadas na solução bloqueadora (“Protein Block”-Dako), a 37°C, por 60 minutos.

A incubação com os anticorpos primários foi feita em geladeira a 4°C, durante 18 horas. Os anticorpos utilizados e suas diluições estão na tabela 1.

**Tabela 1 - Anticorpos utilizados na identificação dos colágenos**

<i>ANTÍGENO</i>	<i>CLONE</i>	<i>MARCA</i>	<i>DILUIÇÃO</i>
<b>Colágeno I</b>	policlonal	Biogenesis	1/2200
<b>Colágeno III</b>	policlonal	Biogenesis	1/2200
<b>Colágeno IV</b>	M785	Dako	1/200

A reatividade foi detectada através de incubação com anticorpos secundários conjugados com a biotina multi-espécies (kit LSAB, K690, Dako); o terceiro reagente foi o complexo estreptavidina-peroxidase (kit LSAB, cod. K690, Dako). Para visualização das ligações antígeno-anticorpo, foi empregado como cromógeno 3,3 tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB- cod 5637, Sigma), seguido por leve contracoloração por hematoxilina de Harris.

Cortes histológicos de pele, rim e fígado sem alterações histológicas serviram como controles positivos para as reações. A reação foi considerada positiva nos controles quando havia coloração em fibras conjuntivas. Em todas as lâminas coradas pela reação imunoistoquímica foram também procurados controles internos de “positividade”.

### **3.2.2 Método imunoistoquímico para caracterização de células inflamatórias**

Foi realizada marcação imunoistoquímica para os anticorpos CD3, CD20 e CD68, visando, respectivamente, à identificação de linfócitos de linhagens T e B e de macrófagos nos blocos de parafina de 15 casos

selecionados aleatoriamente de acordo com a maior quantidade de material disponível.

Para recuperação antigênica os cortes foram imersos em tampão citrato (0,01M/l) em pH 6,0 e aquecidos em microondas por duas vezes durante 9 minutos para o CD20 e CD68, e em panela de pressão por 2 minutos para o CD3. A seguir foram lavados em PBS.

A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio (20 v) com duas imersões de 10 minutos cada. Para o CD3 foi feito bloqueio de reações inespecíficas com solução de leite em pó desnatado a 6% em PBS por 10 minutos.

A incubação com os anticorpos primários foi feita em geladeira a 4°C, por 24 horas. A tabela 2 mostra os anticorpos utilizados e suas diluições.

**Tabela 2 - Anticorpos utilizados na marcação de células inflamatórias**

<i><b>ANTÍGENO</b></i>	<i><b>CLONE</b></i>	<i><b>MARCA</b></i>	<i><b>DILUIÇÃO</b></i>
<b>CD68</b>	M0814	Dako	1/1000
<b>CD20</b>	M75	Dako	1/80
<b>CD3</b>	A0452	Dako	1/30

A reatividade foi detectada através de incubação com os anticorpos secundários Envision (Envision System Labelled Polymer, cod K1490, Dako). Foi empregado na revelação o cromógeno 3,3 tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB, cod.5637, Sigma). Por último, as lâminas foram contracoradas por hematoxilina de Carazzi.

Cortes histológicos de linfonodo sem alterações histológicas serviram como controle positivo para as reações. A reação foi considerada positiva nas amostras com coloração para CD20 e CD68 e CD3. Em todas as lâminas coradas por reação imunoistoquímica foram também procurados controles internos de “positividade”.

### **3.2.3 Método imunoistoquímico para detecção de linfáticos**

Foi realizada a marcação de linfáticos pela podoplanina (D2-40) em dezoito casos da casuística selecionados aleatoriamente de acordo com a disponibilidade de material. Além disso, a reação foi simultaneamente realizada em três casos do grupo de autópsia, em dois casos de miocárdio sem alterações histológicas e em outros seis casos de trombo mural da parede ventricular de outra etiologia (três por lesão chagásica crônica e três pós infarto do miocárdio). Os seis casos foram comparados à nossa amostra.

A peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio (20 v) com duas imersões de 10 minutos cada. Não foi necessário fazer a recuperação antigênica.

A incubação com o anticorpo primário foi feita durante 24 horas (“overnight”) em geladeira, a 4°C, utilizando-se o anticorpo monoclonal D2-40 (M 3619, Dako), diluído a 1:100 em PBS.

A reatividade foi detectada através de incubação com o anticorpo secundário Envision (Envision System Labelled Polymer, cod K1490, Dako).

Por fim as lâminas foram contracoradas por hematoxilina de Carazzi.

Adicionalmente, para melhor visualização da reação, nos mesmos casos foi realizada a reação utilizando-se a fosfatase alcalina como marcador, com as seguintes modificações: a etapa de bloqueio da peroxidase endógena foi eliminada; o anticorpo secundário foi o Envision (Envision Labelled Polymer-AP mouse/rabbit”, cod. K4017, Dako); e a revelação foi feita com “Liquid Permanent red”.

A reação foi considerada positiva nas amostras com coloração intensa no endotélio do vaso. Em todas as lâminas coradas foram também procurados controles internos de “positividade”.

#### **3.2.4 Critérios para avaliação histológica do endocárdio**

A partir do exame de cortes corados pelo HE, tricômico de Masson, Verhoeff, reticulina e marcação imunoistoquímica, os seguintes itens no endocárdio foram avaliados: (1) o espessamento fibroso quanto à intensidade, à densidade e ao aspecto histológico da fibrose, bem como quanto à presença, à intensidade e à distribuição de fibras elásticas e reticulínicas; (2) o infiltrado inflamatório quanto à intensidade, à distribuição e ao tipo celular; (3) os vasos subendocárdicos quanto à intensidade da proliferação, ao calibre, à alteração dos constituintes da parede e à disposição de vasos linfáticos na lesão; (4) a presença de calcificação; e, por último (5) a presença de trombos aderidos à superfície endocárdica.

Foram avaliados semi-quantitativamente, com graduação de zero a três, a intensidade da fibrose, a intensidade dos diversos tipos de fibras

colágenas, a proliferação de fibras elásticas e reticulínicas, bem como a intensidade do infiltrado inflamatório e da proliferação vascular. Foram considerados “zero” (0): a ausência do aspecto avaliado, “um” (1+): grau leve, “dois” (2+): grau moderado e “três” (3+): grau intenso.

#### **3.2.4.1 Critérios para avaliação do componente fibroso endocárdico**

Para avaliação da **fibrose endocárdica** foi utilizada objetiva de menor aumento (4X), pelo HE e tricômico de Masson, sendo considerado grau leve: espessamento fibroconjuntivo regular ou não, menor que 1 mm; grau moderado: espessamento fibroconjuntivo regular, denso ou não, com espessura intermediária entre 1 e 2 mm; grau intenso: espessamento fibroconjuntivo regular, denso, com áreas hialinas, maior que 2 mm, com objetiva de menor aumento.

Para avaliação dos três tipos de **colágeno** foi utilizada a respectiva marcação imunoistoquímica, em objetiva de aumento intermediário (10X) ou de maior aumento (40X), sendo a marcação considerada leve se a positividade era focal, moderada se havia tendência à formação de grupos de fibras positivamente marcadas, e intensa quando a positividade era homogênea.

Para avaliação das **fibras elásticas**, coradas pelo Verhoeff, foram utilizadas objetivas de menor aumento ou de aumento intermediário (10X), sendo considerado grau leve: proliferação focal, irregularmente distribuída, com fibras delicadas; grau moderado: proliferação de fibras em grupos

tendendo à união; e grau intenso: proliferação de fibras espessas, irregulares, formando emaranhado denso e uniforme, às vezes em camadas.

Para avaliação das **fibras reticulínicas** pela coloração correspondente, foi utilizada objetiva de grande aumento (40X) ou de imersão (100X), sendo considerado grau leve: fibras delicadas, isoladas, de fraca intensidade de coloração, irregularmente distribuídas; grau moderado: fibras delicadas tendendo a se unir; e intenso: fibras delicadas formando emaranhado nítido.

#### **3.2.4.2 Critérios para avaliação do componente inflamatório endocárdico**

Para avaliação do **infiltrado inflamatório**, foram utilizadas a coloração de HE e as reações imunoistoquímicas para linfócitos T, B e macrófagos, sendo considerado grau leve: células inflamatórias, esparsas ou em pequenos grupos isolados, visíveis apenas em objetiva de aumento intermediário; moderado: células inflamatórias dispostas em grupos maiores, irregularmente distribuídos, visíveis em objetiva de pequeno aumento (4X) ou de aumento intermediário (10X); e intenso: células inflamatórias regularmente distribuídas ou em grupos coalescentes, visíveis em objetiva de pequeno aumento (4X).

Na faixa fibrosa endocárdica, foi realizada **avaliação quantitativa de células inflamatórias** positivamente marcadas por imunoistoquímica para se determinar a proporção entre elas na área de lesão endocárdica. Para tanto, foi selecionado aleatoriamente um subgrupo de nove casos, de acordo com a quantidade e qualidade da amostra, e feita a contagem de

células positivamente marcadas em dez campos de grande aumento (400x). Foi utilizado o programa Axion-vision 0.3 Zeiss, acoplado a microscópio Zeiss e sistema de análise de imagens, sendo que cada campo de grande aumento correspondia a 0,037mm<sup>2</sup>. Foram selecionados os campos com maior intensidade de inflamação, sendo também realizada a contagem de eosinófilos identificados ao HE, nas mesmas áreas e da mesma maneira. A proporção relativa das células inflamatórias foi calculada dividindo-se o número de células contadas pelo número total de células inflamatórias, multiplicando-se o resultado por 100.

#### **3.2.4.3 Critérios para avaliação do componente vascular endocárdico**

Para avaliação dos **vasos** no endocárdio, foram utilizadas as colorações de HE, Masson, Verhoeff e marcação imunoistoquímica para endotélio linfático, sendo a proliferação considerada de grau leve: vasos isolados, distantes entre si, sem alterações estruturais da parede, com menos de cinco vasos identificados em objetiva de aumento intermediário (10X); grau moderado: vasos agrupados, irregularmente distribuídos, ocasionalmente com alterações na parede; e intenso: numerosos vasos agrupados, a maioria com alterações estruturais na parede, com mais de 10 vasos por campo em objetiva de aumento intermediário (10X).

Foi avaliada em porcentagem **a proporção de linfáticos** sobre o total de vasos na área de lesão endocárdica. Para isso selecionamos aleatoriamente, de acordo com a qualidade e tamanho do corte histológico,

oito casos da nossa casuística, além de seis casos de trombo mural para comparação da reação, sendo três pós infarto e três por lesão chagásica crônica. Essas lâminas foram analisadas à microscopia óptica comum, com contagem dos vasos positivamente marcados nas áreas de maior concentração vascular endocárdica, sobre o total de vasos presentes naquela área (proporção simples, em porcentagem) em cinco campos sucessivos com objetiva de 10X (com aumento final de 100X; área de um campo de 170300  $\mu\text{m}^2$ ; microscópio Leica acoplado a computador com captura de imagens).

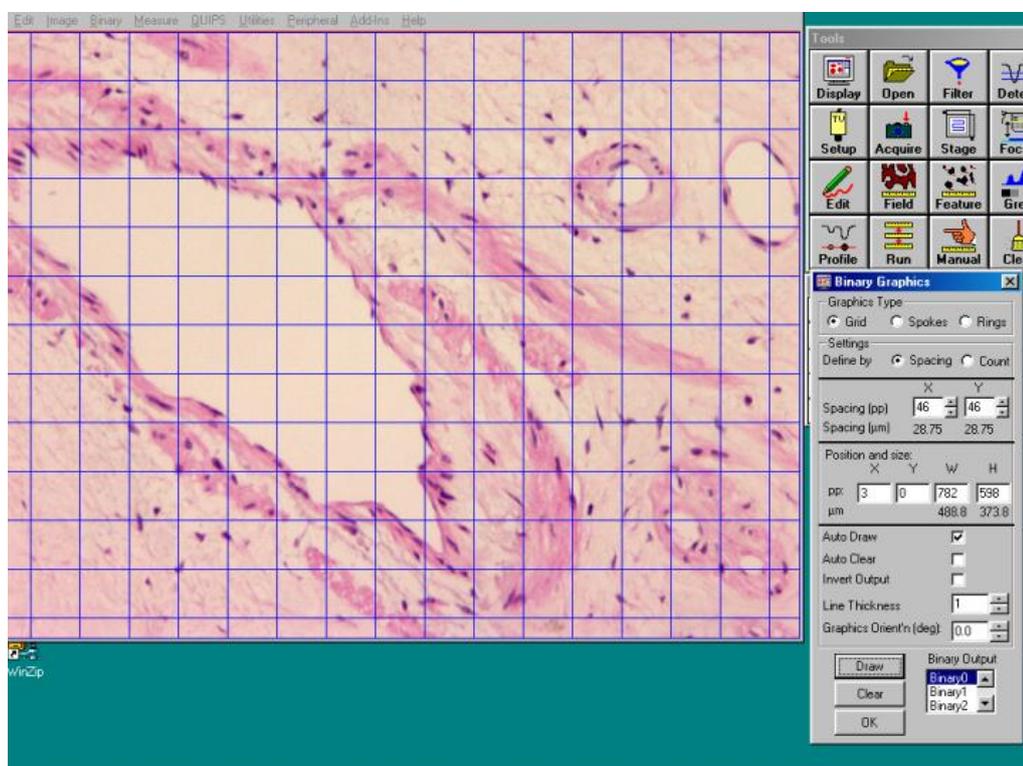
Considerando que um subgrupo de pacientes portadores de EMF apresentava dor precordial atípica, procuramos estudar a microcirculação do ponto de vista morfológico e de imagem para tentar estabelecer possíveis correlações entre o sintoma clínico de dor precordial atípica e alterações vasculares. Com esse objetivo foi realizado **estudo morfométrico dos vasos sanguíneos e linfáticos da região de lesão endocárdica** para se determinar o número de vasos por unidade de área, a fração de área ocupada por lumens vasculares e a porcentagem de espessura da parede vascular, utilizando-se o método da interceptação linear definido por Gundersen et al (1988). Foram selecionados 21 casos de nossa casuística (**1º subgrupo**) de acordo com critérios clínicos previamente estabelecidos, ou seja, a presença de dor precordial atípica e/ou de exames cineangiocoronariográficos disponíveis para revisão. O estudo foi feito em microscópio Leica acoplado a computador com captura de imagem, usando-se o programa LeicaQwin/Quantimet. De acordo com o plano piloto inicial,

foram selecionados 20 campos sucessivos da região endocárdica de cada caso, com aumento final de 200X. A contagem foi realizada com gradeado de 221 pontos, área de cada campo de 158.700  $\mu\text{m}^2$  (Figura 1). Foi contado o número total de vasos e, interpondo-se gradeado de 221 pontos, o número total de pontos incidentes sobre o endocárdio (P tot), o lúmen vascular (P luz) e a parede vascular (P par). Foi então calculado o número de vasos/ $\text{mm}^2$ . A fração de área ocupada pelos lumens vasculares (Lv) e a porcentagem de espessura da parede vascular (Pv) foram calculadas segundo as fórmulas:

$$Lv = (Pluz/P \text{ tot}) \times 100$$

$$Pv = (Ppar/Pluz + Ppar) \times 100$$

(margem de erro: 0,056)



**Figura 1** - Imagem de campo microscópico acoplado a sistema de captura de imagem com gradeado de 221 pontos (HE, aumento original 200X) (# 27)

#### **3.2.4.4 Critério para avaliação da calcificação e de trombos murais endocárdicos**

Foi feita avaliação qualitativa quanto aos demais itens, **calcificação e trombos murais**.

#### **3.2.5 Critérios para avaliação histológica do miocárdio subendocárdico**

A partir do exame de cortes corados por HE, tricrômico de Masson, Verhoeff e marcação imunoistoquímica, foram avaliadas no miocárdio: (1) as fibras musculares quanto à hipertrofia e à presença de agressão por infiltrado inflamatório; (2) a regularidade da interface endocárdio/miocárdio; (3) a presença e a intensidade de fibrose intersticial; (4) a presença e o tipo de infiltrado inflamatório intersticial e, por último (5) a distribuição vascular e linfática no local. A proliferação fibroconjuntiva foi avaliada semi-quantitativamente em quatro graus, sendo considerado zero quando ausente, grau leve para proliferação fibroconjuntiva delicada envolvendo fibras isoladas, grau moderado para proliferação fibroconjuntiva alargando o interstício, visível em aumento intermediário (10X) e grau intenso para fibrose bem estabelecida envolvendo grupos de fibras musculares e visível em objetiva de pequeno aumento (4X).

No miocárdio foi feita contagem de células inflamatórias positivamente marcadas por imunoistoquímica por unidade de área (mm<sup>2</sup>) [Linder et al 1985] [Kühl et al, 1996]. A contagem foi realizada em cinco campos de grande aumento (400X), aleatoriamente escolhidos no miocárdio subjacente

à lesão endocárdica. Da mesma maneira, foi realizada a contagem de eosinófilos identificados ao HE, segundo os mesmos critérios. Foi utilizado o programa Axion-vision 0.3 Zeiss, acoplado a microscópio Zeiss e sistema de análise de imagens, sendo que cada campo de grande aumento correspondia a 0,037mm<sup>2</sup>.

### **3.2.6 Método para pesquisa de agentes infecciosos cardiotrópicos**

Em parceria com o grupo do Prof. Gaetano Thiene do Departamento de Patologia da Universidade de Pádua, Itália, foi feita análise retrospectiva por PCR e RT-PCR para a detecção de ácidos nucléicos do protozoário *T. gondii* e de oito vírus cardiotrópicos bem conhecidos: adenovirus, herpes simples, vírus Epstein-Barr (EBV), parvovirus B19, enterovirus (EV), influenza A e B, e citomegalovirus (CMV), seguida de seqüenciamento dos casos positivos. Para as reações, foi selecionado um subgrupo de casos composto inicialmente por 36 amostras fixadas e incluídas em parafina, 12 das quais forneceram material adequado para análise (**2º subgrupo**). Os mesmos procedimentos foram ainda realizados em 20 amostras de miocárdio de pacientes com doença cardíaca não inflamatória (amostras controle). Também foram incluídos nas reações controles positivos e negativos os quais foram processados juntamente com as amostras. Foram tomadas medidas padrão para evitar reações falso-positivas pela contaminação de produtos de PCR, incluindo-se a separação física das salas de reação, reagentes em alíquotas, pipetas descartáveis e irradiação

UV para o equipamento não descartável. O material foi analisado sem conhecimento prévio de dados clínicos.

Todos os procedimentos técnicos relativos à reação descritos a seguir foram realizados pelo Departamento de Patologia da Escola de Medicina da Universidade de Pádua, na Itália. (A sensibilidade do laboratório foi previamente definida em 1800 moléculas isoladas RNA/PFU) [Calabrese et al, 2000].

### **3.2.6.1 Extração de RNA e DNA a partir do material incluído em parafina**

Para extração dos ácidos nucleicos do material incluído em parafina foram realizados quatro cortes histológicos de cada amostra, de oito µm de espessura, com cuidado de evitar a contaminação entre as amostras.

A etapa inicial consistiu em remover a parafina dos cortes por meio da adição de xilol aquecido a 40°C aos tubos de microcentrifuga contendo as amostras, com vários ciclos de centrifugação. Em seguida as amostras foram lavadas com etanol absoluto para remoção do xilol, em várias etapas seguidas de centrifugação, até se obter um precipitado (amostra desidratada) que foi posto para secar à temperatura ambiente para evaporação dos resíduos de etanol.

As amostras desidratadas foram em seguida submetidas a processos de digestão e precipitação para isolamento dos ácidos nucléicos pelo método de fenol/clorofórmio com algumas diferenças para DNA e RNA, de

acordo com as técnicas de Shibata<sup>3</sup> (1992) e Stanta e Schneider<sup>4</sup> (1991), citadas por Calabrese et al (2002), utilizando-se proteinase K e solução detergente. Após várias etapas de centrifugação, incubação e congelamento do material, o sobrenadante foi desprezado. O produto precipitado ou “pellet”, correspondente ao DNA ou RNA extraído das amostras, foi dissolvido em H<sub>2</sub>O milliQ estéril e estocado em temperatura adequada para prosseguimento das reações.

### **3.2.6.2 Avaliação da integridade dos ácidos nucléicos extraídos (amplificação dos genes βglobina e 3-GPDH)**

Para o controle de qualidade do material genético extraído na etapa anterior, foi realizada detecção dos genes da βglobina e 3-GPDH por PCR, respectivamente para DNA e RNA, utilizando-se “primers” específicos descritos na literatura de acordo com Ercolani et al<sup>5</sup> (1988) e Saiki et al<sup>6</sup> (1985), citados por Calabrese et al (2002).

Foi adicionada às várias amostras solução diluída em H<sub>2</sub>O milliQ estéril contendo desoxinucleotídeos (dNTPs), MgCl<sub>2</sub>, os “primers” “sense e antisense” do gene respectivo (Tabela 3), Taq polimerase e solução tampão. As amostras foram submetidas a vários ciclos de variação de temperatura

---

<sup>3</sup> Shibata DK. The polymerase chain reaction and the molecular genetic analysis of tissue biopsies. In: Herrington CS, McGee JO (editors). *Diagnostic Molecular Pathology. A Practical Approach*. Vol II, ed by Herrington CS McGee O'D Oxford, 1992.

<sup>4</sup> Stanta G, Schneider C. RNA extracted from paraffin-embedded human tissue is amenable to analysis by PCR amplification. *Biotechniques* 1991; 11: 304-8.

<sup>5</sup> Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J Biol Chem* 1988; 263: 1535-41.

<sup>6</sup> Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230:1350-4.

em termociclador, com temperaturas de anelamento diferentes para  $\beta$ globina e 3-GPDH (tabela 3). O produto amplificado foi visualizado em gel agarose corado com brometo de etídeo através de eletroforese, segundo o procedimento descrito a seguir (item 3.2.3.5). Nas amostras em que não se identificou o gene da  $\beta$ globina (ou do 3-GPDH no caso do RNA) o procedimento de extração foi repetido novamente. Tendo permanecido negativo o resultado, a amostra foi desprezada.

### **3.2.6.3 Síntese do DNA complementar (RT-PCR)**

A reação de RT-PCR constitui etapa obrigatória para obtenção do DNA complementar (cDNA), no caso dos seguintes vírus: enterovírus, influenza A e B e gene tardio do citomegalovírus, inclusive sua forma replicante [Lam et al, 1998].

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se a enzima transcriptase reversa M-MLV e o “primer antisense” específico de cada vírus RNA pesquisado. A reação foi feita adicionando-se ao RNA extraído (pelo menos 1 $\mu$ g) uma mistura contendo solução tampão, dNTPs, KCl, MgCl<sub>2</sub>, inibidor de RNAase, o “primer antisense” e a enzima transcriptase reversa M-MLV e H<sub>2</sub>O MilliQ estéril (qsp. 20 $\mu$ l). As amostras foram incubadas em termociclador a 37°C por 60 minutos, e em seguida a 99°C por um minuto e trinta segundos. O produto dessa reação, o cDNA, seguiu para reação de amplificação.

#### 3.2.6.4 Reações de amplificação (PCR)

Para a reação de PCR foram utilizados nove pares de “primers” previamente determinados na literatura, oito obtidos de vírus cardiopáticos e um para amplificação do gene B1 do *T. gondii*, os quais constam da tabela 3 com as respectivas temperaturas de anelamento [Hohlfeld e Daffor, 1994] [Calabrese et al, 2002].

A reação de amplificação foi feita utilizando-se 10 µl de DNA ou de cDNA obtidos em etapas anteriores (extração ou RT-PCR, respectivamente) aos quais foi adicionada uma mistura contendo dNTPs, solução tampão, MgCl<sub>2</sub>, KCl, “primers” “sense e antisense” específicos de cada microorganismo e Taq polimerase e H<sub>2</sub>O milliQ estéril (q.s.p. 50µl).

As amostras foram submetidas a diferentes ciclos de variação de temperatura em termociclador com temperatura de anelamento específica para os pares de “primers” próprios de cada microorganismo.

**Tabela 3 - “Primers” “sense e antisense” utilizados em RT-PCR e/ou PCR dos genes de 3-GPDH, da  $\beta$ globina e dos diversos microorganismos pesquisados, com temperatura de anelamento e tamanho do fragmento gerado após amplificação**

<i>Gene/Virus</i>	<i>“Primers” “sense e antisense”</i>	<i>Temp. (C°)</i>	<i>Banda (bp)</i>
<b>3-GPDH</b>	5'- AGG TGA AGG TCG GAG TCA ACG - 3' 5'- GCT CCT GGA AGA TGG TGA TGG - 3'	50°C	234
<b><math>\beta</math>globina</b>	5'- GGA AAA TAG ACC AAT AGG CAG - 3' 5'- ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC - 3'	44°C	269
<b>enterovirus</b>	5'- CCG GAT GGC CAA TCC AAT A - 3' 5'- TGC GGC TAA TCC TAA CTG CG - 3'	55°C	180
<b>adenovirus</b>	5'- TGA AAC TGT AGG CGC CGC ACG AC - 3' 5'- CTA CAC GTA CAT TCT GGT GAC GCC G - 3'	56°C	308
<b>CMV</b>	5'- CAC CTG TCA CCG CTG CTA TAT TGC - 3' 5'- CAC CACGCAGCGGCCCTTGATGTT - 3'	57°C	275
<b>Herpes s.</b>	5'- AAG GAG GCG CCC AAG CGT CCG - 3' 5'- TGA AAC GGT CGG ACA TGG GGT - 3'	56°C	229-V1 241-V2
<b>EBV</b>	5'- TTC GGG TTG GAA CCT CCT TG - 3' 5'- GTC ATC ATC ATC CGG GTC TC - 3'	52°C	268
<b>Infl. A</b>	5'- AAG GGC TTT CAC CGA AGA GG - 3' 5'- CCC ATT CTC ATT ACT GCT TC - 3'	50°C	190
<b>Infl. B</b>	5'- ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC - 3' 5'- TGT CAG CTA TTA TGG AGC TG - 3'	56°C	241
<b>Parvov. B19</b>	5'-TAT TAT AAG GCC GCT GAA AAT GAC TGA AT-3' 5'-TTA CCT CTA TTG TTG GAT CAT ATT CGT CCA-3'	42°C	304
<b>Toxo</b>	5'- AAC GGG CGA GTA GCA CCT GAG GAG A - 3' 5'- TGG GTC TAC GTC GAT GGC ATG ACA ACT - 3'	61°C	115

### 3.2.6.5 Análise do produto amplificado

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel-agarose a 3% Nu-Sieve/1% agarose dissolvido em tampão TAE, ao qual foi adicionado o revelador brometo de etídio (0,03 µg/ml). Para visualização das amostras no gel, as mesmas foram misturadas a um corante de acordo com a banda a ser pesquisada. Juntamente com as amostras, foram aplicados os controles positivos e negativos de cada reação, bem como um marcador de tamanho molecular adequado. O gel foi submetido à eletroforese de 70/80 v por 20 minutos. Em seguida, o produto foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta acoplado a sistema de captura de imagem. As amostras só foram consideradas positivas quando a análise por PCR foi confirmada pela segunda vez.

### 3.2.6.6 Seqüenciamento

Os produtos de amplificação dos genomas virais foram submetidos a seqüenciamento direto. Para tanto, os produtos de PCR foram purificados e concentrados por centrifugação e em seguida marcados com os dideoxinucléotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes (“kit” ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction - Applied Biosystem, CA, EUA) e submetidos ao seqüenciamento automático. As seqüências geradas foram comparadas com o banco de seqüências do genBank utilizando-se o programa BLAST (“Basic local alignment search tool”) disponível na página do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) [Calabrese et al, 2002].

### **3.2.7 Critérios para revisão de dados clínicos e de exames subsidiários**

#### **3.2.7.1 Revisão de prontuários**

Foi feita a revisão dos prontuários e relatórios cirúrgicos de 29 dos 31 pacientes da casuística, com ênfase nos itens: procedência, quadro clínico, doenças associadas e pregressas (em especial diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, doenças de fundo alérgico), dados laboratoriais positivos (com atenção para presença de eosinofilia no sangue periférico, identificação de anticorpos virais e de parasitoses intestinais), tempo de doença, evolução clínica, dados cirúrgicos, evolução pós-operatória e seguimento ambulatorial. Foi considerada eosinofilia a presença de eosinófilos acima de 6% em qualquer dos hemogramas realizados durante o seguimento do paciente.

#### **3.2.7.2 Revisão de cineangiocoronariografias**

A revisão das 16 **cineangiocoronariografias** disponíveis foi realizada por dois cardiologistas, visando à confirmação do diagnóstico e, sobretudo, à identificação de alterações coronarianas e de alterações vasculares terminais. Denominamos “blush” vascular (ou neovascularização) a presença de borramento de material contrastado com retardo do “clearance” ou área focal bem definida de vasos delicados na circulação coronariana terminal [Balakrishnan et al, 1983].

### **3.2.8 Correlação entre dados clínicos e anatomopatológicos**

O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para verificar possíveis correlações entre o número de células inflamatórias no endocárdio e no miocárdio.

Apesar da limitação da amostra, o teste t foi utilizado para comparar o número total de vasos, a fração de área ocupada pela luz vascular (Lv) e a porcentagem de espessura da parede vascular (Pv) entre os grupos com e sem “blush” e apresentando ou não dor precordial.

# 4

## **4. RESULTADOS**

---

O **estudo macroscópico** do grupo controle demonstrou as alterações clássicas descritas por Davies e Ball em 1955, as quais formam um grupo homogêneo e bem definido da doença. O resumo das alterações macroscópicas encontra-se no **anexo A**.

Os corações apresentaram volume habitual ou reduzido e peso moderadamente aumentado, entre 220g e 440 g (para média normal de 250 g). Foi identificada lesão endocárdica típica caracterizada por capa fibrótica espessa, de 0,2 a 0,4 cm. Tal capa revestia internamente a cavidade ventricular a partir da ponta, estendia-se para a via de entrada e recobria músculos papilares, comprometendo cordas tendíneas (Figura 2). Chamou atenção a parada abrupta do espessamento fibroso na via de saída, cerca 1,5 a 4,5 cm abaixo das valvas pulmonar e/ ou aórtica. Em todos os casos a fibrose infiltrou-se sutilmente pelo miocárdio superficial, sem respeitar o limite entre endocárdio e miocárdio. Em quatro casos (4/9, 45%) foi constatado comprometimento biventricular de intensidade e distribuição semelhantes nas duas cavidades; nos demais, observou-se lesão mais intensa em um dos ventrículos (três de VE e dois de VD) e leve opacidade endocárdica na outra cavidade ventricular. Em quatro casos (4/9, 45%) constatou-se trombose mural na ponta ventricular com retração miocárdica adjacente, dando falsa impressão de hipertrofia. Nenhum caso apresentou

calcificação macroscópica da lesão. As valvas atrioventriculares exibiram folhetos delicados e transparentes, com dilatação variável do anel valvar secundária à restrição ventricular. As valvas pulmonar e aórtica, bem como a via de saída ventricular, não mostraram alterações. A dilatação atrial esteve sempre presente, acompanhada por espessamento endocárdio discreto e uniforme. A dilatação do átrio direito foi particularmente intensa. Em três casos (3/9) foram encontrados trombos intracavitários em aurícula direita.



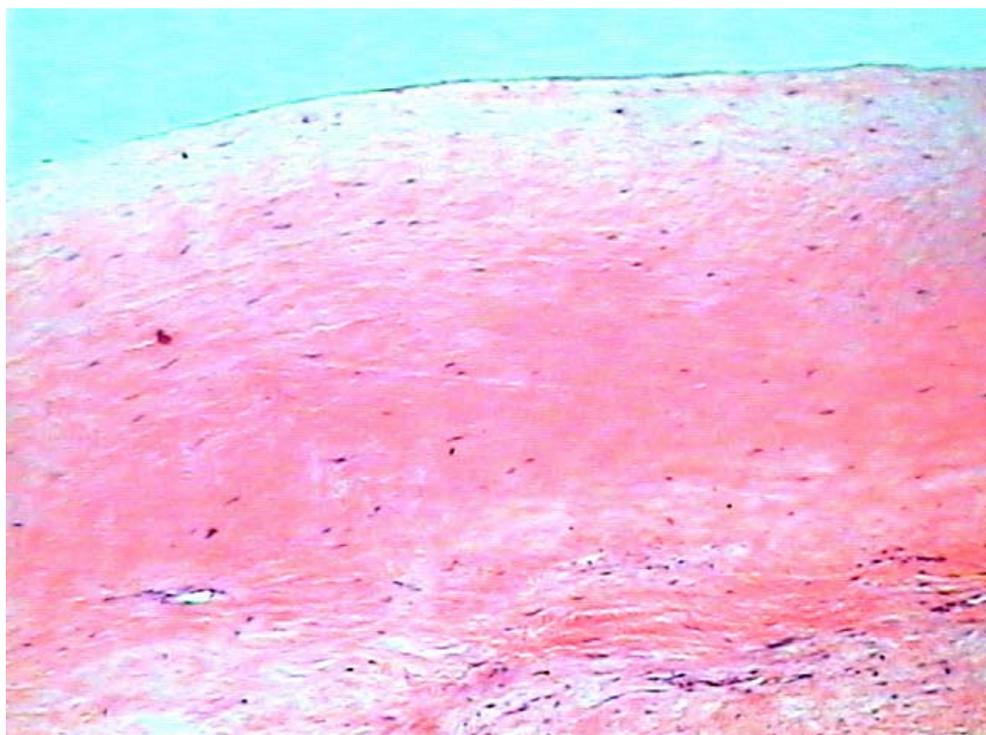
**Figura 2** - Aspecto macroscópico da placa fibrosa endocárdica em ponta de ventrículo esquerdo, poupando a via de saída ventricular, as valvas aórtica e mitral. (coração de autópsia A24/83)

## 4.1 Análise do endocárdio

As descrições seguintes referem-se ao estudo do material de ressecção cirúrgica composto por 31 casos. Os cortes histológicos do material de autópsia apresentaram alterações idênticas. Os dados histológicos de todos os casos encontram-se no **anexo B**.

### 4.1.1 Componente fibroso endocárdico

Em todos os casos observou-se **espessamento fibroso endocárdico** de grau intenso, de espessura irregular, variando entre 2,5 mm e 4,0 mm. Permeia a porção superficial do miocárdio por meio de traves delicadas e é composto por fibras colágenas densas. Essa faixa fibrosa não se mostrou homogênea em toda a sua espessura. A porção mais superficial, em contato direto com a cavidade ventricular, apresentou aspecto denso, pouco vascularizado, com áreas hialinas irregulares, praticamente acelulares (Figura 3). Já a porção mais profunda, próxima ao miocárdio, exibiu aspecto mais frouxo, edemaciado, com células inflamatórias e vasos de permeio. A coloração pelo tricrômico de Masson evidenciou duas camadas sobrepostas: uma camada superficial de azul intenso e homogêneo na porção superficial do endocárdio, correspondente às áreas de fibrose densa, e outra de coloração azul claro e delicado na porção mais profunda. Áreas de hialinização do colágeno denso assumiram tonalidade alaranjada pelo tricrômico de Masson (Figura 4). A lesão da ponta ventricular, presente no grupo de autópsia, demonstrou as mesmas características histológicas das lesões da parede ventricular.



**Figura 3** - Aspecto histológico da faixa fibrosa densa e hialina, escassamente celular (HE, aumento original 100X) (# 1)



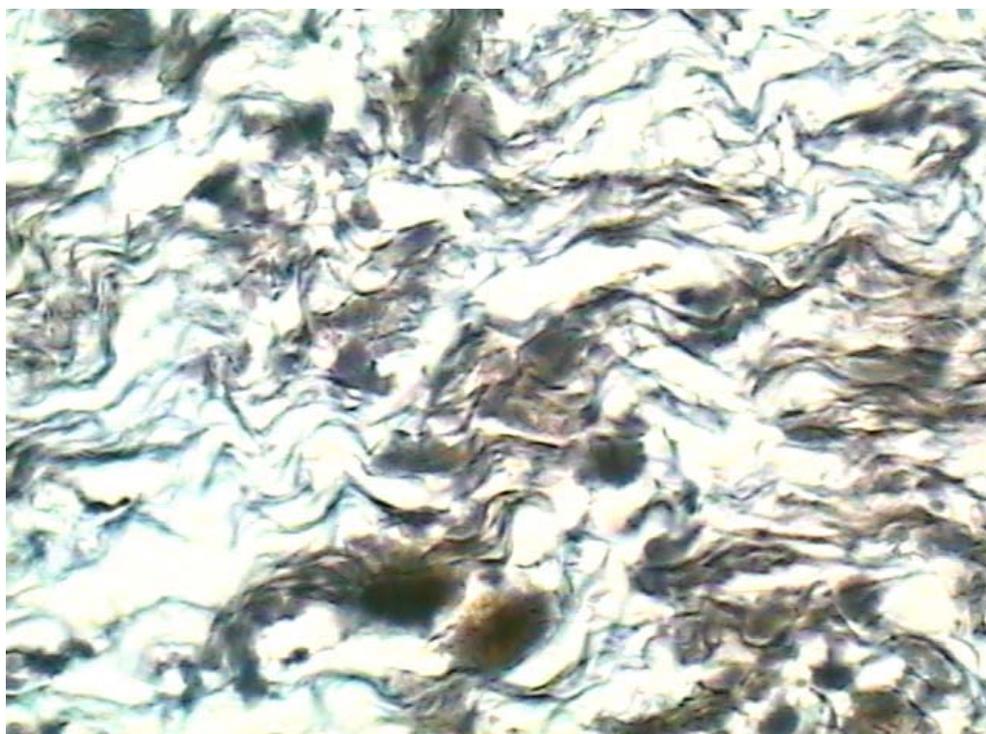
**Figura 4** - Aspecto histológico da faixa fibrosa corada pelo tricômico de Masson. As áreas de fibrose hialina assumem tonalidade alaranjada (tricômico de Masson, aumento original 100X) (# 1).

Esse espessamento fibroso do endocárdio foi acompanhado de **elastose** irregular evidenciada pela técnica de Verhoeff, presente em todos os casos e avaliada como intensa ou moderada em 22/31 (71%). A elastose caracterizou-se por proliferação de fibras elásticas espessas, tortuosas e não paralelas entre si. Tal proliferação, contudo, foi descontínua, desordenada e predominante nas áreas de fibrose mais frouxa. As faixas de fibras elásticas se sobrepuseram com freqüência esboçando camadas irregulares e mal definidas. Muitas vezes foi possível identificar um reforço dessas fibras junto ao miocárdio e outro quase contínuo paralelo à cavidade ventricular. Nas áreas de fibrose densa a quantidade de fibras elásticas foi nitidamente menor (Figura 5).



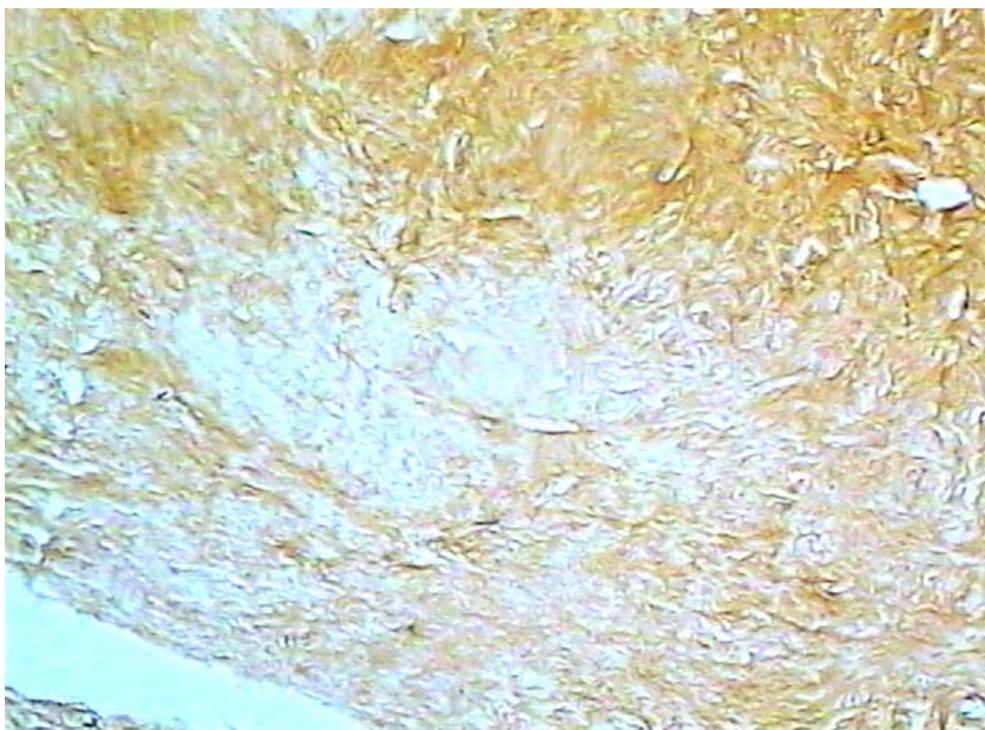
**Figura 5** - Acentuada elastose da faixa endocárdica, caracterizada por faixas irregulares de fibras elásticas sobrepostas, coradas em preto (Verhoeff, aumento original 50X) (# 18).

A coloração para **fibras reticulínicas** demonstrou numerosas fibras pequenas, fragmentadas, isoladas, dispostas irregularmente em placas descontínuas e mal delimitadas, presentes difusamente na faixa fibrosa endocárdica, tanto nas áreas mais densas como nas frouxas, sem arranjo característico. A proliferação de fibras reticulínicas foi considerada de grau leve na maioria dos casos, tendo-se verificado grau intenso junto aos vasos em apenas dois deles (2/31, 6,4%) (Figura 6).

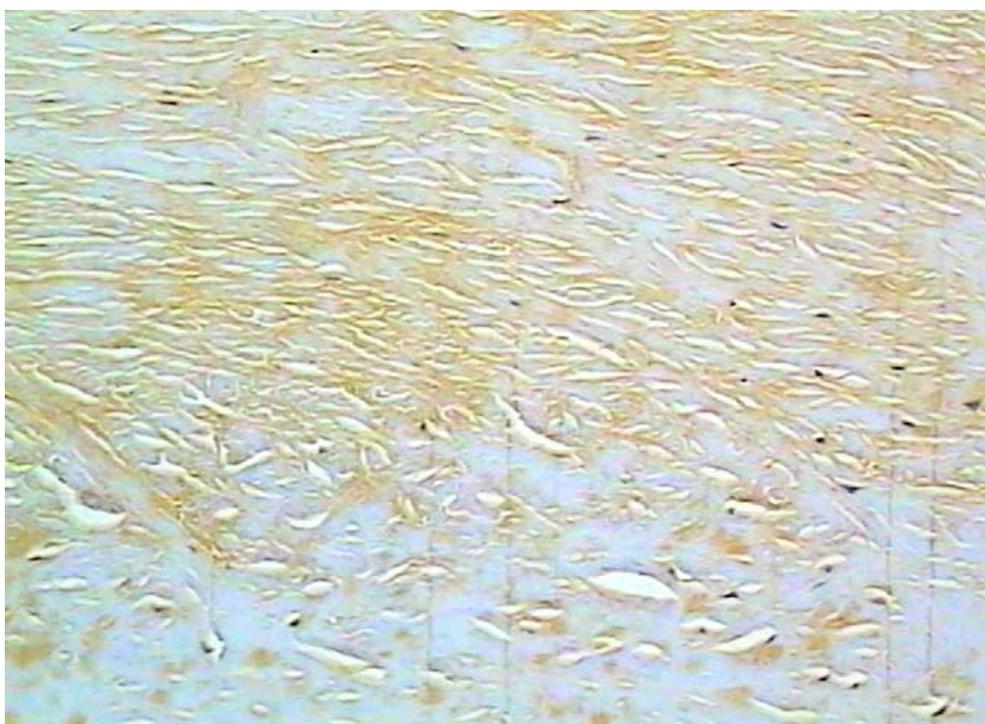


**Figura 6** - Detalhe histológico de fibras reticulínicas coradas em negro (colágeno III), entrelaçadas e misturadas a fibras acinzentadas de colágeno I (reticulina, imersão em óleo, aumento original 1000X) (# 18)

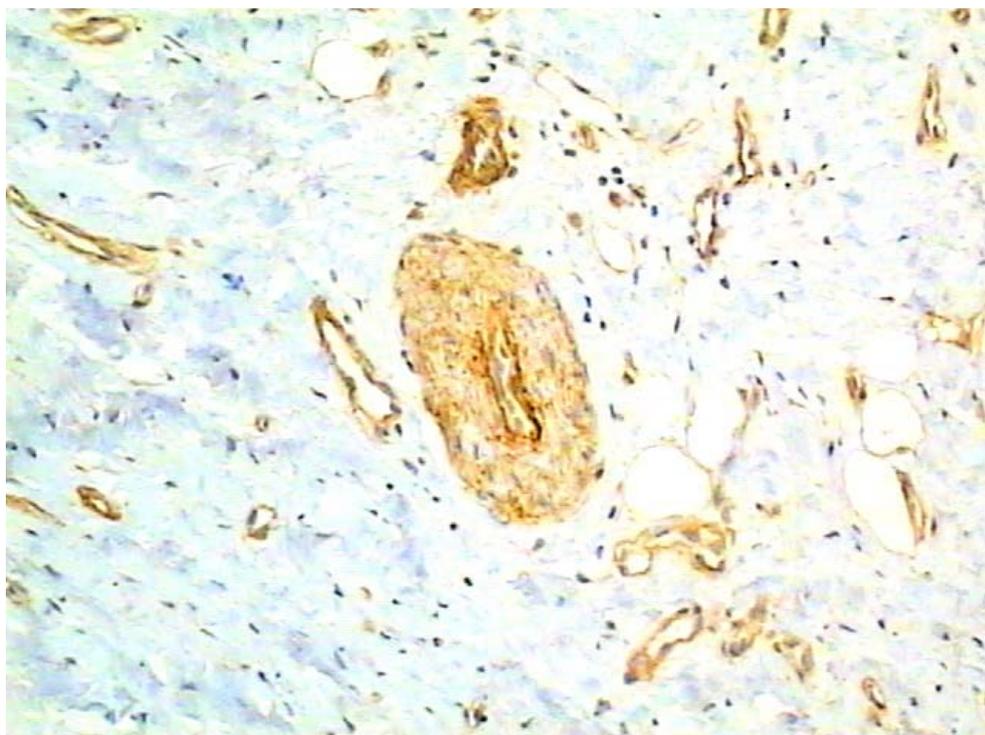
A marcação **imunoistoquímica dos colágenos** foi considerada adequada em 25/31 casos. Foi demonstrada positividade para fibras colágenas tipo I e tipo III, dispostas sem arranjo definido, entrelaçadas entre si, localizadas em toda a espessura da faixa fibrosa endocárdica. A coloração do colágeno tipo I foi mais intensa que a do tipo III em praticamente todos os casos, embora a diferença tenha sido por vezes discreta (Figuras 7 e 8). Para o colágeno I a marcação foi considerada intensa em 5/25 (20%) e moderada em 20/25 (80%) dos casos. Já para o colágeno III a marcação foi considerada moderada em 16/25 (64%) e fraca em 9/25 (36%) dos casos. Em nenhum dos casos foi considerada intensa. Fibras marcadas pelo colágeno IV também estiveram presentes, embora em menor número e apenas em tórno de vasos (Figura 9).



**Figura 7** - Fibras colágenas marcadas por reação imunoistoquímica (DAB) para colágeno I (imunoistoquímica para colágeno tipo I, aumento original: 200X) (# 1)



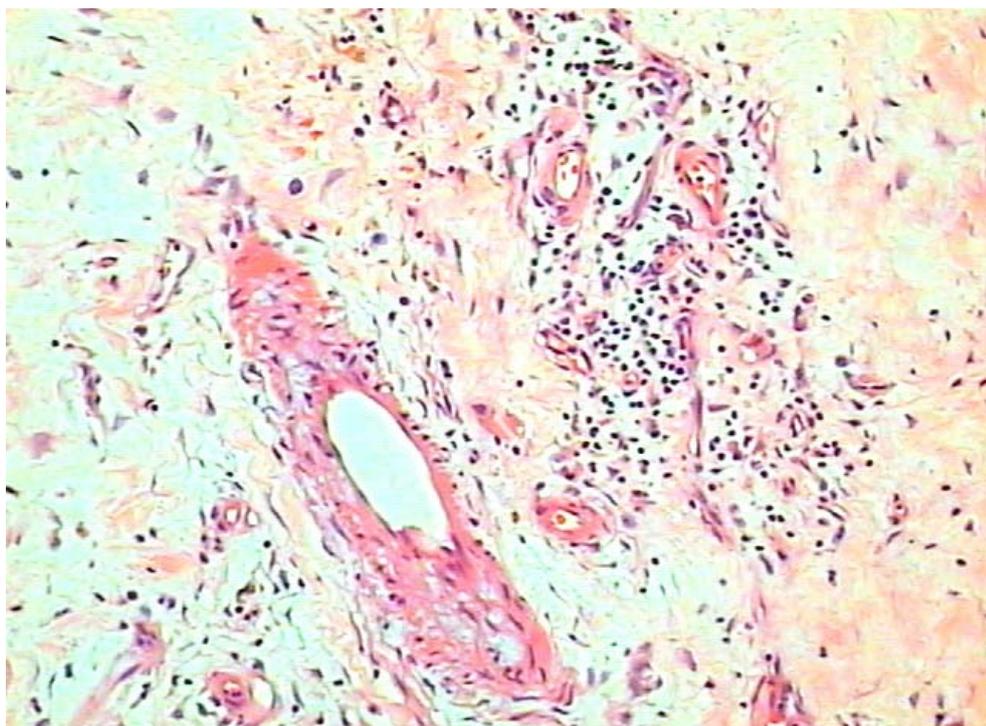
**Figura 8** - Fibras colágenas marcadas por reação imunoistoquímica (DAB) para colágeno III (imunoistoquímica para colágeno tipo III, aumento original: 200X) (# 1)



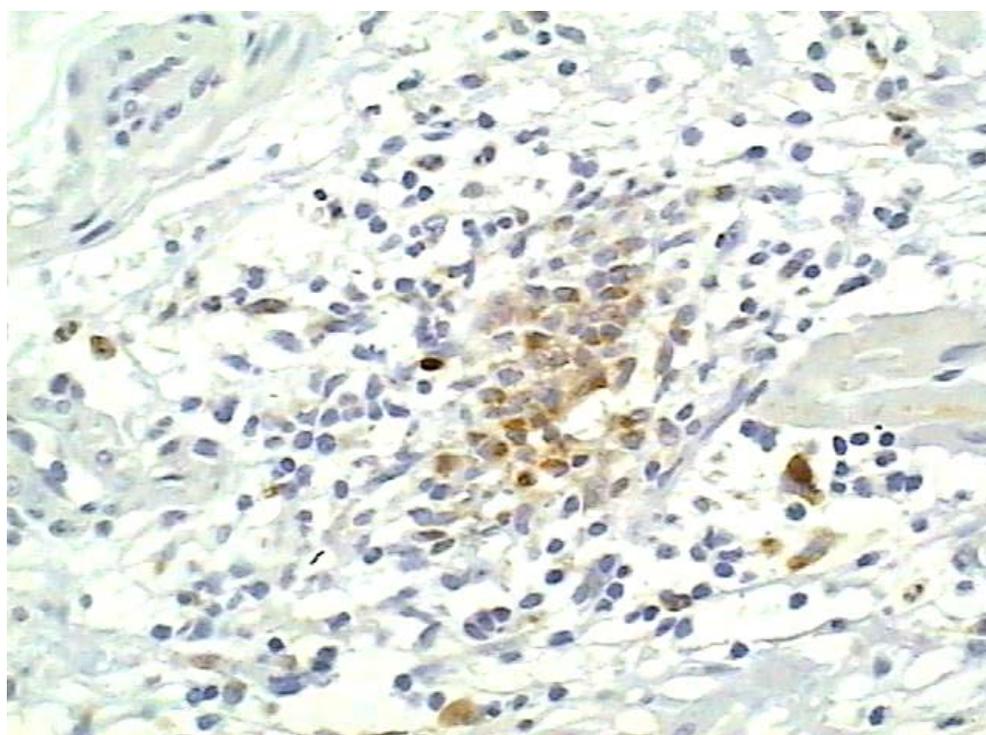
**Figura 9** - Fibras colágenas marcadas por reação imunoistoquímica (DAB) para colágeno IV, evidente apenas em torno de vasos (imunoistoquímica para colágeno tipo IV, aumento original: 200X) (# 20)

#### 4.1.2 Componente inflamatório endocárdico

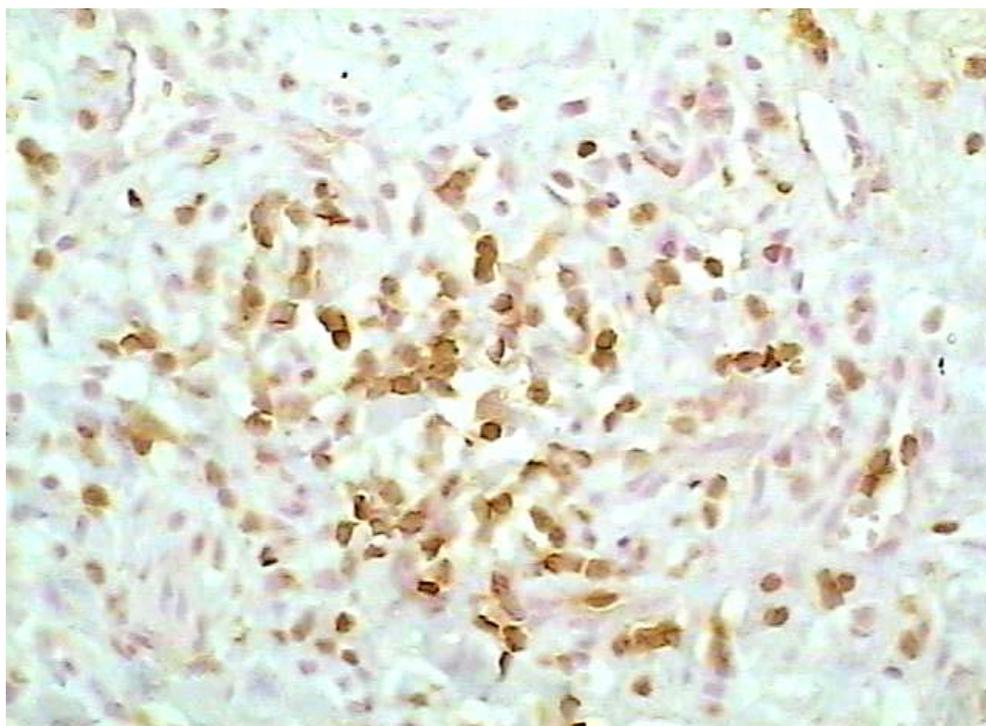
Em todos os casos observou-se **infiltrado inflamatório** crônico na porção profunda do endocárdio, junto ao miocárdio, na maior parte das vezes de grau leve (23/31, 74,1%) ou moderado. O infiltrado apresentou arranjo típico, caracterizado por pequenos grupos celulares em torno de vasos com predomínio de linfomononucleares, sobretudo linfócitos e macrófagos. Os eosinófilos foram bastante raros e apareceram isolados. Não foram identificados outros polimorfonucleares. A marcação imunoistoquímica do infiltrado inflamatório confirmou o predomínio de linfócitos, particularmente de linhagem T, sobre os macrófagos (Figuras 10, 11, 12, 13).



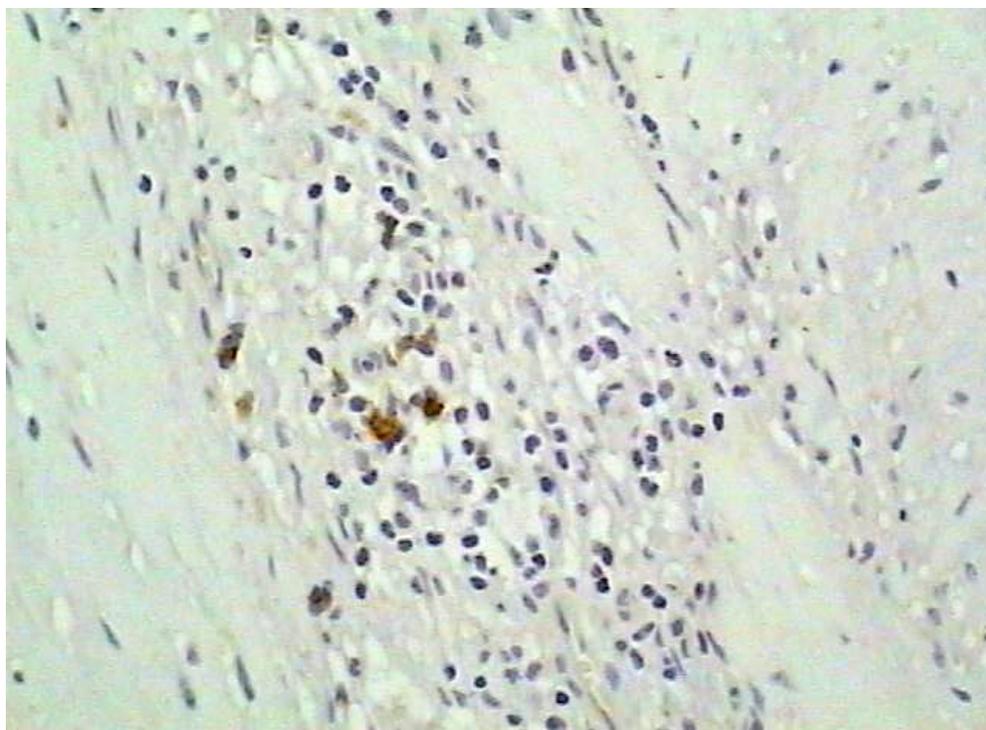
**Figura 10** - Infiltrado inflamatório focal em torno de vasos na faixa de fibrose endocárdica. (HE, aumento original 200X) (# 5)



**Figura 11** - Marcação imunoistoquímica para macrófagos no infiltrado inflamatório endocárdico (CD68, aumento original 400X) (# 5)



**Figura 12** - Marcação imunoistoquímica para linfócitos T no infiltrado inflamatório endocárdico (CD3, aumento original 400X) (# 5)



**Figura 13** - Marcação imunoistoquímica para linfócitos B no infiltrado inflamatório endocárdico (CD20, aumento original 400X) (# 5)

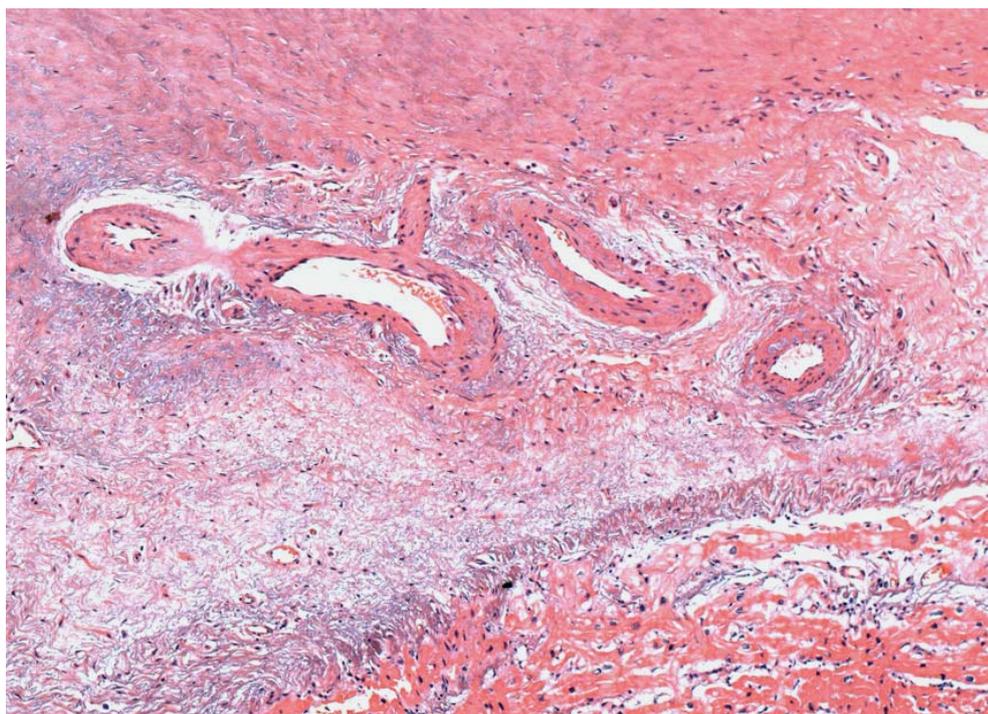
A **avaliação quantitativa das células inflamatórias** em nove casos confirmou o predomínio de linfócitos T (Tabela 4) e de macrófagos. Confirmou-se também a impressão inicial de escassez de eosinófilos no tecido. Tais células só não foram raras no caso # 5, cujo granuloma epitelióide, situado na interface endocárdio-miocárdio, foi incluído na contagem. Encontramos correlação positiva entre o número de macrófagos e o de linfócitos B no endocárdio ( $r = 0,652$ ) (**Anexo E**).

**Tabela 4 - Contagem de células inflamatórias marcadas por imunistoquímica por unidade de área no endocárdio (mm<sup>2</sup>)**

<b>Nº caso #</b>	<b>CD68(macrof.) Nºcels/mm<sup>2</sup></b>	<b>CD3(linf.T) Nºcels/mm<sup>2</sup></b>	<b>CD20(linf.B) Nºcels/mm<sup>2</sup></b>	<b>EOSINÓFILOS Nºcels/mm<sup>2</sup></b>
# 1	160	442	325	7
# 5	802	1687	720	137
# 6	35	82	65	5
# 7	52	267	20	7
# 14	907	1112	850	40
# 16	145	332	217	0
# 18	300	295	175	12
# 21	227	147	117	5
# 25	485	535	252	7
<b>Média ± dp</b>	<b>345,88 ± 319,45</b>	<b>544,33 ± 523,72</b>	<b>304,45 ± 289,67</b>	<b>24,44 ± 43,77</b>

### 4.1.3 Componente vascular endocárdico

Na porção mais profunda do espessamento endocárdico observou-se proliferação vascular exuberante e irregularmente distribuída, envolvida por tecido fibroconjuntivo frouxo. Chamou atenção a presença de vasos muito calibrosos, tortuosos, tanto arteriais como venosos, formando uma rede vascular complexa na profundidade da capa fibrosa, ao lado de vasos menores, por vezes com estrutura de capilares (Figura 14). As mesmas alterações vasculares foram vistas nos septos fibrosos intramiocárdicos. Em várias áreas foram identificados vasos venosos e arteriais permeando o miocárdio, em aparente conexão com o sistema coronariano intramiocárdico (Figura 15).

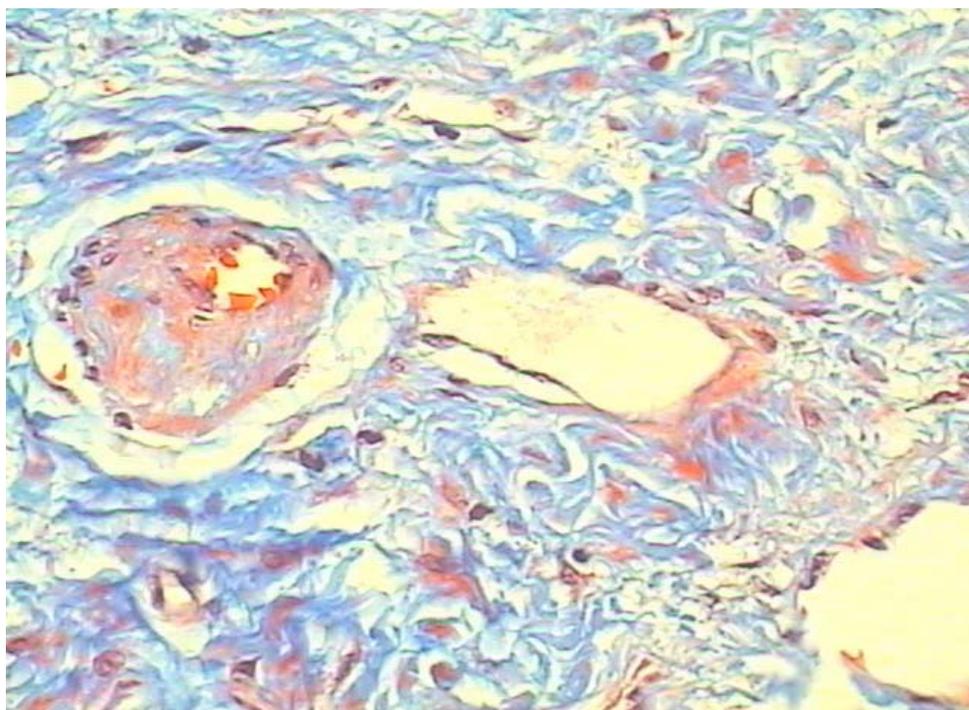


**Figura 14** - Vasos de parede espessa na profundidade da faixa fibrosa endocárdica (HE, aumento original 100X) (# 24)

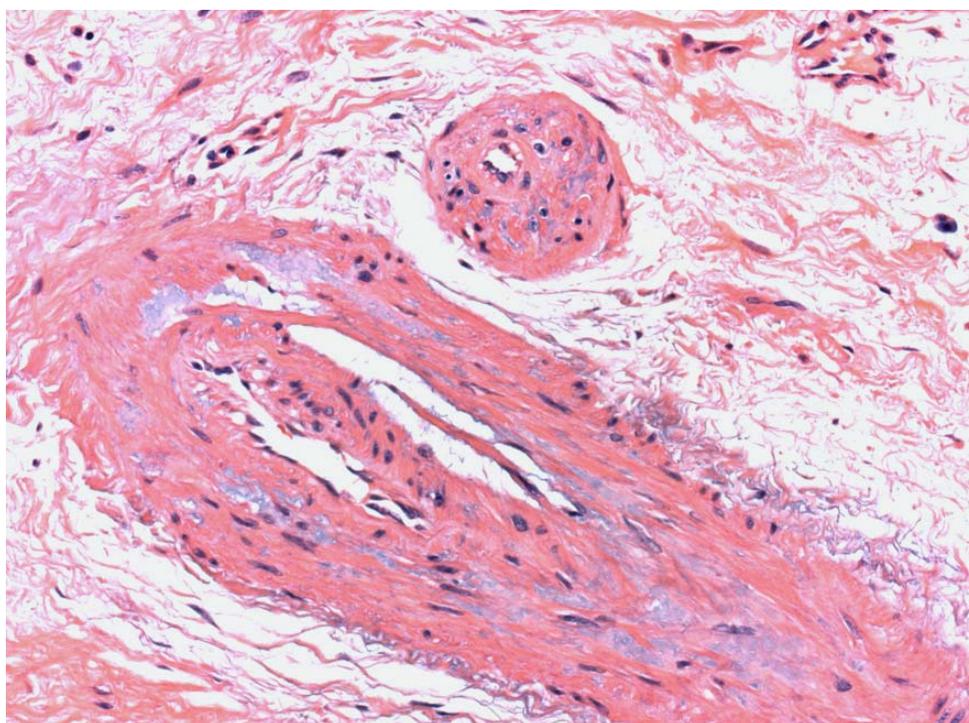


**Figura 15** - Vaso na faixa fibrosa endocárdica permeando o miocárdio em aparente conexão com a rede coronariana intramiocárdica (tricômico de Masson, aumento original 100X) (# 27)

As artérias de pequeno e médio calibre, além de presentes em número muito elevado, exibiram alterações estruturais da parede caracterizadas por hipertrofia concêntrica da camada muscular média e espessamento fibroconjuntivo da parede. Em todos os casos notou-se esclerose de intensidade variável da parede arterial com suposto depósito de mucopolissacárides. Essas alterações foram consideradas de grau intenso, moderado e leve, em respectivamente 18/31 (58%), 12/31 (38,7%) e (1/31) casos. Em 5/31 casos observou-se obstrução parcial do lúmen arterial por fibrose subintimal focal e excêntrica que forma um coxim irregular. Esse aspecto foi visto especialmente em arteríolas próximas de vênulas com espessamento fibroso delicado da parede (Figura 16). Mais raramente foi identificada proliferação endotelial da íntima (2/31, 16%), sempre irregular e discreta. Não foram caracterizados trombos intraluminais recentes, porém em dois casos (2/31, 6,5%) (pacientes # 7 e 9) notou-se banda fibrosa intraluminal em artéria de pequeno calibre, sugestiva de trombose recanalizada (Figura 17). As veias de pequeno e médio calibre de aspecto varicoso, além de proliferação e tortuosidade acentuadas, exibiram fibroesclerose intensa da parede, sem sinais histológicos de trombose. Essas alterações vasculares foram identificadas não só no endocárdio, mas também em vasos dos septos fibrosos que penetram o miocárdio subjacente.



**Figura 16** - Artéria de pequeno calibre com espessamento fibroso intimal irregular excêntrico ao lado de vaso provavelmente venoso (tricômico de Masson, aumento original 400X) (# 20)



**Figura 17** - Artéria de médio calibre com banda fibrosa intraluminal, sugestiva de trombose recanalizada; acima nota-se vaso provavelmente arterial com espessamento fibroso da média (HE, aumento original 200X) (# 24)

Em quatro casos (4/31, 13%), (pacientes # 5, 9, 14 e 28) se observou padrão caracterizado por predomínio de numerosos vasos arteriais e venosos de menor calibre distribuídos difusamente. Os vasos eram acompanhados por infiltrado inflamatório linfomononuclear moderado e difuso, cujos macrófagos continham hemossiderina no citoplasma (Figura 18).

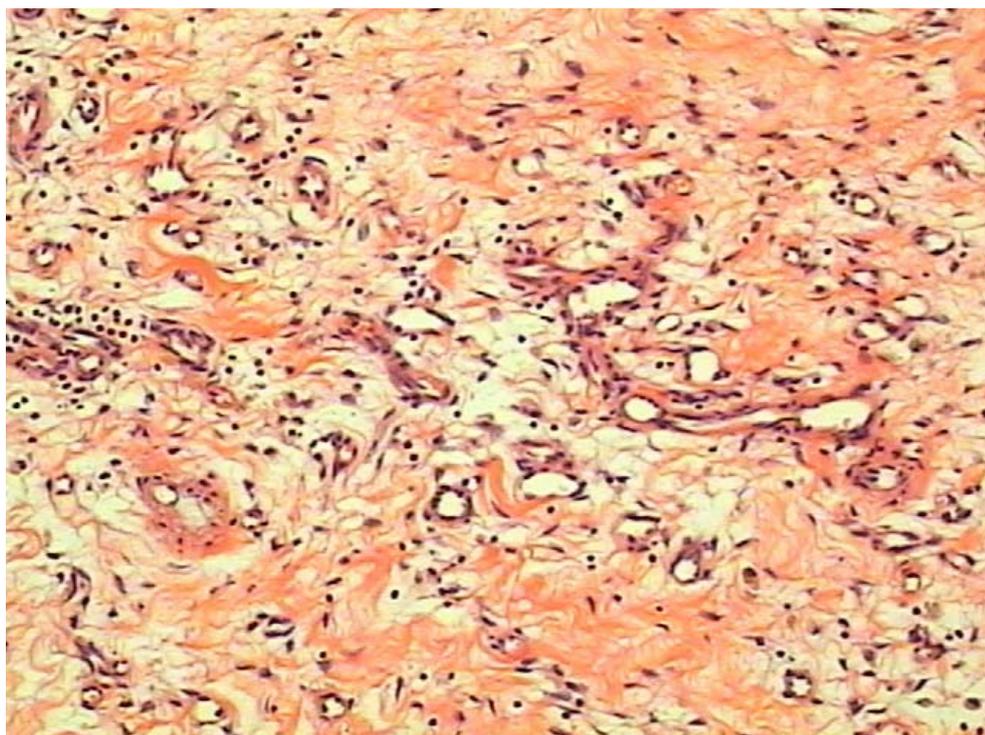
A marcação imunoistoquímica pela podoplanina (D2-40) demonstrou que cerca de 30 % dos vasos observados correspondiam a **linfáticos** e tornou visível uma rede emaranhada de linfáticos de menor calibre, dispostos em grupos irregulares na espessura da lesão fibrosa, muitas vezes sem lúmen patente (Figura 19).

Consta da tabela 5 a avaliação da proporção entre o número de linfáticos e o número de vasos no endocárdio, realizada em oito casos de EMF e em seis casos de lesões fibróticas de outras causas. Nos cortes histológicos realizados em corações normais, os linfáticos não estavam presentes no endocárdio. Eles se tornaram visíveis em pequeno número a partir de um ou dois mm no miocárdio superficial e seu número foi aumentando progressivamente em número nas áreas próximas do epicárdio.

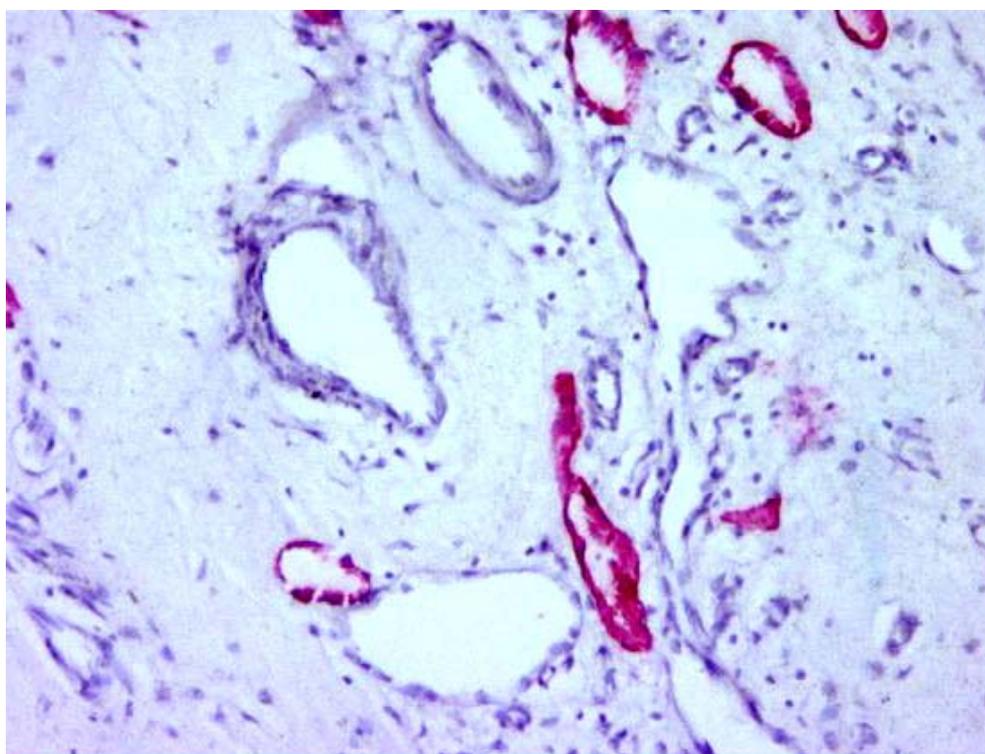
**Tabela 5 - Proporção entre o número de linfáticos marcados por imunoistoquímica e o número de vasos no endocárdio, em porcentagem**

	Nº linfáticos/nº de vasos	porcentagem
<b>EMF (8 casos)</b>	469/1607	29,18%
<b>D. Chagas (3 casos)</b>	81/563	14,3%
<b>Trombo mural (3 casos)</b>	106/587	16,8%

A avaliação quantitativa realizada em 21 casos de EMF revelou em média 62 vasos/mm<sup>2</sup>, fração de área de lúmen vascular (Lv) de 5,85% e porcentagem de parede vascular (Pv) de 13,9%. Esses dados constam do **anexo C**.



**Figura 18** - Faixa fibrosa endocárdica com proliferação de vasos pequeno calibre e infiltrado inflamatório moderado (aumento original: 200X) (# 9)

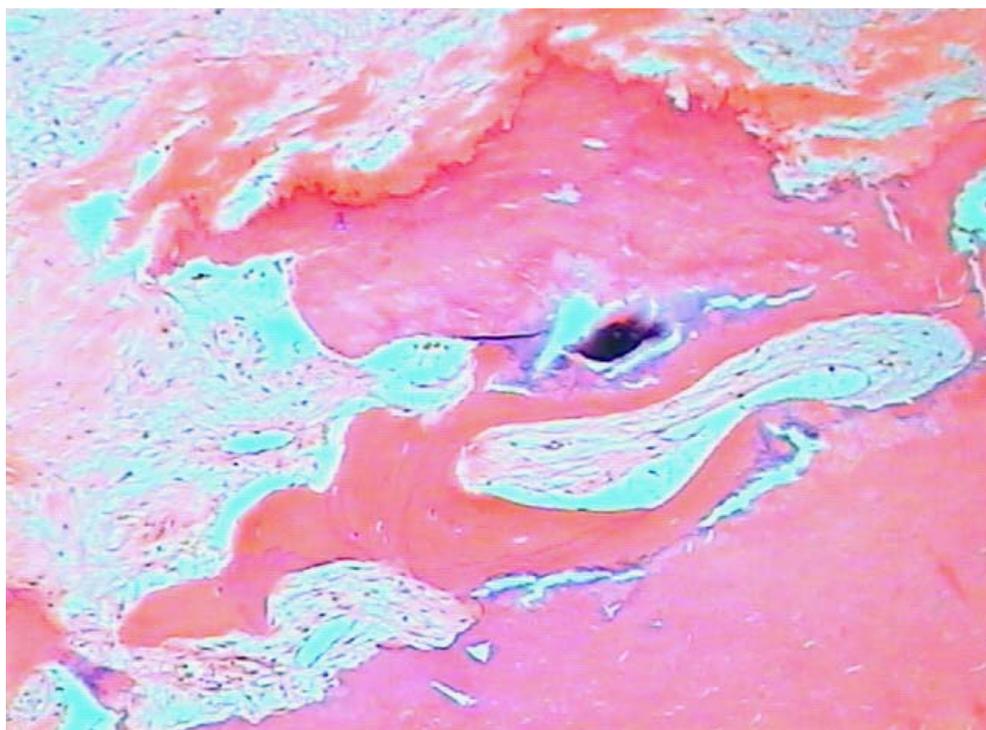


**Figura 19** - Endotélio de linfáticos marcado pela podoplanina (D2-40/fosfatase alcalina) na faixa fibrosa endocárdica (imunoistoquímica, aumento original 200X) (# 25)

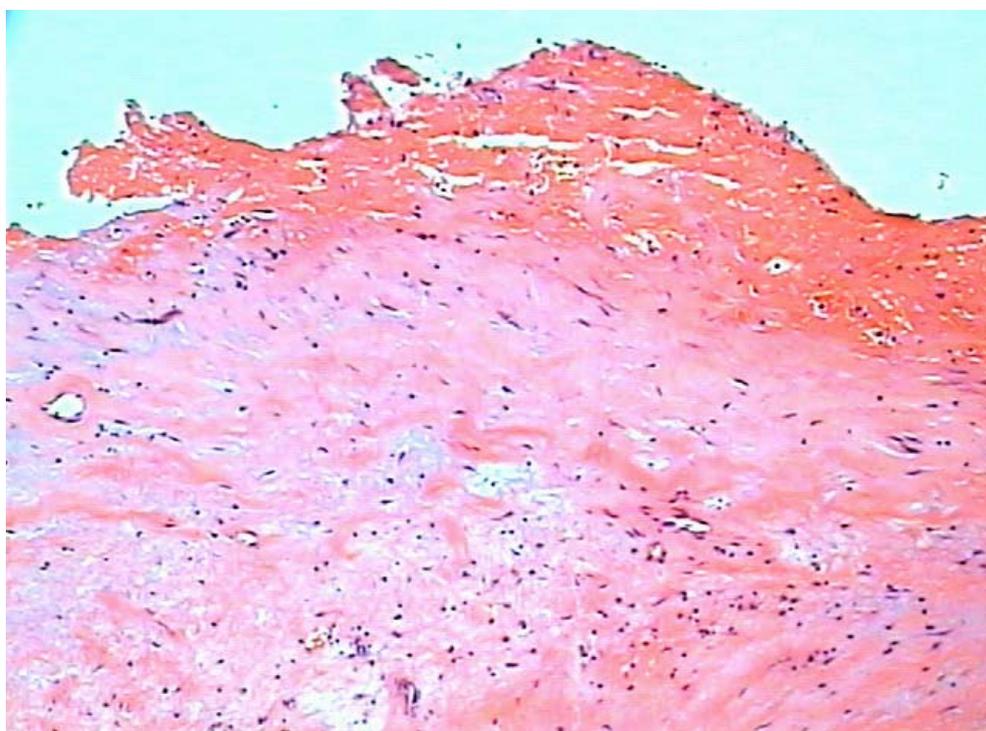
#### 4.1.4 Calcificação e trombose mural endocárdica

Em 11/31 (35%) casos foi identificada **calcificação** irregular e histologicamente grosseira na espessura da faixa fibrosa endocárdica (Figura 20). Em três casos observou-se inclusive metaplasia óssea e adiposa na porção central. Ao exame histológico dois casos do grupo de autópsia (2/9, 22%) apresentaram calcificação que não fora detectada à macroscopia.

Em 19/31 (61%) casos ocorreram **trombos murais** recentes localizados na superfície do endocárdio e constituídos por fibrina com raras células inflamatórias de permeio (Figura 21). Nos casos de autópsia não foi possível avaliar a presença de trombos, uma vez que as peças, já bastante manipuladas, estavam arquivadas há tempos. Por vezes, áreas sugestivas de trombos murais antigos incorporados à lesão endocárdica foram vistas no endocárdio. Estavam delimitadas irregularmente por fibras elásticas e caracterizaram-se por fibrose frouxa com numerosos vasos.



**Figura 20** - Calcificação grosseira na espessura do endocárdio (HE, aumento original 100X) (# 19)



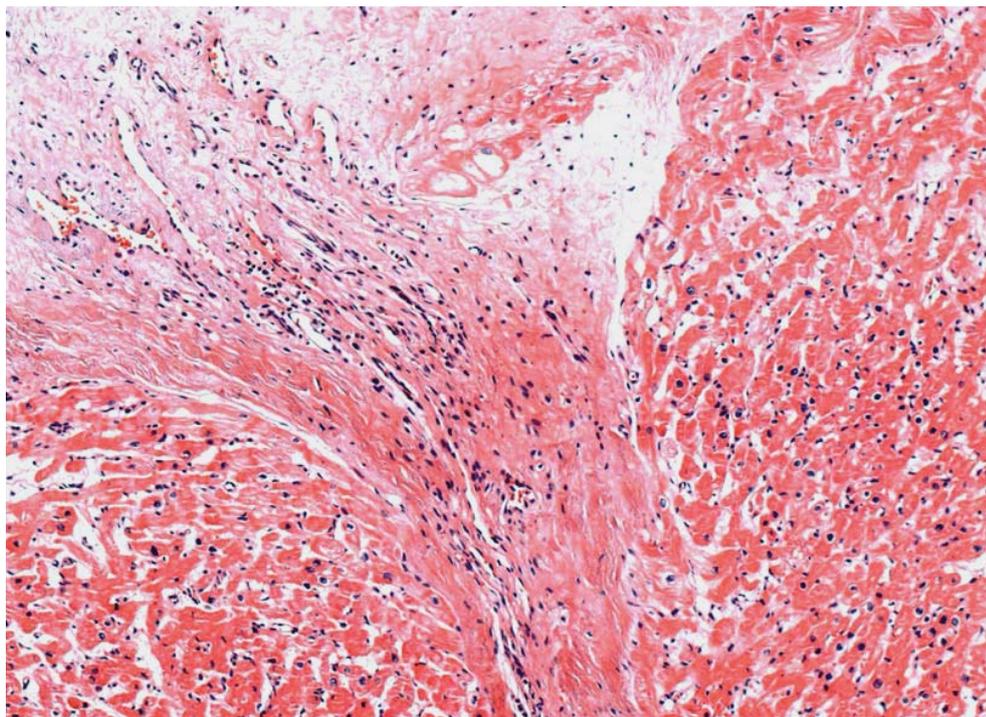
**Figura 21** - Trombo recente de fibrina aderido à faixa fibrosa (HE, aumento original 100X) (# 17)

## 4.2 Análise do miocárdio subendocárdico

Por envolver material de ressecção cirúrgica, a avaliação do miocárdio restringiu-se à porção mais superficial correspondente a 5,0 mm de profundidade.

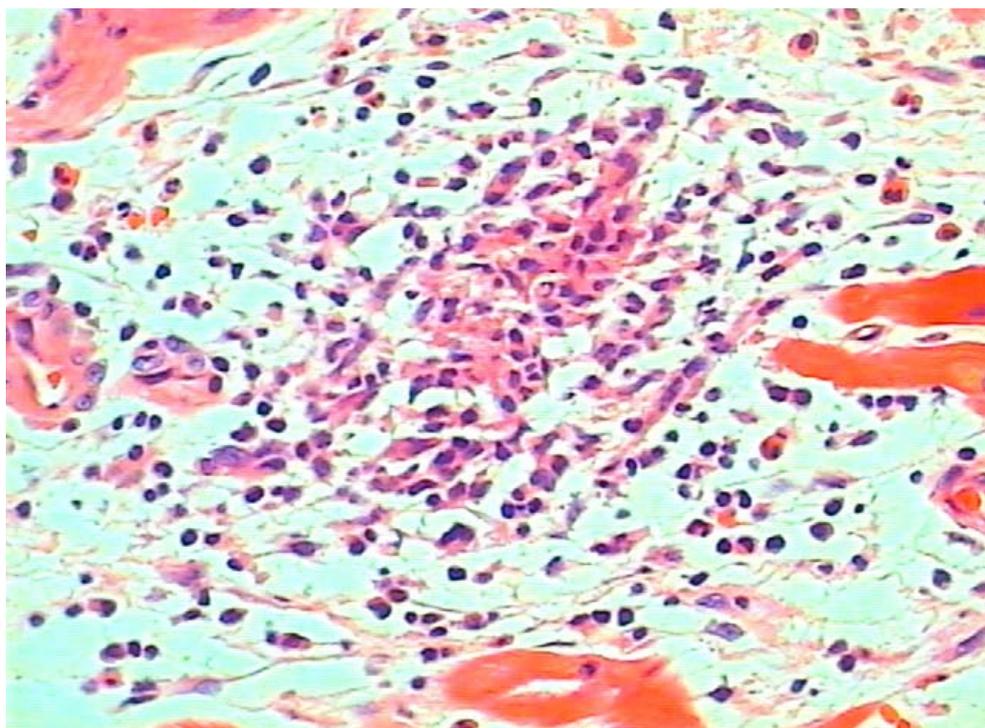
As **fibras miocárdicas** apresentaram sempre algum grau de hipertrofia, em geral leve. A hipertrofia caracterizou-se por núcleos aumentados, irregulares e bizarros, aspecto também presente nos casos de autópsia. Focalmente foram observados sinais degenerativos focais das fibras como vacuolização perinuclear e hialinização do citoplasma. Nenhuma das amostras exibiu agressão direta das fibras miocárdicas por células inflamatórias.

Não foi identificado plano de clivagem nítido na **interface miocárdio/endocárdio**. Em todos os casos a fibrose endocárdica permeou o miocárdio adjacente por meio de traves fibroconjuntivas mais espessas na porção superficial, as quais desapareciam em direção à profundidade (Figura 22). Essas faixas fibrosas estavam acompanhadas por infiltrado inflamatório discreto e por proliferação vascular. Em várias áreas foram identificados vasos permeando o miocárdio.

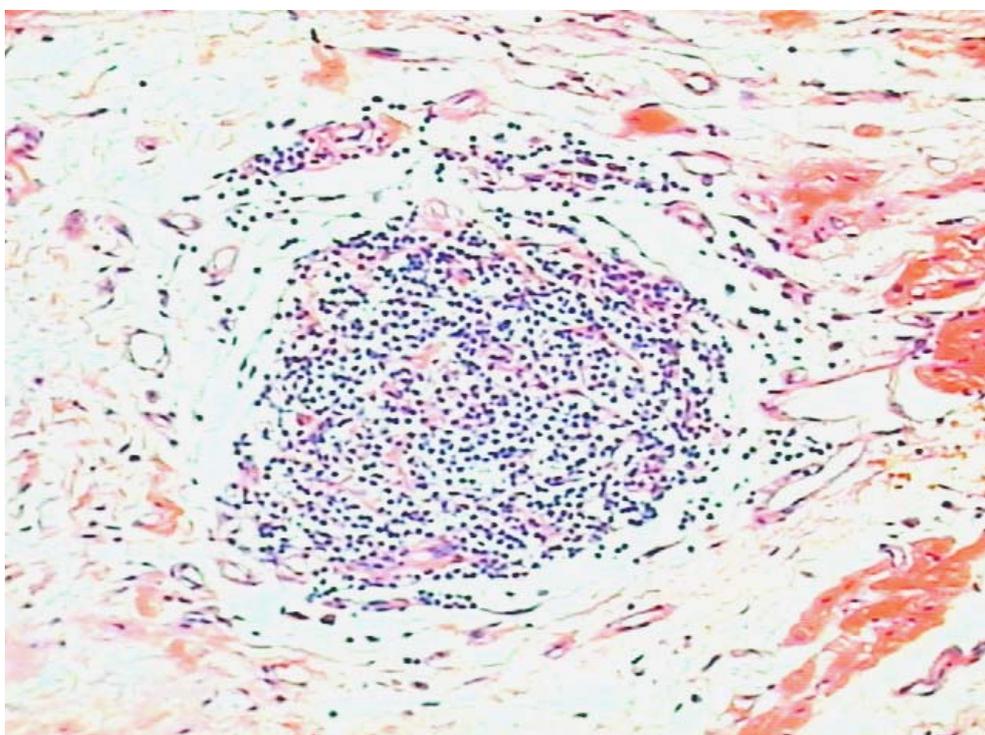


**Figura 22** - Faixa fibrosa endocárdica permeando o miocárdio (HE, aumento original 100X) (# 24)

Em apenas um caso da casuística (1/31, 3,1%) (# 5) foi encontrado granuloma epitelióide mal formado, isolado, localizado na interface endocárdio/miocárdio. Caracterizou-se por poucas células epitelióides com células inflamatórias de permeio, linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, o que caracteriza resposta Th2 (Figura 23). Em outro caso (# 8), na mesma localização, observou-se agregado linfóide isolado (Figura 24).



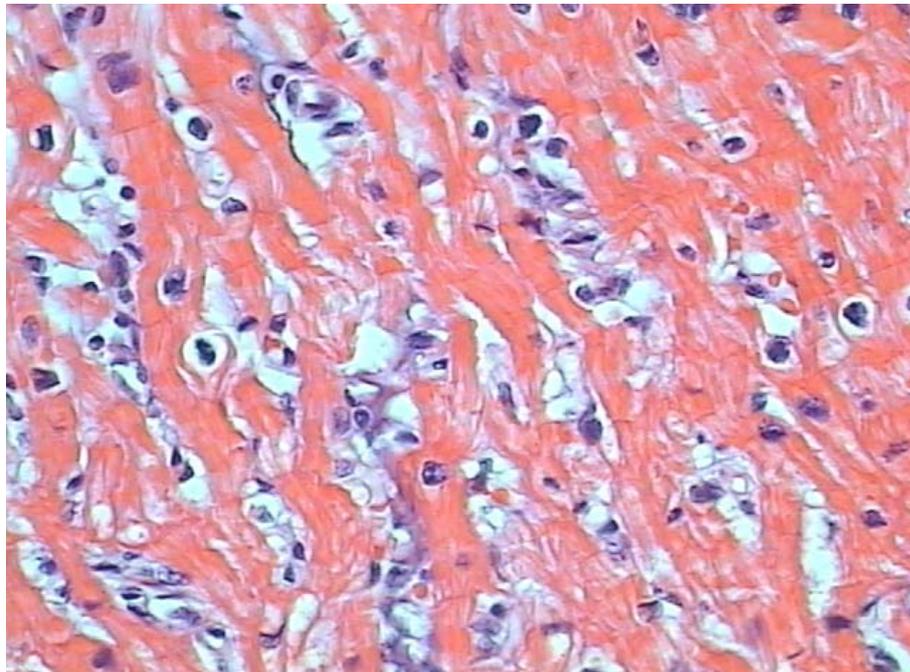
**Figura 23** - Granuloma epitelióide mal formado na interface endocárdio-miocárdio, com eosinófilos e poucas células epitelióides (HE, aumento original 400X) (# 5)



**Figura 24** - Agregado linfóide na interface endocárdio-miocárdio (HE, aumento original 200X) (# 8)

Observou-se discreta **proliferação fibroconjuntiva intersticial** sem positividade para fibras elásticas ou reticulínicas. A marcação imunohistoquímica para os três tipos de colágeno demonstrou o mesmo padrão da faixa fibrosa endocárdica, ou seja, leve predomínio do colágeno I sobre o III e positividade perivascular para o colágeno IV.

Todos os casos apresentaram discreto **infiltrado inflamatório** linfomononuclear intersticial distribuído em pequenos focos esparsos, sem agressão direta às fibras musculares, em todos os casos. Os eosinófilos foram detectados raramente, sempre isolados. Outros polimorfonucleares não foram encontrados. A marcação imunohistoquímica demonstrou o predomínio de histiócitos sobre os linfócitos, confirmando reatividade discreta e difusa de células do sistema monocítico fagocitário (SRE) do miocárdio. À histologia, pelo critério de Dallas [Aretz, 1987], originalmente descrito para avaliação de biópsias endocárdicas, ficou caracterizada miocardite “borderline” em 13 casos (13/31, 42%) (Figura 25).



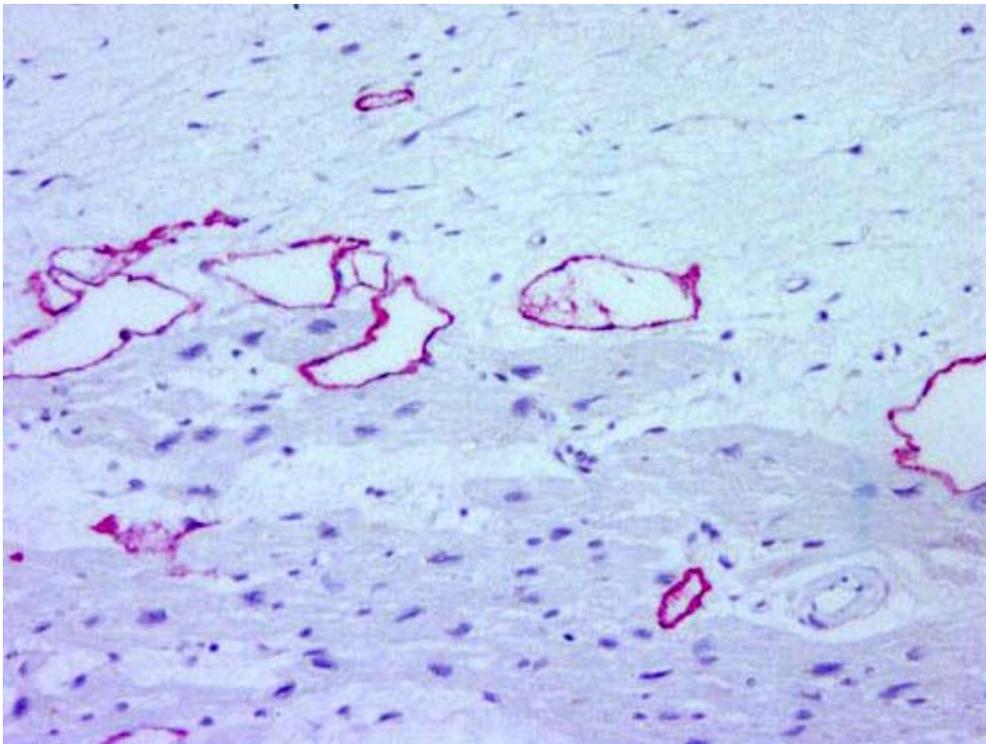
**Figura 25** - Aspecto histológico do miocárdio subjacente à faixa fibrosa endocárdica, com discreto alargamento intersticial e infiltrado inflamatório leve (HE, aumento original 400X) (# 16)

A contagem de células intersticiais marcadas por imunoistoquímica por mm<sup>2</sup> em nove casos aleatoriamente escolhidos, confirmou o predomínio de macrófagos sobre linfócitos em sete casos (7/9). Os dois restantes (pacientes # 1 e 7) apresentaram predomínio de linfócitos de linhagem T (Tabela 6). Confirmou-se também a escassez de eosinófilos, que foram raros, exceto no caso # 14, proveniente de paciente com eosinofilia periférica na época do ato cirúrgico. Encontramos correlação positiva entre o número de macrófagos e o de linfócitos B no miocárdio ( $r = 0,761$ ) e entre o número de eosinófilos no miocárdio e o de linfócitos B no endocárdio ( $r = 0,763$ ) (Anexo E).

**Tabela 6 - Contagem de células inflamatórias marcadas por imunoistoquímica por unidade de área do miocárdio (mm<sup>2</sup>)**

Nº CASO #	CD68(macrof.) Nº cels/mm <sup>2</sup>	CD3(linf. T) Nº cels/mm <sup>2</sup>	CD20(linf. B) Nº cels/mm <sup>2</sup>	EOSINÓFILOS Nº cels/mm <sup>2</sup>
#1	10	120	5	5
#5	230	65	25	5
#6	30	5	0	0
#7	10	60	5	0
#14	35	20	5	35
#16	45	10	10	0
#18	140	5	5	5
#21	95	35	20	0
#25	165	10	15	0
<b>Média ± dp</b>	<b>84,44 ± 78,20</b>	<b>36,66 ± 38,73</b>	<b>9,44 ± 8,81</b>	<b>5,55 ± 11,30</b>

Os **vasos coronarianos intramiocárdicos** superficiais exibiram as mesmas alterações identificadas nos vasos da lesão endocárdica, ou seja, hipertrofia da camada muscular média acompanhada de proliferação fibroconjuntiva de intensidade variável em ramos arteriais e espessamento fibroso da parede nos venosos. A marcação imunistoquímica pela podoplanina demonstrou a presença anormal de vasos linfáticos no miocárdio adjacente à lesão endocárdica (Figura 26).



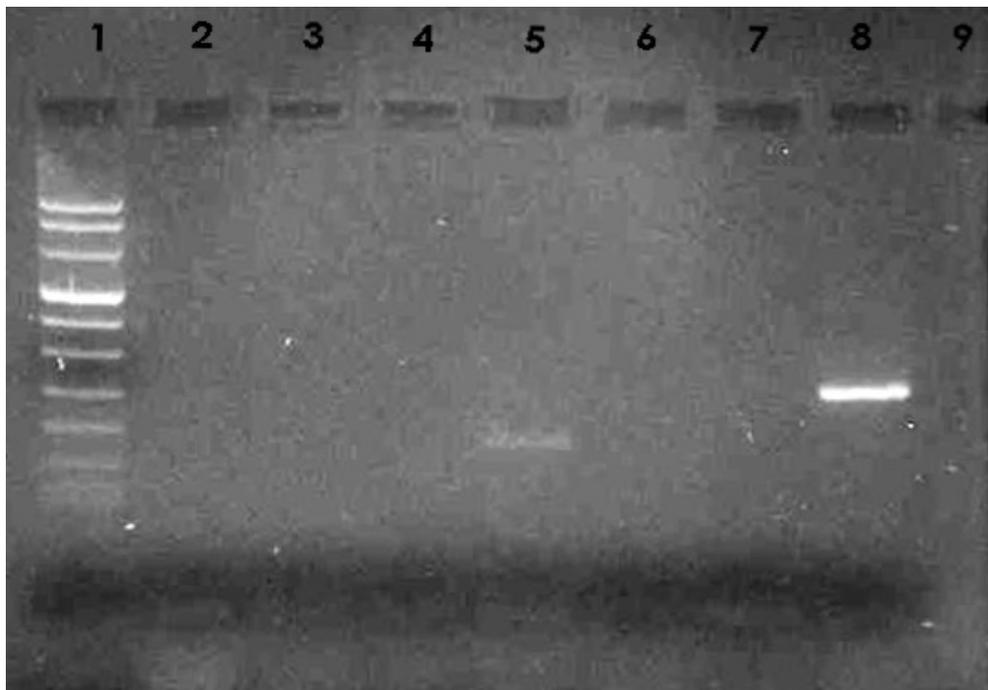
**Figura 26** - Linfáticos marcados pela podoplanina (fosfatase alcalina) permeando o miocárdio subjacente à fibrose endocárdica (imunistoquímica D2-40, aumento original 200X) (# 21)

### 4.3 Pesquisa de agentes infecciosos cardiopáticos

Doze das 36 amostras (33%) iniciais forneceram ácido nucléico suficiente para a realização de PCR (**2º subgrupo**). As doze amostras utilizadas correspondem a material ressecado nos últimos dez anos, tendo sido as demais desprezadas. A obtenção dos ácidos nucléicos foi confirmada por reação de amplificação dos genes  $\beta$ globina para DNA e 3-GPDH para RNA.

As reações de PCR e RT-PCR identificaram genomas infectantes em 6/12 amostras (50%), para o padrão da população normal (sem cardiopatia) de 05%. Duas amostras foram positivas para **enterovirus** (# 14 e 18), duas para **citomegalovirus** (# 7 e 28), uma para **ambos** (citomegalovirus e enterovirus, # 13) e uma para **Toxoplasma gondii** (# 24). As reações foram repetidas para confirmação do resultado positivo (Figura 27). As demais amostras foram negativas (6/12, 50%) (# 5, 10, 16, 20 e 22, e um caso adicional de 1993, com as mesmas características do grupo inicial, incluído posteriormente no grupo). O seqüenciamento genético dos produtos da PCR revelou grande semelhança com os genomas virais humanos padrão (acima de 90%). A análise sequencial dos produtos da PCR positivos para EV (# 13, 14 e 18) foram homólogos em 85 e 90% para diferentes serotipos enterovirais (ie, coxsackievirus, echovirus, poliovirus, enterovirus). A análise sequencial dos produtos da PCR positivos para CMV mostraram a seguinte semelhança: **# 7**: Herpesvirus humano AF413627 cadeia 5 glicoproteína 19A (UL20a) (identidade genética 98,3%); **# 28**: Herpesvirus humano

AF413626 cadeia 5 glicoproteína 17A (UL20a) (identidade genética 99,8%); # 13: citomegalovirus humano X17403 cadeia AD169 (identidade 95,7%). Entretanto, não foi possível realizar o seqüenciamento do produto de PCR positivo para *T.gondii*, provavelmente devido à dificuldade em se trabalhar com material previamente incluído em parafina. As amostras controle não foram positivas para quaisquer dos agentes infecciosos pesquisados.



**Figura 27** - Produto de amplificação de RT-PCR para citomegalovirus (CMV) identificado por eletroforese em gel agarose corado com brometo de etídeo mostrando positividade na coluna 8, 275 bp (coluna 1, marcador de tamanho molecular; coluna 2, controle negativo da reação; colunas 3 até 9 amostras)

## 4.4 Análise de dados clínicos e de exames subsidiários

### 4.4.1 Análise de prontuários

Os dados abaixo relatados referem-se a 29 pacientes da casuística (29/31) cujos prontuários estavam disponíveis (**anexo D**). Nos dois casos restantes (#11 e 12) foram obtidos apenas dados parciais.

**Sexo e procedência:** a amostra foi representada por 25 mulheres (25/31, 80,6%) e seis homens, com idade entre 27 e 72 anos (idade média de 49,67anos  $\pm$  11,94a). Dos 31 pacientes, 15 eram procedentes da região sudeste, três da região sul, 12 das regiões norte e nordeste e um de origem desconhecida. Os pacientes eram provenientes tanto da zona rural como de regiões urbanas, sendo a maioria de classe social baixa.

**Início do quadro clínico:** 16/29 pacientes (55%) apresentaram os primeiros sintomas na fase adulta, na faixa etária compreendida entre 30 e 50 anos. Em sete (7/29, 24,3%) o quadro teve início antes dos 30 anos. Somente os pacientes # 20 e 26 apresentaram os primeiros sintomas antes dos 20 anos. Nos seis casos restantes (6/29) os sintomas se iniciaram depois dos 50 anos.

Cinco pacientes (5/29, 17%) relacionaram o início do quadro clínico ao ciclo gravídico-puerperal (# 1, 8, 13, 16 e 21) e apenas um referiu quadro “gripal” antes dos sintomas cardíacos (#14).

**Quadro clínico:** A manifestação clínica principal foi insuficiência cardíaca congestiva, que se instalou insidiosamente em 20 pacientes (20/29,

69%) e se caracterizou por dispnéia progressiva aos esforços físicos, edema de membros inferiores e/ou aumento de volume abdominal. Nove pacientes (9/29, 31%) apresentaram ascite na evolução, que em dois deles foi considerada o principal sintoma (# 6 e 20). Os demais pacientes (9/29, 31%) eram assintomáticos quando manifestaram quadro clínico súbito. Quatro deles apresentaram dor precordial atípica, três, arritmia cardíaca e dois, tromboembolismo pulmonar. Todos eles vieram a apresentar sinais de insuficiência cardíaca durante a evolução clínica.

A dor precordial atípica, i.e., não relacionada a esforço físico, foi relatada por 15 pacientes durante alguma fase da evolução clínica (15/29, 51,7%). Em dois foi considerada sintoma principal (4/29, 13,8%) (pacientes # 9 e 22); nos demais, sintoma secundário. Além de não estar relacionada a esforço físico, a dor se manifestava em episódios de início súbito, sem irradiação. Além disso, vinha acompanhada de outras características variáveis, manifestando-se por opressão ou pontada. Tinha duração variável de minutos até dias, não sendo aliviada por medicação ou mudança postural. Em todos os pacientes constatou-se comprometimento de ventrículo esquerdo: em 53% dos pacientes (8/15) o comprometimento era biventricular e nos demais era isolado.

Outros sintomas secundários freqüentes foram: arritmias (7/29, 24,3%), dispnéia paroxística noturna (2/29, 6,9%) e acidente vascular cerebral transitório (2/29).

Como **doenças associadas**: Dois pacientes apresentaram esquistosomose hepato-esplênica em tratamento (# 26 e 28); dois,

obesidade mórbida associada à diabetes mellitus com alteração de enzimas hepáticas, e três, hipertensão arterial sistêmica. Sete pacientes (7/29) apresentaram hipotireoidismo durante a evolução da doença, o qual estava relacionado ao uso prolongado de antiarrítmico (amiodarona) em dois deles. Dois pacientes apresentaram positividade para vírus da hepatite B e um para hepatite B concomitante com o vírus C (# 3 e 28, respectivamente). A pesquisa para Doença de Chagas foi negativa em todos os pacientes.

Foram identificadas as seguintes situações clínicas possivelmente associadas à eosinofilia periférica: alergia a medicamentos (2/29) e asma e rinite alérgica (2/29). Uma paciente apresentou Síndrome Hipereosinofílica em tratamento havia quatro anos quando da manifestação dos sintomas cardíacos (# 16). Em três pacientes (3/29) constatou-se parasitose intestinal no pré-operatório (*E. nana*, *A. lumbricóides*, *S. estercoralis* e *E. histolytica*), a qual foi prontamente tratada.

Dentre as **doenças progressas**, o caso # 3 referiu doença reumática na infância com seqüela em valva mitral, tendo sido submetida à substituição valvar 21 anos antes do quadro cardíaco restritivo. Um paciente referiu toxoplasmose (# 16), dois relataram sarampo e caxumba (# 20 e 23) e outro, malária na região de origem (# 14).

**Exames laboratoriais:** em hemogramas realizados durante o seguimento ambulatorial, foi constatada em 14 pacientes (14/29, 45%) eosinofilia periférica em picos transitórios, variando entre 564 e 1932 cels/mm<sup>3</sup> em números absolutos (valores acima de 6%). Em 9/14 casos a eosinofilia atingiu valores máximos acima de 10% (maior índice de 29%,

# 28, com pico de 1247 eosinófilos/mm<sup>3</sup>). A paciente portadora de Síndrome Hipereosinofílica em tratamento com imunossupressor apresentou eosinófilos oscilando em torno de 6% (# 16). Os demais pacientes apresentaram eosinófilos dentro dos padrões da normalidade.

A grande maioria dos pacientes foi acompanhada clinicamente em ambulatório por um período variável entre seis meses e 31 anos (média 11,6 ± 8,66 anos), em geral com boa resposta ao tratamento clínico por período longo. O tratamento cirúrgico foi indicado a partir do momento em que se instalou quadro clínico de insuficiência cardíaca congestiva refratária à medicação (classe funcional III ou IV-NYHA). Dezesesseis pacientes (16/29, 55%) foram submetidos a tratamento cirúrgico dez ou mais anos após o início do quadro clínico. Apenas cinco pacientes (5/29, 17,2%) (# 5, 14, 17, 25 e 28) foram operados antes de se completarem dois anos de evolução da doença.

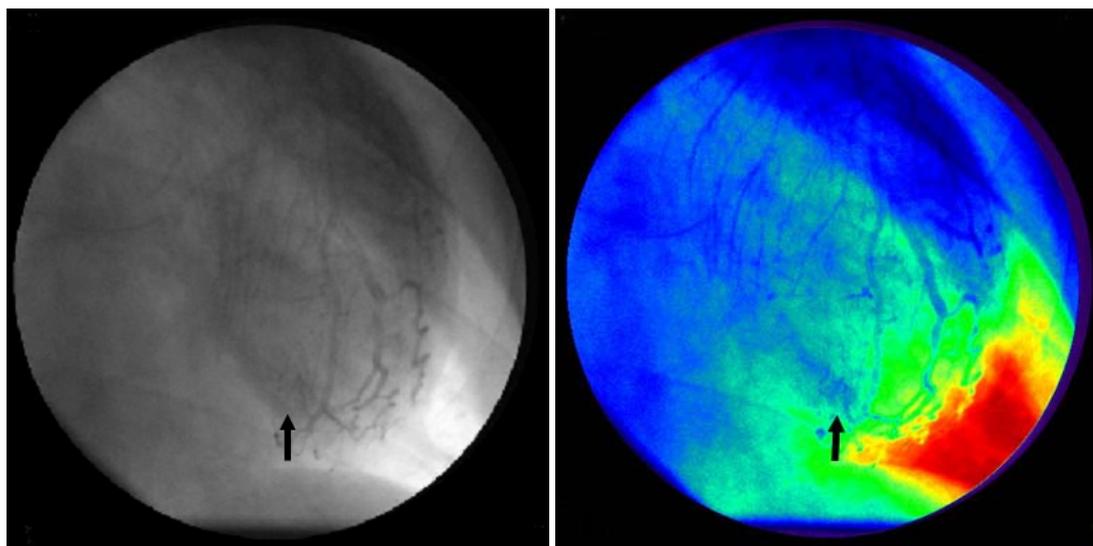
Todos os pacientes foram submetidos à ressecção de endocárdica ventricular segundo a técnica descrita por Oliveira et al (1990). Em 14 deles (14/31, 45%) foi ressecado apenas o ventrículo esquerdo, em 13 foram ressecados ambos os ventrículos (13/31, 42%) e em quatro, somente o ventrículo direito (4/31). Frequentemente o procedimento foi acompanhado por plastia valvar, sendo oito de valva mitral isolada (8/31), sete de valva tricúspide isolada (cirurgia de DeVega) (7/31) e 14 plastias bivalvares (14/31, 45%). Em dois pacientes foi necessária a troca de valva mitral por prótese biológica (# 3 por doença reumática operada previamente e no # 14 por acidente durante o ato operatório). Um terceiro paciente foi submetido concomitantemente à revascularização do miocárdio com interposição de ponte de safena para coronária direita por obstrução vascular de 50% (# 2).

**Evolução pós-operatória:** seis pacientes nessa casuística (6/31, 19,3%) faleceram entre o segundo e o 63º dia de pós-operatório por intercorrências relacionadas ao ato cirúrgico. Os demais (25/31, 81%) tiveram alta hospitalar em melhores condições clínicas imediatas. Cinco pacientes voltaram aos locais de origem, com destino ignorado. O restante (20/31, 64,5%) foi acompanhado por um período de tempo variável entre seis meses e 11 anos. Dois faleceram em menos de dois anos do pós-operatório por motivos não relacionados diretamente à doença. Seis pacientes (6/20, 30%), apesar de melhora inicial dos sintomas, apresentaram deterioração clínica progressiva para classe funcional III ou IV (NYHA). Três deles faleceram num período compreendido entre seis meses e quatro anos de pós-operatório e os outros três foram reoperados (# 6, 10 e 13). Com relação aos pacientes reoperados, o primeiro apresentou piora acentuada da ascite e foi submetido a transplante cardíaco três anos após a primeira cirurgia, com sucesso. O segundo foi submetido a plastias valvares quatro anos após a primeira cirurgia, vindo a falecer no 39º dia de pós-operatório. Seis anos após a primeira cirurgia, o terceiro paciente foi submetido a nova ressecção de ventrículo esquerdo, por suspeita de recidiva da doença. A cirurgia foi acompanhada de troca de valva mitral e plastia de valva tricúspide, com sucesso.

Os demais pacientes (12/20, 60%) apresentaram melhora das condições clínicas e regressão da insuficiência cardíaca para classe funcional I ou II (NYHA) no pós-operatório tardio, na vigência de tratamento clínico adequado. Permaneceram alguns sintomas, como arritmias, dor precordial e dispnéia. A dor precordial atípica persistiu em quatro casos, sendo que dois pacientes referiram piora do quadro doloroso após a cirurgia (# 19 e 22), sem resposta à medicação vasodilatadora.

#### 4.4.2 Análise de cineangiocoronariografias

Os 16 exames revistos apresentaram as alterações clássicas e diagnósticas de EMF, ou seja, alterações decorrentes do preenchimento intracavitário por fibrose, que levam à distorção ventricular e à insuficiência valvar. O fluxo sanguíneo através das artérias coronárias epicárdicas estava preservado em todos os casos. As alterações de microcirculação, caracterizadas por retardo de enchimento coronariano e “borramento” da circulação coronariana terminal (“blush”) estiveram presentes em nove pacientes (9/16, 56,5%) (# 13, 14, 16, 22, 23, 24, 26, 28 e 31). Em cinco deles, essas alterações estavam presentes em área de irrigação de coronária direita e em quatro, em área de irrigação de coronária esquerda (Figuras 28 e 29). Nos demais (7/16, 43,5%) não foram detectadas alterações vasculares em circulação terminal.



**Figuras 28 e 29** - Cineangiocoronariografia em oblíqua anterior direita mostrando “blush” vascular no território distal do ramo interventricular anterior da coronária esquerda (seta) de paciente com EMF isolada em ventrículo direito. A mesma imagem é vista em branco e preto e em colorido (# 31)

## 4.5 Correlações clinicopatológicas

### 4.5.1 Características clinicopatológicas do 1º subgrupo

A avaliação histológica das amostras do 1º subgrupo, pacientes com dor precordial atípica e/ou “blush” à cineangiocoronariografia (n=21), não mostrou particularidades à microscopia óptica comum. Foi realizada avaliação quantitativa dos vasos na faixa endocárdica, cujos dados completos constam no **anexo C**.

A correlação entre o número de pacientes com dor precordial e o aparecimento de “blush” à cineangiocoronariografia demonstrou que dos nove pacientes cujo exame de imagem exibiu “blush”, sete apresentaram sintoma clínico de dor precordial atípica concomitante (7/9) (# 13, 14, 16, 22, 23, 24 e 28). Tais alterações vasculares não foram detectadas nos demais casos (2/9) (Tabela 7).

**Tabela 7 - Correlação entre o número de pacientes com dor precordial e o aparecimento de “blush” na cineangiocoronariografia**

Cineangiocoronariografia	Dor precordial presente	Dor precordial ausente
“blush” presente	7 pacientes	2 pacientes
“blush” ausente	2 pacientes	4 pacientes

Seis pacientes da casuística (6/29) apresentavam queixa de dor precordial, porém os exames cineangiocoronariográficos não estavam acessíveis para avaliação.

Constam da tabela 8 os dados das avaliações quantitativas referentes aos vasos da faixa endocárdica retratados em cineangiocoronariografias com e sem “blush”. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos de pacientes com e sem “blush” detectado à cineangiocoronariografia quanto às características histológicas vasculares (nº de vasos/mm<sup>2</sup>, fração de área de luz vascular e percentagem de espessura da parede vascular) (**Anexo E**).

**Tabela 8 - Dados quantitativos (média e desvio padrão) dos grupos de pacientes com e sem “blush” à cineangiocoronariografia**

	Cine com “blush” (n=9)	Cine sem “blush” (n=7)
<b>Nº vasos/mm<sup>2</sup></b>	66,77 ± 24,60	58,67 ± 27,78
<b>Fração de área Lv (%)</b>	5,51 ± 1,74	5,77 ± 2,20
<b>Espessura Pv (%)</b>	13,19 ± 3,83	13,80 ± 4,90

Lv= lúmen vascular; Pv = parede vascular

Constam da tabela 9 os dados das avaliações quantitativas referentes aos vasos da faixa endocárdica em relação aos pacientes com e sem dor precordial atípica. Não foi detectada diferença estatística entre os grupos de pacientes com e sem dor precordial atípica quanto às características histológicas vasculares (nº de vasos/mm<sup>2</sup>, fração de área de luz vascular e percentagem de espessura da parede vascular) (**Anexo E**).

**Tabela 9 - Dados quantitativos (média e desvio padrão) dos grupos de pacientes com e sem dor precordial**

	<b>Pacientes com dor precordial (n = 15)</b>	<b>Pacientes sem dor precordial (n = 5)</b>
<b>Nº vasos/mm<sup>2</sup></b>	68,43 ± 23,80	53,56 ± 20,58
<b>Fração de área Lv (%)</b>	5,63 ± 2,83	5,74 ± 1,75
<b>Espessura Pv (%)</b>	13,44 ± 6,24	13,76 ± 3,93

Lv= lúmen vascular; Pv = parede vascular

#### **4.5.2 Características clinicopatológicas do 2º subgrupo**

Constam das tabelas 10 e 11 as principais características clinicopatológicas dos pacientes positivos e negativos para genomas infecciosos. Nas amostras referentes a esses pacientes foi realizada a pesquisa de agentes infecciosos cardiotrópicos por PCR e RT-PCR (n=12) (2º subgrupo). Fazem parte desse subgrupo os # 5, 7, 10, 13, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28 e o caso adicional (ex).

**Tabela 10 - Características clinicopatológicas dos pacientes do 2º subgrupo**

#	sexo	idade	eos	Δt(a)	ventr.	MS	CF	End(mm)	infl	Ag infec
ex	F	42	+	2	VE+VD	-	-	2,92	-	-
5	M	69	-	0,5	VE+VD	-	-	2,47	+	-
7	F	42	-	10	VE	-	-	2,76	-	CMV
10	F	48	-	5	VE	-	+	2,94	-	-
13	F	44	-	11	VE+VD	-	+	2,70	-	EV+CMV
14	M	32	+	1	VE+VD	+	NA	2,52	+	EV
16	F	48	+	20	VE+VD	-	-	2,72	-	-
18	F	61	+	18	VE+VD	-	-	3,39	-	EV
20	M	34	-	16	VE	-	+	3,89	-	-
22	F	54	+	22	VE	-	-	3,81	-	-
24	F	55	-	15	VE	-	-	3,39	-	<i>T.gondii</i>
28	M	52	+	2	VE+VD	+	NA	2,78	+	CMV

Legendas: eos = eosinofilia, Δt = tempo entre o início dos sintomas e o ato cirúrgico, ventr = ventrículo acometido pela fibrose, MS = morte súbita, CF = deterioração da classe funcional em 3/ 4 anos, end = espessura do endocárdio, infl = infiltrado inflamatório moderado com tecido de granulação, M = masculino, F = feminino, NA = não aplicável, EV = enterovirus, CMV = citomegalovirus,

**Tabela 11 - Resumo das características clinicopatológicas dos pacientes positivos e negativos para agentes infecciosos cardiopáticos (n=12)**

Características clinicopatológicas	Pacientes positivos p/ genomas infecciosos	Pacientes negativos p/ genomas infecciosos
Sexo feminino	4/6 (67%)	4/6 (67%)
Idade (anos)	48 ± 10	49 ± 12
Eosinofilia periférica	4/6 (67%)	2/6 (33%)
Tempo de doença (anos)	9,5 ± 6,8	10,9 ± 9,5
EMF bilateral	4/6 (67%)	3/6 (50%)
Morte súbita após cirurgia	2/6 (33%)	0/6 (0%)
Piora de função cardíaca em 3 ou 4 anos	1/4 (25%)	2/6 (33%)
Espess. max do endoc (mm)	2,9 ± 0,4	3,1 ± 0,6
Infiltr inflam proeminente no endomiocárdio	2/6 (33%)	1/6 (17%)

A eosinofilia periférica nesse subgrupo foi detectada em 6/12 pacientes (41%), oscilando entre 552 e 1932 eosinófilos/mm<sup>3</sup>, quatro deles entre os pacientes positivos para agentes infecciosos. A paciente adicional apresentou púrpura pigmentosa crônica em tratamento. O tempo entre o início dos sintomas e o ato cirúrgico variou entre 0,5 e 22 anos (média 10.2 ± 7,9).

Todos os pacientes do 2º subgrupo tiveram alta hospitalar, sendo que os # 14 e 28 tiveram morte súbita 12 meses e dois meses após a cirurgia, respectivamente. Houve severa deterioração da função cardíaca no seguimento de longo prazo (3 ou 4 anos) em 3/10 pacientes (30%), sendo que os # 10 e 13 foram reoperados após 3 e 6 anos, respectivamente.

Do ponto de vista histológico as amostras do 2º subgrupo exibiram as alterações típicas da doença. Calcificação e trombose recente foram identificadas em 3/12 (25%) e 8/12 (67%). Em 3/12 (25%) amostras foi identificado infiltrado inflamatório moderado com proliferação vascular de vasos pequenos e hemossiderina em macrófagos, caracterizando tecido de granulação no endocárdio. Esses casos apresentaram menor tempo de evolução da doença (1,17 ± 0,76 anos) em relação aos pacientes sem essa característica (13,22 ± 6,76 anos). Não se observou agressão direta de fibras miocárdicas por células inflamatórias, mas em 5/12 casos foi identificada reatividade do sistema retículo-endotelial intersticial, todos eles positivos para genomas infecciosos.

Não foram encontradas diferenças, quer do ponto de vista clínico quer anatomopatológico, entre os dois grupos de pacientes, quanto aos itens idade, sexo, tempo de doença, eosinofilia periférica, doença bilateral e tecido de granulação no endocárdio.

# 5

## **5. DISCUSSÃO**

---

O aspecto macroscópico que mais chamou a atenção na EMF foi a fibrose, não só pela intensidade e distribuição particulares, como pela incrível capacidade de retrain o miocárdio adjacente e assim restringir o volume da cavidade cardíaca. Nisso a EMF se diferencia de outras cardiopatias que, embora também apresentem fibrose endocárdica intensa, não evoluem com restrição ventricular, tais como a fibroelastose, a lesão de ponta da Doença de Chagas e o trombo mural pós-infarto isquêmico. É esse sem dúvida o aspecto que mais chamou a atenção de médicos ingleses em meados do século passado e os alertou para o fato de estarem diante de uma nova doença.

Do ponto de vista histológico, a associação de três elementos com aspecto, intensidade e distribuição característicos (fibrose, infiltrado inflamatório e proliferação vascular) foi típica e possibilitou **o diagnóstico seguro de EMF em material de ressecção cirúrgica.**

## 5.1 Fibrose endocárdica

Sendo a fibrose o elemento mais marcante, mereceu também nossa atenção inicial.

À histologia os aspectos característicos foram a alternância de áreas fibróticas densas hialinas com áreas frouxas edemaciadas na profundidade e a riqueza de fibras elásticas. Estas últimas estavam entrelaçadas e distribuídas de forma desordenada, porém com duas faixas de reforço nítido: uma junto ao miocárdio e outra no limite interno da cavidade, talvez em resposta à intensa pressão interna do sangue no interior da cavidade ventricular. Foi identificada fibrose homogênea com poucos fibroblastos e miofibroblastos de permeio. Em vários aspectos, a lesão endocárdica pode ser considerada análoga à encontrada na cicatriz hipertrófica por segunda intenção, que reproduz de modo anômalo o endocárdio original.

As características histológicas descritas acima permitem estabelecer o diagnóstico anatomopatológico diferencial com as duas principais entidades que causam espessamento endocárdico: a fibroelastose e a cardiopatia relacionada à síndrome carcinóide. Na primeira, o espessamento endocárdico é uniforme, acomete o ventrículo esquerdo, pode ser focal ou difuso e vem sempre acompanhado de proliferação abundante de fibras elásticas dispostas de forma paralela, sem permear o miocárdio subjacente. A fibroelastose é mais freqüente em crianças de até dois anos e pode estar acompanhada por estenose e coarctação da aorta [Aiello e Higuchi, 1994] [Nield et al, 2002]. Na cardiopatia associada a tumores carcinóides do tubo digestivo ocorrem placas fibrosas endocárdicas superficiais em câmaras cardíacas direitas, por liberação de serotonina, bradicinina e outras substâncias secretadas pelo tumor [Pellikka et al, 1993]. Do ponto de vista histológico essas placas respeitam

o limite com o miocárdio e são constituídas por tecido fibroso com células musculares lisas isoladas em meio a estroma rico em mucopolissacárides ácidos e colágeno, sem elastose [Kushwaha et al, 1997]. Em nenhuma das duas situações o espessamento fibroso é acompanhado por vasos proliferados ou por infiltrado inflamatório.

Pouco se conhece sobre os constituintes do colágeno na faixa fibrosa da EMF. Os primeiros a investigar o assunto foram Balarin e Andy em 1983, que constataram no soro de pacientes com EMF um aumento de enzimas que atuam na síntese de colágeno [Bolarin e Andy, 1983]. Em 2001, Rhadakumary et al demonstraram a prevalência do colágeno tipo I sobre o tipo III em fragmentos de lesão endocárdica de pacientes portadores da doença. O material, proveniente de autópsia ou de ressecção cirúrgica, foi submetido à digestão péptica seguida de gel-eletroforese. Já a análise feita por nós dos diversos tipos de fibras colágenas marcadas por imunistoquímica não mostraram resultados tão expressivos. As fibras dos tipos I e III foram identificadas na faixa fibrosa de forma homogênea, notando-se leve predomínio do tipo I, porém sua quantificação ficou prejudicada pelo acentuado entrelaçamento das fibras. É provável que o método não seja o mais adequado para avaliação quantitativa. Já o colágeno tipo IV, como esperado, só foi encontrado ao redor de vasos. Faz parte da camada basal e, portanto, não é componente da faixa fibrosa. Assim, em última análise, os resultados observados estão de acordo com os obtidos por gel-eletroforese por Rhadakumary et al (2001).

As fibras colágenas tipo I e III são o principal constituinte estrutural do interstício no coração, dão suporte a diversas estruturas miocárdicas e contribuem para a função contrátil cardíaca. As fibras do tipo I são as responsáveis pela força tensora do tecido, enquanto as do tipo III fornecem a resistência ideal para a integridade e distensibilidade do arcabouço estrutural [Bishop et al, 1998]. Em condições patológicas o remodelamento do colágeno pode ocorrer tanto na estrutura quanto na sua composição bioquímica, afetando a relação de proporção entre os colágenos I/III. Por exemplo, na miocardiopatia dilatada ocorre aumento da concentração de ambos os colágenos, com predomínio do tipo I. Já na cardiopatia isquêmica observa-se o inverso, ou seja, o aumento do colágeno tipo III [Marijjanowski et al, 1995]. Na EMF, na área lesada predomina o tipo I, que poderia provocar o enrijecimento do miocárdio e afetar sua função contrátil tanto sistólica como diastólica. Quanto ao componente celular da fibrose, normalmente os fibroblastos são as principais células no remodelamento tissular. Eles migram para a área lesada, proliferam-se, produzem matriz extracelular e se diferenciam em miofibroblastos. A migração e a proliferação de fibroblastos são desencadeadas por diversos fatores de crescimento, como TGF- $\beta$  (“transforming growth factor”- $\beta$ ), PDGF (“platelet-derived growth factor”), EGF (“epidermal growth factor”), FGF (“fibroblast growth factor”) e citocinas fibrogênicas como IL-1 (“interleukin-1”) e TNF- $\alpha$  (“tumor necrosis factor”- $\alpha$ ). Tais fatores são liberados por plaquetas, células inflamatórias e células endoteliais ativadas. Os miofibroblastos também desempenham papel crucial na reparação e remodelamento tecidual

através da síntese e organização da matriz extracelular, além de serem responsáveis pela tensão tissular. Eles surgem a partir de várias células mesenquimais, como fibroblastos locais, fibrócitos, pericitos e células musculares lisas da camada média de vasos arteriais. Fibrócitos são células derivadas da população imatura de precursores da linhagem monocítica da medula óssea [Hinz et al, 2007]. Na última década surgiram evidências na literatura sobre sua participação em processos reparadores cicatriciais normais ou patológicos, tais como doenças fibrosantes associadas a infiltrado inflamatório persistente. Essas células, quando estimuladas “in vitro” por citocinas pro-fibróticas, produzem grande quantidade de matriz extracelular e se diferenciam em fibroblastos e miofibroblastos. Os fibrócitos produzem também citocinas, como CTGF (“connective tissue growth factor”) e TGF- $\beta_1$  e fatores de crescimento que induzem a angiogênese, a proliferação de fibroblastos locais, além de promoverem a síntese de matriz extracelular [Bellini e Mattoli, 2007]. Entretanto, o acúmulo de colágeno na área de lesão tecidual não depende só do aumento da síntese, mas também da diminuição da degradação pelas metaloproteinases ou collagenases intersticiais, que são liberadas por fibroblastos, macrófagos e neutrófilos. Essas enzimas promovem a degradação dos componentes da matriz extracelular. O resultado final do remodelamento tecidual depende do balanço entre a síntese e a degradação do colágeno [Cotran et al, 1999].

Não há na literatura estudos a respeito da fibrogênese referentes à EMF. É possível que ocorram falhas em uma ou mais fases do processo de

reparação tecidual do endocárdio, com participação de fibroblastos, miofibroblastos e fibrócitos, resultando no acúmulo de colágeno com escasso componente celular.

A presença de calcificação nas áreas de fibrose, identificada em 35% dos casos, é indicativa de longo tempo de evolução da lesão, chamada de calcificação distrófica. Esse dado está de acordo com a história clínica desses pacientes, os quais apresentam em média 11 anos de evolução da doença. Ela contribui certamente para o agravamento da função cardíaca.

Os trombos murais de fibrina, recentes e superficiais, são indicativos de ulceração superficial do revestimento endocárdico e podem ser lentamente incorporados à lesão endocárdica. Entretanto, não há evidência anatomopatológica ou clínica de progressão da lesão endocárdica ao longo do tempo [Mady et al, 1991].

## **5.2 Alterações inflamatórias do endocárdio**

O **componente inflamatório** linfomononuclear na lesão endocárdica foi referido na literatura por vários autores desde a descrição da doença. Embora fosse discreto, focal e pouco variasse de intensidade de caso para caso, esteve sempre presente em nossa casuística junto aos vasos, na profundidade da lesão. A marcação imunoistoquímica e a contagem celular demonstraram predomínio de linfócitos de linhagem T e de macrófagos, duas células que classicamente participam de fenômenos inflamatórios

crônicos via Th1, indicando a persistência de um fator lesivo tecidual inespecífico. Sabe-se que nos processos inflamatórios crônicos os linfócitos T participam diretamente na ativação de macrófagos através da liberação de linfocinas, principalmente o IFN- $\delta$  (“interferon- $\delta$ ”). Os macrófagos, por sua vez, são células fundamentais na inflamação crônica, responsáveis não só pela fagocitose de restos celulares necróticos e fibrina, mas também pela liberação de citocinas e fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , PDGF, bFGF) que causam migração e proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e angiogênese [Adams e Lloud, 1997]. De todos os fatores de crescimento, o TGF- $\beta$  parece ser o mais importante pelos múltiplos efeitos que favorecem a deposição de tecido fibroso, além de ser quimiotático para monócitos, atuar na angiogênese e estar aumentado em doenças crônicas fibrosantes. Por marcação imunohistoquímica foram detectados em número considerável linfócitos de linhagem B participando do infiltrado inflamatório. Essas células são classicamente consideradas importantes na resposta imune humoral na reação inflamatória aguda, mas pouco se sabe sobre o seu papel nos processos inflamatórios crônicos. Recentemente, os linfócitos de linhagem B foram relacionados à neolinfangiogênese por Angeli et al em estudo sobre inflamação crônica de linfonodos [Angeli et al, 2006]. Em processos intersticiais crônicos renais, por exemplo, elas parecem estar envolvidas na neolinfangiogênese e na ativação de linfócitos T via apresentação de antígenos [Heller et al, 2007], que também estão presentes na EMF.

Quatro casos de nossa amostra chamaram a atenção pela maior intensidade de células inflamatórias acompanhadas por proliferação vascular

de vasos de pequeno calibre e por hemossiderina. O quadro é sugestivo de tecido de granulação e pode ser indicativo de lesão mais recente. A afirmativa é corroborada pelo fato de três desses casos terem apresentado um período mais curto de evolução da doença antes do ato cirúrgico (menos de dois anos e meio).

A avaliação histológica dos eosinófilos na lesão endocárdica demonstrou um pequeno número dessas células, mesmo em pacientes com eosinofilia periférica na época do ato cirúrgico, exceção feita apenas a um caso com granuloma epitelióide mal estruturado rico em eosinófilos na interface endocárdio/miocárdio, sugerindo reatividade Th2. Do ponto de vista clínico-laboratorial foi detectada eosinofilia periférica transitória (entre 550 e 1900 cels/mm<sup>3</sup>) em 45% dos pacientes em alguma fase do seguimento da doença, em alguns até no seguimento pós-operatório, sem causas aparentes como parasitoses ou manifestações alérgicas. Apenas uma paciente do grupo tem diagnóstico de Síndrome Hipereosinofílica associada, em tratamento com imunodepressor iniciado quatro anos antes dos sintomas cardíacos.

Desde a descrição da EMF tem sido constatada nos pacientes eosinofilia periférica transitória em níveis não muito elevados. Tal condição é freqüente, mas não obrigatória. Sua identificação na casuística encontra apoio na literatura. O próprio Davies relatou no artigo original de 1948 que *“eles [os pacientes] às vezes apresentam eosinofilia sem causa aparente”* [Davies, 1948]. Posteriormente, vários estudos clínicos relataram o mesmo fato, tanto na África [Jaiyesimi, 1982], como na Índia [Kantha, 1995] e no

Brasil [Guimarães et al, 1971]. Entretanto, outras pesquisas se seguiram mostrando que os valores da eosinofilia não eram significativos em relação ao grupo controle daquela determinada região [Patel et al, 1977] [Vianna et al, 1990]. Quanto aos dados histológicos, estudos anatomopatológicos sucessivos desde a descrição da doença confirmaram a escassez dessas células na lesão endocárdica [Chopra et al, 1990] [Valiathan, 1993].

O encontro de granulomas epitelióides na EMF também é ocasional. Estão provavelmente relacionados à presença de componentes antigênicos insolúveis desconhecidos, que suscitam reação granulomatosa via Th2. Esses antígenos são fagocitados por macrófagos que ativam linfócitos T CD4+. Por sua vez, estas células produzem citocinas como IL-2 (“interleukin-2”) e IFN- $\delta$ , o qual é importante na transformação de macrófagos em células epitelióides e células gigantes [Perez et al, 2003]. Esse achado assinala, pelo menos em alguns casos, a participação de uma resposta imune celular paralela à reação humoral na evolução da doença. A ocorrência de granuloma epitelióide e de agregado linfóide na interface endocárdio/miocárdio em dois casos da casuística são indicativos de fator lesivo tecidual persistente, de longa duração. Nesse aspecto, fatores ambientais e a desnutrição crônica, freqüente em pacientes com EMF, [Rutakingirwa et al, 1999 ] podem contribuir para a manutenção da lesão, impedindo sua completa cicatrização.

A participação dos eosinófilos na patogenia da EMF é controversa e não está definitivamente estabelecida. Os eosinófilos são células que também participam da inflamação crônica e das reações imunes mediadas

por IgE. São derivadas da linhagem mielóide da medula óssea e são atraídas para as áreas de lesão pela ação de citocinas liberadas por células inflamatórias, como GM-CSF (“granulocyte-macrophage colony-stimulating factors”) e as IL-3 e IL-5 (“interleukins-3 e interleukins-5”, também chamada eotaxina) [Teixeira et al, 1997]. Os eosinófilos maduros são então liberados e rapidamente migram para tecidos periféricos, onde têm sobrevivência curta, a menos que a apoptose seja inibida pelas mesmas citocinas. A superprodução de qualquer dessas citocinas leva à eosinofilia sanguínea pelo excesso de produção e por inibição da lise celular periférica. A eosinofilia é deletéria e pode ter conseqüências patológicas pela liberação de grânulos citoplasmáticos altamente catiônicos no tecido [Roufosse et al, 2004]. Embora os eosinófilos tenham sido objeto de vários estudos na última década, não há consenso sobre sua função em condições normais ou patológicas [Adamko et al, 2005]. Existem fortes evidências de que atuam direta e indiretamente sobre os mastócitos, liberando histamina e perpetuando quadros alérgicos, mas os mastócitos não são freqüentes na EMF. Os eosinófilos podem também agir sobre os fibroblastos e modular o processo de remodelamento tecidual pela liberação de grânulos citoplasmáticos contendo citocinas. FGF (“fibroblast growth factor”), NGF (“nerve growth factor”), TGF- $\beta$  (“transforming growth factor”- $\beta$ ) e VEGF (“vascular endothelial growth factor”) são exemplos de citocinas liberadas pelos eosinófilos que estimulam a proliferação de fibroblastos, a produção de colágeno e a angiogênese [Munitz e Levi-Schaffer, 2004]. Além das doenças parasitárias e das de fundo alérgico, os eosinófilos têm sido encontrados em

altos níveis no sangue e/ou no infiltrado inflamatório tecidual associado a doenças de caráter fibrosante malignas (Doença de Hodgkin, vários tipos de leucemia e linfomas) e benignas (colangite esclerosante, Doença de Crohn, fibrose idiopática retroperitoneal, EMF e outras), com significado ainda pouco esclarecido [Noguchi et al, 1992]. Os produtos de degranulação dos eosinófilos podem permanecer no tecido por longo período, mesmo após desaparecimento destes do sangue periférico, como foi demonstrado por técnica imunoistoquímica por Spry em 1986, em tecido cardíaco obtido de pacientes portadores de Síndrome Hipereosinofílica. Noguchi et al em 1992 demonstraram a presença de produtos de degranulação de eosinófilos por imunofluorescência indireta em espécimes de tecido obtidos de pacientes portadores de doenças inflamatórias fibrosantes variadas. Sendo assim, o fato de encontrarmos raros eosinófilos à histologia não exclui totalmente a participação patogénica dessas células na EMF [Janin, 2005]. A ação lesiva dos eosinófilos poderia se dar por um processo lento e gradual como o da apoptose. Recentemente, Corradi et al demonstraram o aumento do processo de apoptose de lesão de fibras miocárdicas e de deposição de colágeno em pacientes com miocardite eosinofílica associada à Síndrome hipereosinofílica [Corradi et al, 2005].

O relato da associação entre eosinofilia e lesão endocárdica não é recente. Em 1936 foi descrita na Alemanha por Löffler<sup>7</sup>, citado por Brockington e Olsen (1973), a “Endocardite parietal fibroplástica”, hoje conhecida como Endocardite de Löffler, em dois pacientes com eosinofilia

---

<sup>7</sup> Löffler W. Endocarditis parietalis fibroplastica mit Bluteosinophilie: ein eigenartiges Krankheitsbild, Schweiz, *Med Wochenschr.* 1936; 17: 817.

persistente em altos níveis, falência cardíaca e rápida evolução para óbito, cuja autópsia revelou espessamento endocárdico. Em 1973 Bockington e Olsen, em estudo anatomopatológico comparativo entre a Endocardite de Löffler e a EMF de origem tropical, concluíram que não havia diferença entre as duas doenças e propuseram a sua unificação (teoria unicista). O mesmo grupo de pesquisadores sugeriu uma teoria patogênica segundo a qual a agressão tecidual inicial na interface endocárdio/miocárdio ocorreria por ação direta dos eosinófilos ou pelos produtos de sua degranulação (decorrente de causas variadas), seguida de trombose mural e substituição por fibrose [Olsen e Spry, 1985]. Esses três estágios propostos foram bem identificados na endocardite de Löffler, mas não na EMF, o que até certo ponto contraria o esperado pelos ditames da patologia geral. Segundo eles, *“a Doença de Davies seria uma etapa tardia da endocardite de Löffler devido a infecções parasitárias via eosinofilia”* [Brockington e Olsen, 1973]. No entanto, os vários estudos que se seguiram tentando associá-la a doenças parasitárias, particularmente filariose (loa-loa), microfilariose, triquinose e helmintíase, não foram conclusivos [Patel, 1977] [Andy et al, 1977, 1981, 1998] [Andy, 2001]. Outros autores indicavam estreita relação entre eosinofilia e lesão endomiocárdica [Oakley e Olsen, 1977] [Olsen e Spry, 1985]. A idéia de unificar as duas entidades tem sido contestada por pesquisadores da variante tropical com base também em diferenças epidemiológicas, clínicas e geográficas. A endocardite de Löffler acomete preferencialmente homens na quarta década de vida, ocorre em regiões temperadas, compromete outros órgãos além do coração, apresenta maior incidência de fenômenos

tromboembólicos, é biventricular em 100% dos casos e está associada à eosinofilia periférica persistente, sem causa aparente, (acima de 1500 cels/mm<sup>3</sup> durante pelo menos seis meses, ou Síndrome Hipereosinofílica). Já na EMF o único órgão acometido é o coração e não se observa eosinofilia em níveis tão elevados e persistentes. Em vista disso, atualmente a tendência é manter as duas entidades separadas, a EMF ou Doença de Davies e a Endocardite de Löffler associada à Síndrome Hipereosinofílica, até que novos conhecimentos esclareçam a etiopatogenia das duas doenças [Braunwald, 2001].

### 5.3 Alterações vasculares do endocárdio

As **alterações vasculares** na faixa fibrosa endocárdica na amostra foram proeminentes, caracterizadas por alterações na parede vascular e por grande número de vasos calibrosos e dilatados na profundidade da lesão. Chamou a atenção a presença de artérias de pequeno calibre de parede espessada à custa de proliferação fibroconjuntiva e degeneração mucóide da camada média, formando um “coxim” irregular, ao lado de vasos venosos irregulares e dilatados. Tal aspecto é sugestivo de fístula arteriovenosa de aspecto semelhante ao do aneurisma cirsóide. Foram encontrados ainda vasos calibrosos permeando o miocárdio subjacente, em ampla comunicação com a rede coronariana intramiocárdica. A marcação imunoistoquímica dos vasos linfáticos pela podoplanina, marcador recente

[Ordóñez, 2006] empregado na EMF pela primeira vez na literatura, demonstrou que pelo menos 30% dos vasos eram pequenos linfáticos. Tais vasos habitualmente não estão presentes no endocárdio e na camada superficial interna do miocárdio [Ishikawa et al, 2007]. Assim, além de intensa proliferação vascular terminal e de alterações da parede vascular, estão presentes vasos linfáticos em grande quantidade, o que sugere drenagem contínua da rede vascular anômala e dificuldade de retorno venoso. As alterações vasculares são também indicativas de alterações na microcirculação, talvez decorrentes de modificações hemodinâmicas locais que podem atuar na manutenção de mecanismo patogênico ainda desconhecido na lesão endocárdica.

As lesões vasculares descritas acima assemelham-se até certo ponto às descritas na EMF por Connor et al em 1968 e por Andrade na Bahia em 1973. Este chegou a considerá-las um “*elemento patogênico na progressão da doença*” [Andrade e Teixeira, 1973].

Um dos componentes importantes no processo de cicatrização tecidual em condições normais ou patológicas é a **neovascularização ou angiogênese**, um dos elementos básicos do tecido de granulação que consiste no aparecimento de novos vasos a partir de “brotos” capilares de vasos pré-existentes. Trata-se de processo que ocorre em múltiplas etapas e do qual participam vários fatores com atividade angiogênica, principalmente VEGF (“vascular endothelial growth factor”) e angiopoietinas. Esses fatores são secretados por células mesenquimais do estroma e seus receptores estão localizados no endotélio. O VEGF constitui o mais importante desses

fatores e sua expressão é estimulada por citocinas, fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , PDGF) e principalmente por hipóxia tissular [Risau, 1997]. No coração normal a nutrição da região endocárdica e subendocárdica se faz por embebição, constituindo-se ali região de hipóxia relativa [Krieger, 1976]. Na EMF aparentemente a origem dos vasos observados está relacionada à presença de tecido de granulação envolvido na reparação da lesão tecidual inicial. Esses vasos se mantiveram pérvios devido a condições hemodinâmicas locais ou a outros fatores desconhecidos que interferiram na evolução natural do processo de cicatrização. A rede vascular resultante, de caráter anômalo, poderia ser um fator importante na manutenção da lesão. A hipóxia relativa da região subendocárdica poderia ser um fator adicional no surgimento de proliferação vascular na lesão.

A manifestação clínica da participação da microcirculação na EMF pode corresponder à dor precordial atípica, ou seja, não relacionada ao esforço físico, que alguns pacientes apresentam de maneira intensa. Quinze pacientes referiram esse sintoma, que era o principal em quatro deles. Em cinco pacientes a dor persistiu após a ressecção cirúrgica, que é superficial e não atinge totalmente o componente vascular subjacente. Todos os pacientes apresentavam comprometimento de ventrículo esquerdo, isoladamente ou não, sendo a doença biventricular em oito dos 15 casos. Gupta et al em 1989 referiram dor precordial em 13% dos pacientes de sua casuística na primeira apresentação clínica. Em nosso meio, Pereira Barretto et al em 1996 constataram esse sintoma em 56% dos pacientes com comprometimento isolado de ventrículo esquerdo em seguimento de longo prazo. Bestetti et al em 2005 relataram um caso de dor precordial

intensa com características de angina em paciente com EMF isolada de ventrículo esquerdo. Embora não patognomônica, a tradução cineangiocoronariográfica da proliferação vascular terminal poderia corresponder ao “blush”, borramento da imagem vascular coronariana terminal que não é visto em condições normais. Na revisão de 16 exames da casuística, encontramos “blush” em nove casos (cinco em ramos de coronária direita e quatro na esquerda), sendo que sete destes pacientes apresentavam dor precordial concomitante. Nossos dados estão de certa forma de acordo com os de Balakrishnan et al, que, em 1983 relataram a presença de “blush” vascular em 50% dos pacientes com EMF em angiografia coronariana. Meuwissen et al relacionaram a imagem do “blush” na angiografia coronariana da EMF ao trombo mural ventricular que poderia estar associado à lesão endocárdica [Meuweissen et al, 1999]. Essa imagem não é patognomônica e pode ocorrer em outras situações patológicas de comprometimento de microcirculação, como fístula artério-venosa congênita ou adquirida, trombos murais (duas situações que eventualmente podem estar presente na EMF), mixoma cardíaco e miocardiopatia diabética [Soulén et al, 1977] [Kwan e Feit, 1993] [Sari et al, 2007]. O fato de não detectarmos correlação estatística entre dor precordial atípica, “blush” constatado à cineangiocoronariografia e intensidade de neovascularização endocárdica na avaliação histológica, não afasta a possibilidade de associação positiva entre esses dados. Como as amostras testadas eram pequenas, a impressão clínica dessa associação deve prevalecer até que novas pesquisas esclareçam definitivamente os fatos.

## 5.4 Alterações do miocárdio subendocárdico

As **alterações miocárdicas** na amostra foram bem menos evidentes que as endocárdicas, indicando que a doença acomete fundamentalmente o endocárdio. Foram mais bem identificadas no grupo de ressecção cirúrgica pelo fato de as amostras estarem mais preservadas. Resumidamente, consistiram em fibras miocárdicas com sinais de hipertrofia e alterações degenerativas em células isoladas. Em alguns casos foi encontrado alargamento do interstício à custa de macrófagos e linfócitos de linhagem T com discreta proliferação fibroconjuntiva, sem agressão direta às fibras miocárdicas, o que preenche os critérios de miocardite tipo “borderline” [Aretz, 1987]. Os eosinófilos foram vistos apenas em dois casos, relativos a pacientes que apresentavam eosinofilia periférica na época da ressecção cirúrgica. Esses dados indicam que o miocárdio não está fundamentalmente envolvido na patologia da doença, apresentando apenas alterações discretas e residuais, decorrentes da vizinhança de lesão endocárdica, como já foi descrito na literatura anteriormente [Connor et al, 1968] [Chopra, 1990].

## 5.5 Patogenia da EMF

São quatro as principais **teorias patogénicas** propostas na EMF até o momento, todas elas com aspectos ainda válidos. A primeira é devida a Davies e Ball, que aventaram a possibilidade de lesão necrótica inicial no

miocárdio subendocárdico com extensão para endocárdio adjacente, seguida por trombose mural primária, organização do trombo até tecido fibroso e trombose mural secundária sucessiva. Apontaram como possíveis fatores etiológicos dessa lesão inicial as infecções virais, as reações antígeno-anticorpo e a desnutrição [Davies e Ball, 1955]. Connor et al em 1968 propuseram que a EMF seria uma doença do tecido conjuntivo cardíaco. A lesão inicial estaria relacionada ao acúmulo de mucopolissacárides no endocárdio e miocárdio superficial, levando à necrose do colágeno, proliferação de vasos e fibroblastos, seguida de substituição por fibrose. O mecanismo patogénético básico inicial seria uma reação de hipersensibilidade semelhante ao da doença reumática, responsável por uma pancardite aguda com perpetuação da lesão. Na opinião deles, a EMF seria uma doença intersticial e progressiva possivelmente causada por agentes infecciosos e pela ingestão de plantas tóxicas [Connor et al, 1968]. Por sua vez, Brockington e Olsen em 1973 propuseram um mecanismo patogénético que consistiria em três fases distintas: uma inicial, *necrótica*, caracterizada por miocardite com eosinófilos, focal ou difusa, com duração de poucos meses; uma fase intermediária *trombótica*, com regressão dos fenômenos inflamatórios e formação de trombo mural, ocorrendo dentro de um ano da fase anterior; e por último a *fibrótica*, de resolução do processo inflamatório com formação de placa fibrosa. Segundo esses autores, a principal causa da eosinofilia inicial seria infecciosa [Brockington e Olsen, 1973] [Olsen e Spry, 1985]. Por fim, em meados da década de 80, Valiathan et al propuseram teoria aplicável às condições geográficas específicas de Kerala, porém

altamente especulativa e de difícil aplicação para outras regiões tropicais. Nessa região indiana predomina solo monazítico com altas concentrações de cerium e torium, os quais contaminariam água e alimentos [Valiathan et al, 1990]. Uma vez ingeridos, esses elementos entrariam em competição com o magnésio em fibras cardíacas, provocando necrose, degeneração celular e substituição por fibrose. Segundo esses autores a EMF seria uma doença intersticial [Valiathan et al, 1993].

A dificuldade de identificação da lesão anatomopatológica inicial sugere ação de agente lesivo tecidual persistente por período de tempo relativamente longo. Se a lesão inicial fosse aguda, atingindo extensa área tecidual cardíaca, o quadro clínico seria abrupto e de graves conseqüências para o paciente, o que não parece ocorrer. Por isso, é mais plausível supor que a lesão endocárdica inicial decorra de ação persistente de agentes infecciosos, talvez associados a fatores ambientais, nutricionais ou tóxicos.

Dois aspectos clínicos merecem alguns comentários por suas implicações patogênicas:

- 1- Vários estudos clínicos indicam que o agravamento do quadro clínico ao longo da evolução da doença ocorre por deterioração das condições hemodinâmicas do paciente, principalmente por insuficiência valvar [Salemi e Mady, 2003]. Na casuística não foram encontradas evidências anatomopatológicas de que a doença evolua por surtos ou de que haja progressão da lesão fibrótica, por si ou pela incorporação de trombos murais sucessivos. Esses dados estão de acordo com os de Mady et al,

que não encontraram evidências de progressão da doença em 22 pacientes através de seguimento por duas ou mais cineventriculografias [Mady et al, 1991].

- 2- Vários dos pacientes operados apresentaram sobrevida longa (de até 11 anos) em condições clínicas razoáveis, o que indica, por um lado, que o tratamento cirúrgico é adequado e, por outro, que a doença não apresenta caráter recidivante, o que praticamente exclui a possibilidade de mecanismo patogénico auto-imune. Apenas um caso foi submetido a uma segunda ressecção de lesão ventricular, cerca de seis anos após a primeira cirurgia. O exame anatomopatológico mostrou aspecto semelhante ao da lesão anterior, não sendo possível esclarecer se a lesão recidivou ou se não foi completamente ressecada na primeira cirurgia. Os corações de dois pacientes que faleceram após a cirurgia e foram autopsiados mostraram persistência de delicada camada fibrótica cicatricial com vasos na região de lesão endocárdica prévia, sem características inflamatórias ou aspecto obliterativo. A ocorrência de raros casos de recidiva pós-operatória está de acordo com os dados referidos por outros autores [Schneider et al, 1998] [Moraes et al, 1999].

### **5.5.1 EMF e agentes infecciosos cardiotrópicos**

Tendo constatado a possibilidade teórica de a EMF estar relacionada a infecção local prévia, decidimos realizar pesquisa local de agentes infecciosos cardiotrópicos. A pesquisa de genomas de alguns vírus

cardiotrópicos e do *Toxoplasma gondii* no material de ressecção endocárdica incluído em parafina foi feita através da **reação de cadeia de polimerase (PCR e RT-PCR)**. Apesar de a amostra ser pequena (n=12), pois só obtivemos sucesso na recuperação dos ácidos nucleicos em 33% dos casos testados, a positividade encontrada foi alta, de 50% (6/12), já que o padrão para indivíduos normais (sem cardiopatia) é de 0,5%. Não houve uniformidade nos resultados obtidos. Duas amostras foram positivas para citomegalovirus (CMV), duas para enterovirus, uma para CMV e enterovirus simultaneamente e uma para *T. gondii*. Nenhum dos casos apresentou sinais histológicos de miocardite em atividade. A presença de agentes infecciosos não se associou aos dados clínicos e morfológicos pesquisados, tais como sexo, idade, tempo de doença, eosinofilia periférica, doença bilateral e tecido de granulação no endocárdio.

Em relação à PCR, cabe lembrar que o armazenamento e a fixação prolongados em geral comprometem os resultados pela degradação dos ácidos nucleicos, principalmente do RNA, que é mais suscetível. É possível que a positividade da reação fosse ainda maior se tivessem sido utilizadas amostras mais recentes que as desse estudo, as quais permaneceram arquivadas entre um e oito anos.

Os agentes infecciosos cardiotrópicos foram descritos em várias cardiopatias crônicas, estando presentes às vezes de forma associada e sugestiva de infecção múltipla [Kühl et al, 2005]. Apesar disso, seu papel na patogenia e evolução das miocardiopatias ainda está por ser esclarecida. Desde meados da década de 90, eles têm sido relacionados a vários tipos

de lesão miocárdica. Os enterovírus e os adenovírus, duas causas comuns de infecção respiratória, são os maiores responsáveis pelos quadros clínicos de miocardite [Kytö et al, 2005]. Os enterovírus, grupo do qual fazem parte os vírus coxsackie A e B, são mais comumente encontrados em formas crônicas (72%), como na miocardiopatia dilatada [Keeling and Tracy, 1994] [Ueno et al, 1995] e possivelmente na displasia ventricular arritmogênica direita [Bowles et al, 2002]. Já os adenovirus estão em geral associados às formas agudas de miocardite na infância [Calabrese et al, 2002] e em adultos [Bowles et al, 2003]. O vírus da caxumba foi relacionado principalmente à fibroelastose endocárdica [Ni et al, 1997], enquanto o parvovirus B19 foi detectado em crianças assintomáticas ou submetidas a transplante cardíaco [Schowengerdt et al, 1997]. O citomegalovirus, do grupo herpes, é causa comum de infecção cardíaca em imunodeprimidos e em transplantados cardíacos. Em 2005 Kytö et al demonstraram sua importância na miocardite fatal em indivíduos imunocompetentes, detectando CMV por PCR em 38% das amostras de biópsia miocárdica. Em 80% dessas amostras positivas foi confirmada a localização do genoma viral em fibras miocárdicas por hibridização "in situ". Sabe-se que em geral a primo-infecção pelo CMV ocorre na infância e o vírus permanece latente em leucócitos e células endoteliais. Em indivíduos imunocompetentes a reinfecção ou reativação do vírus na maior parte das vezes é assintomática, enquanto nos imunodeprimidos a infecção pelo CMV aumenta a morbidade e mortalidade dos pacientes [Kytö et al, 2005]. Já a toxoplasmose cardíaca é freqüentemente assintomática. Em indivíduos imunodeprimidos HIV

positivos têm sido relatadas lesões cardíacas na vigência de doença disseminada multivisceral a partir de reativação de infecção latente. Um dos locais freqüentes de encistamento do parasita na primoinfecção são as fibras cardíacas. A intensidade da lesão miocárdica varia consideravelmente, desde miocardite aguda difusa levando à morte súbita até lesão focal isolada em indivíduos assintomáticos [Hofman et al, 1993].

Na EMF, a primeira pesquisa indireta de agentes infecciosos não virais cardiotrópicos foi realizada em 1966 por Ludlam e Somers. A pesquisa de anticorpos no soro de pacientes em Uganda não revelou evidências de associação entre EMF e toxoplasmose. A pesquisa de agentes virais ganhou novo impulso em 1990, quando Ijaola e Falase, trabalhando na Nigéria, dosaram anticorpos para *Toxoplasma gondii* e os vírus coxsackie B e arbovirus no soro de indivíduos normais e de pacientes com EMF. Não encontraram positividade para os vírus, mas todas as amostras foram positivas para *T. gondii*. O resultado, contudo, não teve valor estatístico em relação às amostras controle [Ijaola e Falase, 1990]. Desde então não houve referência na literatura a outros estudos envolvendo pesquisa de agentes infecciosos cardiotrópicos. O presente estudo é pioneiro na investigação desses agentes na lesão endomiocárdica da EMF por técnicas de biologia molecular.

Os resultados obtidos por nós podem ser interpretados de três maneiras:

- 1- Os vários agentes infecciosos encontrados estariam **diretamente** implicados na patogênese da lesão endocárdica inicial. Atuariam de forma isolada ou associados a outros fatores. Seu material genético seria

incorporado às células do tecido lesado e posteriormente detectados pela PCR. A persistência de agentes infecciosos deve-se a mecanismos complexos não totalmente esclarecidos que envolvem características imunológicas tanto do agente infeccioso quanto do hospedeiro [Noutsias et al, 2002]. A persistência de agentes virais freqüentemente está associada a menor efeito citolítico e conseqüentemente a menor infiltrado inflamatório, como se observa em várias doenças cardíacas crônicas [Kühl et al, 2005]. Recentemente foi demonstrado que anticorpos contra CMV podem induzir a lesão endotelial inicial na aterosclerose pelo aumento da apoptose, o que corrobora a hipótese de que infecções virais podem desempenhar papel crucial na patogênese de lesões vasculares e cardíacas [Lunardi et al, 2007].

- 2- Os agentes infecciosos encontrados seriam **oportunistas**. Sua detecção representaria um marcador de alterações patológicas que ocorreriam no miocárdio. As amostras de tecido provêm de pacientes debilitados, mais suscetíveis a infecções por agentes cardiotrópicos em decorrência da longa evolução da doença. Nesse caso, a presença desses agentes poderia inclusive contribuir para o agravamento da lesão endomiocárdica. A propósito, foi demonstrado experimentalmente, por exemplo, que a deficiência de distrofina em ratos facilita a ruptura do sarcolema e a infecção por enterovirus, o que desencadeia miocardiopatia [Diong e Knowlton, 2001].
- 3- Os agentes infecciosos estariam **em circulação** sem infecção tecidual. A positividade da reação seria resultante da amplificação de material

genético acumulado na lesão devido à estase sanguínea local. Para dirimir essa dúvida seria conveniente realizar pesquisa simultânea dos agentes infecciosos por PCR no soro dos pacientes, o que, todavia, não pôde ser feito na casuística dado seu caráter retrospectivo.

Qualquer que seja a interpretação dada, os resultados obtidos devem ser registrados e levados em consideração em estudos futuros sobre a etiologia da EMF.

## **5.6 Considerações finais**

Em resumo, a lesão endocárdica da EMF pode ser considerada um processo inflamatório crônico residual persistente e autolimitado com predomínio do componente fibrovascular. A presença de células inflamatórias, embora em pequeno número, é provavelmente responsável pela liberação de citocinas que promovem tanto a angiogênese como a formação do colágeno. Fatores locais, provavelmente hemodinâmicos, mantêm circulação sanguínea e linfática anômalas, com possíveis comunicações artério-venosas em conexão com a rede coronariana intramiocárdica. Essa rede vascular impede a completa resolução do processo inflamatório e perpetua o mecanismo patogênico. A espessa faixa fibrótica endocárdica vista à macroscopia não corresponde à cicatrização completa de uma lesão prévia. Resulta em verdade de processo

inflamatório crônico inespecífico ativo, o qual é perpetuado por fatores locais provavelmente vasculares e desencadeado por fator patogênético desconhecido. A participação de eosinófilos na lesão inicial não pode ser afastada no atual estágio dos conhecimentos. Há indícios clínicos e epidemiológicos de que a lesão inicial ocorre de forma insidiosa por estímulo persistente, talvez em decorrência da ação direta de um ou mais fatores no endocárdio e no endotélio. Nesse sentido, o papel dos agentes infecciosos cardiotrópicos como causadores da lesão inicial não pode ser descartado. É possível inclusive que sua atuação na EMF se assemelhe à que ocorre na lesão aterosclerótica inicial e em outras miocardiopatias.

# 6

## **6. CONCLUSÕES**

---

- 1 - As características morfológicas do material de ressecção cirúrgica de EMF são semelhantes às do material proveniente de autópsias. Ambos são caracterizados por três elementos histológicos básicos: fibrose, infiltrado inflamatório crônico e proliferação vascular. Isso significa que o material de ressecção cirúrgica pode ser utilizado para o diagnóstico anatomopatológico da doença. Não houve correlação entre os dados histológicos, clínicos, laboratoriais e de imagem avaliados.
- 2 - A avaliação morfológica dos três componentes histológicos principais demonstrou (a) presença de fibras colágenas tipo I e tipo III integrando a faixa fibrosa endocárdica, com predomínio do colágeno I; (b) infiltrado inflamatório endocárdico composto principalmente por linfócitos T, macrófagos e linfócitos B em menor número; (c) escassez de eosinófilos na lesão endocárdica e no miocárdio subjacente; (d) componente vascular exuberante, com numerosos linfáticos e alterações estruturais da parede dos vasos, na profundidade da lesão fibrosa endocárdica; (e) presença de miocardite residual (“borderline”) no miocárdio subjacente.
- 3 - Alta incidência de ácidos nucléicos de agentes infecciosos cardiotrópicos foi detectada no endomiocárdio de pacientes portadores de EMF submetidos à ressecção cirúrgica da lesão.

# 7

## **7. ANEXOS**

---

## ANEXO A

Dados de exame macroscópico de corações de autópsia de pacientes com EMF (grupo controle positivo da doença)

<b>CASO/Nº</b>	<b>PESO (g)</b>	<b>VENTR.</b>	<b>ESPESES. MAX (cm)</b>	<b>DIST. ANEL (cm)</b>	<b>TROMBO MURAL</b>	<b>RESTR.</b>
<b>1-A31/80</b>	NA	VE	0,4	3,2 (vAo)	pontaVE	
<b>2-A107/80</b>	220	VE+VD	0,4 (VD)	2,5 (vP)	pontaVD	VD +++
<b>3-A316/82</b>	278	VE+VD	0,3 (VD)	1,0 (vP)	auric. D	VD +++
<b>4-A24/83</b>	220	VE+VD	0,3 (VD)	4,0 (vP)	não	
<b>5-A157/83</b>	365	VE	0,2 (ponta)	4,5 (vAo)	pontaVE	
<b>6-A402/83</b>	440	VD	0,4	2,0 (vP)	AD	VD +++
<b>7-A407/83</b>	346	VE+VD	0,3(VE)	3,5 (vAo)	pontaVE	
<b>8-A383/85</b>	374	VE	0,3	3,0 (vAo)	não	
<b>9-A146/92</b>	340	VD	0,2	2,0 (vP)	auríc. D	

Legendas: **AD** = átrio direito; **auríc** = aurícula; **dist. anel v.** = menor distância entre a faixa fibrosa endocárdica e o anel valvar da cavidade correspondente, em cm; **espes. max.** = espessura máxima da faixa fibrosa endocárdica na parede livre; **NA** = não avaliável; **restr.** = restrição de cavidade; **vA** = valva aórtica; **VD** = ventrículo direito; **VE** = ventrículo esquerdo; **vP** = valva pulmonar

## Anexo B

### Dados anátomopatológicos da casuística

Nº caso #	sexo/id.	Nº peça	ventriculo	fibrose	col. I	col. III	f. elast.	f. retic.	inf. Inf.	vasos	podopl.	calcif.	trombo	mioc.	observações	PCR
1	F/42a	B91-483	<b>VD</b>	3+	1+	1+	1+	1+	1+	3+	3+	0	0	0		inad
2	F/63a	B92-2468	VD	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	0	0	0	0		inad
		B92-2469	VE	3+	2+	2+	1+	0/+	1+	1+	0	0	0	0		inad
3	F/64a	B95-24	VE	3+	3+	2+	1+	1+	0	3+	0	1+	1+	0	metapl.óssea	inad
4	F/28a	B95-671	VD	3+	2+	1+	1+	0/+	0	3+	0	0	0	0		inad
5	M/69a	B95-1493	VE	3+	3+	2+	2+	1+	3+	3+	0	0	3+	0	granul. Epit.+ t gran.	<b>neg</b>
6	F/46a	B97-522	VD	2+	3+	1+	1+	0/+	1+	3+	0	3+	0	SRE+	metapl.óssea	inad
		B03-1063	VE	2+	2+	2+	1+	3+	1+	3+	2+	0	0	0		inad
7	F/42a	B97-936	VE	2+	3+	2+	3+	1+	1+	3+	0	0	0	SRE+/fibr		<b>CMV</b>
8	F/45a	B97-1535	VE	2+	2+	1+	2+	1+	2+	2+	0	1+	2+	0	agreg. Linf	inad
9	F/43a	B97-1836	VE	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	0	1+	3+	0		inad
		B97-1836	VD	2+	2+	1+	1+	1+	2+	2+	0	0	1+	0	tec.granul.	inad
10	F/48a	B98-1592	VE	3+	2+	1+	3+	1+	1+	2+	2+	1+	1+	0		<b>neg</b>
11	F/34a	B99-315	VD+VE	2+	2+	2+	1+	0/+	1+	3+	2+	0	1+	fibr+		inad
12	F/48a	B99-633	VE	3+	2+	2+	2+	1+	1+	3+	2+	0	0	SRE+		inad
13	F/44a	B99-1243	VE	2+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	2+	1+	0	SRE+		<b>EV+CMV</b>
		B99-1243	VD	2+	2+	1+	2+	1+	1+	2+	2+	0	0	0		inad
14	M/32a	B99-2522	VD+VE	2+	2+	1+	3+	1+	2+	3+	0	0	1+	0	tec. granul.	<b>EV</b>
15	F/54a	B00-1269	VD+VE	2+	2+	1+	1+	3+	1+	3+	3+	0	1+	SRE+		inad
16	F/48a	B00-1294	VD+VE	2+	2+	2+	2+	1+	2+	2+	3+	0	0	SRE+		<b>neg</b>

continua...

conclusão

Nº caso #	sexo/id.	Nº peça	ventriculo	fibrose	col. I	col. III	f. elast.	f. retic.	inf. lnfl.	vasos	podopl.	calcif.	trombo	mioc.	observações	PCR
17	F/33a	B00-1948	VD+VE	2+	2+	2+	1+	1+	2+	3+	2+	0	2+	SRE+		inad
18	F/68a	B01-477	VD	2+	2+	2+	2+	1+	1+	2+	3+	0	2+	SRE+		<b>EV</b>
		B01-477	VE	2+	2+	2+	3+	2+	1+	2+	0	0	0	0		inad
19	F/54a	B01-823	VE	2+	2+	2+	2+	1+	2+	3+	2+	2+	2+	fibr+	metapl.óssea	inad
20	M/34a	B01-1478	VE	3+	2+	2+	2+	1+	1+	3+	0	0	0	fibr+		<b>neg</b>
21	F/62a	B01-2113	VE	3+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	3+	0	1+	0		inad
22	F/54a	B01-2700	VE	2+	2+	2+	2+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	0		<b>neg</b>
23	F/62a	B01-2804	VE	2+	2+	1+	2+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	0		inad
24	F/55a	B02-1355	VE	3+	2+	2+	2+	1+	1+	3+	2+	0	1+	SRE+		<b>T.gondii</b>
25	F/40a	B03-214	VE	2+	0	0	2+	1+	2+	2+	3+	0	2+	0		inad
26	M/39a	B03-920	VD	3+	0	0	2+	1+	1+	2+	0	2+	2+	0		inad
27	F/72a	B03-2019	VE	2+	0	0	2+	1+	2+	3+	2+	2+	2+	0		inad
28	M/52a	B03-2739	VD+VE	2+	0	0	2+	1+	2+	3+	2+	0	1+	SRE+	tec.granul.	<b>CMV</b>
29	F/72a	B04-3299	VD	2+	0	0	2+	1+	1+	2+	2+	0	0	0		inad
			VE	2+	0	0	2+	1+	1+	2+	2+	0	2+	fibr+		
30	F/50a	B04-3428	VE	2+	0	0	2+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	0		inad
31	M/52a	B05-1477	VD	3+	0	0	2+	1+	1+	3+	0	1+	0	0		inad
extra	F/42a	B93-431	VE	2+			2+	2+	1+	2+		0	2+	0		<b>neg</b>

## Continuação do anexo B

## Dados anátomopatológicos de casos de autópsia (grupo controle)

Nº peça	Nº caso	ventriculo	fibrose	f.elast.	f.retic.	inf.infl.	vasos	calcif.
A31/80	A1	VE	3+	2+	1+	1+	2+/3+	1+
		VD	1+	1+	1+	0	3+	0
A107/80	A2	VE	3+	3+	1+	0/1+	2+	0
		VD	3+	3+	1+	0/1+	2+	0
A316/82	A3	VE	3+	3+	1+	1+	2+	0
		VD	2+	2+	0	1+	2+	0
A24/83	A4	VE	3+	1+	0	0/1+	2+	0
		VD	2+	1+	1+	0/1+	2+	0
A157/83	A5	VE	2+	2+	1+	1+	1+	0
		VD	1+	1+	0	1+	0	0
A402/83	A6	VE	2+	2+	1+	1+	1+	0
		VD	3+	1+	1+	1+	1+	1+
A407/83	A7	VE	2+	1+	0/1+	0/1+	3+	0
		VD	3+	2+	1+	0/1+	3+	0
A383/85	A8	VE	2+	2+	1+	1+	1+	0
		VD	0	0	0	0	0	0
A146/92	A9	VE	0	0	0	0	0	0
		VD	3+	2+	1+	0/1+	2+	0

## Legenda do **anexo B**

**agreg. linf.** - agregado linfóide

**calcif** - calcificação

**CMV** - citomegalovirus

**col I** - fibras colágenas tipo I

**col III** - fibras colágenas tipo III

**EV** - enterovirus

**F** - feminino

**fibr** - fibrose intersticial

**f. elast** - fibras elásticas

**f. retic.** - fibras reticulínicas

**fibr** - fibrose intersticial

**granul. epit** - granuloma epitelióide

**id.** - idade

**inad** - amostra inadequada para extração de oligonucleotídeos

**inf. infl.** - infiltrado inflamatório

**M** - masculino

**metapl. óssea** - metaplasia óssea

**mioc** - miocárdio

**neg.** - amostra negativa para agentes infecciosos

**PCR** - reação de cadeia da polimerase

**podopl** - presença de linfáticos pela podoplanina

**SRE** - sistema retículo - endotelial

**tec. granul.** - tecido de granulação

**VE** - amostra de ventrículo esquerdo

**VD** - amostra de ventrículo direito

## ANEXO C

Avaliação quantitativa de vasos na faixa endocárdica com resultado final de nº de vasos/mm<sup>2</sup>, fração de área ocupada pelos lumens vasculares (Lv) e a porcentagem de espessura de parede vascular (Pv) do **2º subgrupo (n=21)**.

<b>Nº CASO#</b>	<b>Nº peça</b>	<b>VASOS/MM<sup>2</sup></b>	<b>Lv(%)</b>	<b>Pv(%)</b>
4	B95-671	106,56	5,61	13,4
6	B97-522	58,75	7,31	17,5
8	B97-1535	40,31	3,12	7,9
9	B97-1836	38,75	6,38	15,1
10	B98-1592	80,31	3,76	9,3
11	B99-315	10,06	9,68	22,4
13	B99-1243	63,12	5,84	13,9
14	B99-2522	87,19	3,39	8,5
16	B00-1294	107,5	3,03	7,7
18	B01-477	67,81	5,93	14,1
19	B01-823	84,69	5,61	13,4
20	B01-1478	85,62	5,48	13,1
22	B01-2700	50,94	8,24	19,2
23	B01-2804	43,75	4,32	10,55
25	B02-1355	63,44	5,66	13,5
26	B03-920	32,19	7,38	17,3
27	B03-2019	50,94	5,43	13
28	B03-2739	93,44	5,32	12,75
29	B04-3299	40,00	1,11	3,45
30	B04-3428	39,69	13,76	31,4
31	B05-1477	59,38	6,47	15,3
<b>Média±dp</b>		<b>62,11 ± 25,78</b>	<b>5,85 ± 2,64</b>	<b>13,94 ± 5,84</b>

Pacientes com “blush”: # 13, 14, 16, 22, 23, 24, 26, 28, 31

Pacientes com dor precordial atípica: # 4, 9, 10, 13, 14, 16, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30

## ANEXO D – Tabela de dados clínicos da casuística

Nº caso#	sexo/id.	proced.	ANTECEDENTES					QUADRO CLÍNICO			
			diab/HAS	eosinof.(ano)	Q. alergico	parasitose	hipotiroi.	Q. clínico	dor prec.	"blush"	t-doença
1	F/42a	MG	N	N	iodo	N	N	disp+edem	N	...	7a
2	F/63a	SP	N	8%-1993	N	S	N	disp+edem	N	...	22a
3	F/64a	PR	N	16%-1998	N	N	S	dispneia	N	...	3a
4	F/27a	BA	N	8%-1995	N	S	N	palpitação	S	...	5a
5	M/69a	SP	N	...	aspirina	...	N	tontura	N	...	6m
6	F/46a	AL	N	10%-2000	N	N	N	ascite	N	N	4a
7	F/42a	SP	N	10%-1997	N	N	N	dispneia	N	...	8a
8	F/45a	AC	N	N	N	N	N	dispneia	N	N	15a
9	F/43a	SP	S/N	N	N	...	N	dor+disp	S	...	15a
10	F/48a	PR	S/S	N	N	N	N	dispneia	S	N	6a
11	F/34a	...	sem H	...	...	...	...	...	...	N	...
12	F/48a	BA	sem H	...	...	...	...	...	...	...	...
13	F/44a	PE	N	N	dipirona	...	N	dispn+asc	S	S-CE+	10a
14	M/32a	AC	N	21%-1999	N	S	N	Tromb.pul	S	S-CE+	6m
15	F/54a	SP	N	N	asma	N	N	disp+edem	N	...	2a
16	F/48a	MG	N	6%-2000	S. Hipereos	...	N	palpitação	S	S-CD+++	20a
17	F/32a	PA	N	12%-2000	iodo	N	N	Tromb.pul	N	...	5m
18	F/61a	SP	N	8%-2002	asma	...	S	disp+dor	S	...	18a
19	F/54a	AM	N	N	N	...	S	disp+dor	S	N	17a
20	M/34a	SC	N	N	N	N	N	Tromb.pul	N	N	15a
21	F/62a	BA	N	N	N	...	N	dispneia	N	...	24a
22	F/54a	SP	N	N	N	N	S	disp+arrit.	S	S-CD+	23a
23	F/62a	SP	N/S	N	asma	N	S	disp+dor	S	S-CD+	31a
24	F/55a	BA	N	N	N	N	S	disp+dor	S	S-CE+	15a
25	F/40a	AL	N	23%-2003	N	...	N	disp+edem	S	...	1a6m
26	M/39a	MG	N	8%-2003	N	esquist HE	N	disp+edem	N	S-CD+	23a
27	F/71a	SP	N	11%-2003	...	N	S	disp+edem	N	N	5a
28	M/52a	AL	N	29%-2003	dipirona	esquist HE	N	disp+edem	S	S-CD+	1a6m
29	F/72a	MG	N/S	N	N	...	S	disp+edem	S	...	2a6m
30	F/50a	SP	N/S	22%-2004	N	N	S	dispneia	S	...	15a
31	M/52a	MG	N	N	N	N	N	arritmia	N	S-CE+	20a
extra	F/42a	SP	N	21%-1993	purp. pigm	...	S	dispn+dor	S	NA	2a

Continuação do anexo D

Nº	DADOS CIRURGICOS				Pós-operatório tardio							
	caso#	data	ressecção	pl.valvar	óbito PO	6m/sint.	ult.ev/sint.	reop.data	t.seguim.	PCR	observações	autópsia
1	1/4/1991	VD	VT	N	...	1997-CFIV	N	7a	...	-	-	-
2	25/11/1992	<b>VE+VD</b>	VT+ ponte	N	CFII	1993-CFIV	N	1a	...	-	-	-
3	4/1/1995	VE	troca VM	N	CFII	2006-CFII	N	11a	...	-	op 1971 /troca VM por DR	-
4	15/5/1995	<b>VD+VE</b>	VT	N	CFI	1996-CFI+dor	N	2a	...	-	-	-
5	27/10/1995	<b>VE+VD</b>	VM+VT	N	CFI	2006-CFII	N	11a	...	<b>neg</b>	-	-
6	20/3/1997	VD	VT	N	CFIII	2003-CFI	13/5/2000	10a	...	-	reop: transplante 2003	-
7	21/5/1997	VE	VM+VT	N	CFI	2005-CFI	N	8a	...	<b>CMV</b>	-	-
8	19/8/1997	VE	VM+VT	N	CFI	2005-CFI/II	N	8a	...	-	-	-
9	1/10/1997	<b>VE+VD</b>	N	N	CFI	1999-CFI+dor	N	10a	...	-	-	-
10	24/8/1998	VE	VM	N	CFI	2002-CFIII	19/3/2002	3a6m	...	<b>neg</b>	reop: pl VM e VT (ob 39d)	-
11	17/2/1999	<b>VD+VE</b>	VM+VT	6d	óbito	1999-CFIV	N	6d-óbito	...	-	tromb pulmonar + cirrose	-
12	26/3/1999	VE	não	N	...	...	N	...	...	-	-	-
13	21/6/1999	<b>VE+VD</b>	VM	N	CFII	2005-CFIII	30/8/2005	6a	...	<b>EV+CMV</b>	reop: troca VM + ress VE	-
14	1/12/1999	<b>VD+VE</b>	VT+tr VM	N	...	1999-CFII	N	29d	...	<b>EV</b>	-	-
15	7/6/2000	<b>VD+VE</b>	VM+VT	6d	óbito	1999-CFIV	N	6d-óbito	...	-	choque cardiogênico	-
16	12/6/2000	<b>VE+VD</b>	VM+VT	N	...	2000-CFI	N	9d	...	<b>neg</b>	-	-
17	1/9/2000	<b>VE+VD</b>	VM+VT	N	...	2000-CFI	N	6d	...	-	-	-
18	1/3/2001	VE+VD	VM+VT	N	CFI	2003-CFI/II	N	2a4m	...	<b>EV</b>	-	-
19	11/4/2001	VE	VM	N	CFI	2005-CFII+dor	N	4a	...	-	persiste dor	-
20	27/6/2001	VE	VM+VT	N	CFII	2005-CFIV	N	4a	...	<b>neg</b>	-	-
21	3/9/2001	VE	VM+VT	N	CFI	2003-CFII	N	1a6m	...	-	-	-
22	5/11/2001	VE	VM	N	CFII	2005-CFII/III+dor	N	5a	...	<b>neg</b>	persiste dor	-
23	19/11/2001	VE	VM	N	CFI	2006-CFII	N	5a	...	-	-	-
24	4/6/2002	VE	VM	N	CFII	2005-CFII	N	3a	...	<b>T. gondii</b>	-	-
25	22/1/2003	VE	VM+VT	N	CFI	2005-CFI	N	2a	...	-	-	-
26	28/3/2003	VD	VT	63d	óbito	2003-CF-IV	N	63d-obito	...	-	choque cardiogênico	-
27	18/7/2003	VE	VM+VT	53d	óbito	2003-CFIV	N	53d-obito	...	-	tromb pulmonar	A184-03
28	22/9/2003	<b>VE+VD</b>	VM+VT	N	CFI	2004-CFI/II	N	6m	...	<b>CMV</b>	-	-
29	26/11/2004	<b>VD+VE</b>	VM+VT	19d	óbito	2004-CFIV	N	19d-obito	...	-	bcp	-
30	9/12/2004	VE	VM	N	CFI	2005-CFI+dor	N	6m	...	-	-	-
31	7/6/2005	VD	VT	2d	óbito	2005-CFIV	N	2d-obito	...	-	bcp+ cirrose hepatica	A100-05
extra	15/3/1993	VE	VM+VT	N	...	2001-CFI	N	7a	...	<b>neg</b>	-	-

## Legenda do **anexo D**

**Bcp** - brocopneumonia;

“**blush**” - imagem de neovascularização à cineangiocoronariografia;

**CD** - coronária direita;

**CE** - coronária esquerda;

**CF** - classe funcional (NYHA);

**CMV** - citomegalovirus;

**DR** - doença reumática;

**diab** - diabetes mellitus;

**disp** - dispnéia;

**dor prec** - dor precordial;

**edem** - edema de membros inferiores;

**eosinof** - eosinofilia periférica;

**EV** - enterovirus;

**F** - feminino;

**H** - histórico;

**HAS** - hipertensão arterial sistêmica;

**Hipotireoi** - hipotireoidismo;

**id** - idade;

**M** - masculino;

**N** - não;

**op** - operação;

**PCR** - reação em cadeia da polimerase;

**pl valvar** - plastia valvar atrioventricular;

**PO** - pós-operatório;

**proc** - procedência;

**purp pigm** - púrpura pigmentosa crônica;

**Q alérgico** - quadro alérgico;

**Q clínico** - quadro clínico;

**reop** - reoperação;

**S** - sim;

**sint** - sintoma;

**S. hipereos** - síndrome hipereosinofílica;

**t. doença** - tempo de evolução da doença no pré-operatório;

**tromb pulmonar** - trombose pulmonar;

**t. seguim** - tempo de seguimento clínico no pós operatório;

**ult. ev** - data da última evolução clínica;

**VD** - ventrículo direito;

**VE** - ventrículo esquerdo;

**VM** - valva mitral;

**VT** - valva tricúspide

## ANEXO E

### Correlação entre o nº de células inflamatórias do endocárdio (end) X miocárdio (mioc)

(coeficiente de correlação de Pearson)

conteúdo das células: coeficiente de correlação

valor P

número de amostras (n)

	Mioc-CD3	Mioc-CD20	Mioc-Eos	End-CD68	End-CD3	End-CD20	End-Eos
<b>Mioc-CD68</b>	-0,171 0,660 9	<b>0,761</b> <b>0,0171</b> 9	-0,155 0,690 9	0,593 0,0926 9	0,594 0,0918 9	0,177 0,649 9	0,592 0,0933 9
<b>Mioc-CD3</b>		0,117 0,765 9	-0,0523 0,894 9	-0,269 0,484 9	0,197 0,611 9	0,102 0,794 9	0,169 0,663 9
<b>Mioc-CD20</b>			-0,200 0,606 9	0,488 0,183 9	0,448 0,226 9	0,292 0,446 9	0,506 0,165 9
<b>Mioc-Eos</b>				0,465 0,207 9	0,375 0,320 9	<b>0,763</b> <b>0,0168</b> 9	0,392 0,297 9
<b>End-CD68</b>					0,571 0,108 9	<b>0,652</b> <b>0,0568</b> 9	0,368 0,330 9
<b>End-CD3</b>						0,478 0,193 9	0,563 0,115 9
<b>End-CD20</b>							0,485 0,186 9

**Comparação entre os grupos de pacientes com e sem imagem de “blush” à cineangiocoronariografia, em relação ao número de vasos/ mm<sup>2</sup>, fração de área de lúmen vascular (Lv) e porcentagem de espessura de parede vascular (Pv)- (teste t)**

	<b>Pacientes com “blush” (n=9)</b>	<b>Pacientes sem “blush” (n=7)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Nº vasos/mm<sup>2</sup></b>	66,77 ± 24,60	58,67 ± 27,78	0,546
<b>Fração área Lv(%)</b>	5,51 ± 1,74	5,77 ± 2,20	0,800
<b>Espessura Pv (%)</b>	13,19 ± 3,83	13,80 ± 4,90	0,783

**Comparação entre os grupos de pacientes com e sem sintoma de dor precordial , em relação ao número de vasos/ mm<sup>2</sup>, fração de área de lúmen vascular (Lv) e porcentagem de espessura de parede vascular (Pv)- (teste t).**

	<b>Pacientes com dor precordial (n = 15)</b>	<b>Pacientes sem dor precordial (n = 5)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Nº vasos/mm<sup>2</sup></b>	68,43 ± 23,80	53,56 ± 20,58	0,229
<b>Fração área Lv(%)</b>	5,63 ± 2,83	5,74 ± 1,75	0,933
<b>Espessura Pv (%)</b>	13,44 ± 6,24	13,76 ± 3,93	0,915

# 8

## **8. REFERÊNCIAS**

---

Adamko DJ, Odemuyiwa SO, Vethanayagam D, Moqbel R. The rise of the phoenix: the expanding role of the eosinophil in health and disease. *Allergy*. 2005; 60:13-22.

Adams DH, Lloud AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*. 1997; 349: 490-5.

Aiello VD, Higuchi ML. Frequency and severity of endocardial fibroelastosis in dilated hearts of children. *Cardiol Young*. 1994; (4): 117-21.

Alipour M, Tarbiat C, Nazarian I. Right endomyocardial fibrosis simulating Ebstein's anomaly. *Am Heart J*. 1980; 100: 859-65.

Andrade ZA e Guimarães AC. Endomyocardial fibrosis in Bahia, Brazil. *Br Heart J*. 1964; 26: 813-20.

Andrade ZA, Teixeira ARL. Changes in the coronary vasculature in endomyocardial fibrosis and their possible significance. *Am Heart J*. 1973; 86, 2: 152-8.

Andy JJ. Aetiology of EMF. *West Afr J Med*. 2001; 20(3): 199-207.

Andy JJ, Bishara FF, Soyinka OO. Relation of severe eosinophilia and microfilariosis to chronic African endomyocardial fibrosis. *Br Heart J*. 1981; 45: 672-80.

Andy JJ, O'Connell JP, Daddario RC, Roberts WC. Trichinosis causing extensive ventricular mural endocarditis with superimposed thrombosis. Evidence that severe eosinophilia damages endocardium. *Am J Med.* 1977; 63: 824-9.

Andy JJ, Ogunowo PO, Akpan NA, Odigwe CO, Ekanem IA, Esin RA. Helminth associated hypereosinophilia and tropical endomyocardial fibrosis (EMF) in Nigeria. *Acta Trop.* 1998. 69: 127-40.

Angeli V, Ginhoux F, Llodra J, Quemeneur L, Frenett Os, Skobe M et al. B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymphnodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity.* 2006; 24: 203-15.

Aretz TA. Myocarditis: The Dallas Criteria. *Hum Pathol.* 1987; 18(6): 619-24.

Balakrishnan KG, Jaiswal PK, Tharakan JM, Venkitachalam CG, Ghosh MK. Clinical course in Kerala. In: Valiathan MS, Somers K, Kartha CC. *Endomyocardial Fibrosis.* Delhi: Oxford University Press; 1993. p. 20-8.

Balakrishnan KG, Sasidharan CG, Venkitachalam CG, Sapru RP. Coronary angiographic features in endomyocardial fibrosis. *Cardiology.* 1983; 70: 121-6.

Ball JD, Williams AW, Davies JNP. Endomyocardial fibrosis. *Lancet.* 1954; 1: 1049-54.

Beck W, Schrire V. Endomyocardial fibrosis in Caucasians previously resident in tropical Africa. *Br Heart J.* 1972; 34, 915-8.

Bedford DE, Konstam, GLS. Heart failure of unknown aetiology in Africans. *Br Heart J.* 1946; 236-237.

Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Laboratory Investigation*. 2007; 87:858-70.

Bestetti RB. O envolvimento da microcirculação coronariana nas cardiomiopatias. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2003; 4: 464-9.

Bestetti RB, Corbucci H, Fornitano L, Godoy M, Cury PM Villafanha D et al. Angina-like Chest pain and syncope as the clinical presentation of left ventricular endomyocardial fibrosis. *Angiology*. 2005; 56(3): 339-42.

Bishop JE, Greenbaum R, Gibson DG, Yacoub M, Laurent GJ. Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol*. 1990; 22: 1157-65.

Bolarin DM, Andy JJ. Enzymes of collagen synthesis and type III procollagen amino-propeptide in serum from Nigerians with chronic endomyocardial fibrosis. *Ann Clin Res*. 1983; 15: 123-7.

Bowles NE, Ni J, Kearney DL. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42: 466-72.

Bowles NE, Ni J, Marcus F, Towbin JA. The detection of cardiotropic viruses in the myocardium of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39: 892-5.

Braunwald E. *Heart Disease: a textbook of cardiovascular disease*. 6° ed. EUA. Ziper and Libby. 2001; p.1780-3.

Brindeiro Filho D, Cavalcanti. O valor do ecodopplercardiograma na identificação diagnóstica e no manuseio da endomiocardiofibrose. *Arq Bras Cardiol*. 1996; 67: 279-84.

Brockington IF, Olsen EGJ. Löffler's endocarditis and Davies' endomyocardial fibrosis. *Am Heart J.* 1973; 85: 308-22.

Calabrese F, Angelini A, Thiene G, Basso C, Nava A, Valente M. No detection of enteroviral genome in the myocardium of patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Pathol.* 2000; 53: 382-7.

Calabrese F, Rigo E, Milanese O, Boffa GM, Angelini A, Valente M, Thiene G. Molecular diagnosis of myocarditis and dilated cardiomyopathy in children: clinicopathologic features and prognostic implications. *Diagn Mol Pathol.* 2002; 11:212-21.

Chopra P, Narula J, Talwar KK, Kumar V, Bhatia ML. Histomorphologic characteristics of endomyocardial fibrosis: as endomyocardial biopsy study. *Hum Pathol.* 1990; 21: 613-6.

Cockshott WP. Angiocardiography of endomyocardial fibrosis. *Brit J Radiol.* 1965; 38: 192-200.

Connor DH, Somers K, Hut MSR, Marrion W, D'Arbela PG. Endomyocardial fibrosis in Uganda (Davie's disease). Part 1: *Am Heart J.* 1967; 74: 687-709. Part 2: *Am Heart J.* 1968; 75: 107-124.

Corradi D, Vaglio A, Maestri R, Legname V, Leonardi G, Bartoloni G et al: Eosinophilic myocarditis in a patient with idiopathic hypereosinophilic syndrome: insights into mechanisms of myocardial cell death. *Hum Pathol.* 2004; 35(9): 1160-3.

Cotran R, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease.* 6<sup>o</sup> ed. Philadelphia. WB Saunders Company, 1999. p. 89-111.

Cury R. Visualization of endomyocardial fibrosis in magnetic resonance. *Circulation*. 2005; 111 (9): 115-7.

D'Arbela PG, Mutazindwa T, Patel AK, Somers K. Survival after first presentation with endomyocardial fibrosis. *Br Heart J*. 1972; 34: 403-7.

Davies H. The aetiology of endomyocardial fibrosis . In: Valiathan MS, Somers K, Kartha CC. *Endomyocardial fibrosis*. Delhi: Oxford University Press; 1993. p. 73-80.

Davies JNP. Endocardial fibrosis in Africans. *East Af Med J*. 1948; 25: 10-14.

Davies JNP, Ball JD. The pathology of endomyocardial fibrosis in Uganda. *Br Heart J*. 1955; 17: 337-359.

Diong D and Knowlton K. Dystrophin deficiency markedly increases enteroviral cardiomyopathy: a genetic predisposition to viral heart disease. *Circulation*. 2001; 104 (1), II-82.

Dubost C, Maurice P, Gerbaux A, Bertrand R, Rullière R, Vial A et al. The surgical treatment of constrictive fibrous endocarditis. *Ann Surg*. 1976; 184: 303-7.

Ferrer-Brown G, Tarbit MT, Somers K, Hatt MSR. Microvascular studies of hearts of endomyocardial fibrosis. *Br Heart J*. 1972; 34: 1250- 62.

Guimarães AC. Natural history and current status in Brazil. In: Valiathan MS, Somers K, Kartha CC. *Endomyocardial Fibrosis*. Delhi: Oxford University Press; 1993. p. 37-54.

Guimarães AC, Esteves JF, Filho AS, Macedo V. Clinical aspects of endomyocardial fibrosis in Bahia, Brazil. *Am Heart J*. 1971; 81: 7-19.

Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N et al. The new stereological tools: dissector, fractionators, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scan (APMIS)*. 1988; 96: 857-81

Gupta PN, Valiathan M, Balakrishnan KG, Kartha C, Ghosh M. Clinical course of endomyocardial fibrosis. *Br Heart J*. 1989; 62: 450-4.

Heller F, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Brandt U, Draganovici D, Fischereeder M et al. The contribution of B cells to renal interstitial inflammation. *Am J Pathol*. 2007; 170 (2):457-68.

Higuchi ML, Fukasawa, De Brito T, Parzianello, Bellotti, Ramires JAF. Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. *Heart*. 1999; 82: 279-85.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The Myofibroblast. one function, multiple origins. *Am J Pathol* . 2007; 170: 1807-16.

Hofman P, Drici MD, Gibelin P, Michiels JF, Thyss A. Prevalence of *Toxoplasma myocarditis* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Br Heart J*. 1993; 70: 376-81.

Hohlfeld P, Daffor F. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with PCR test in fluid amniotic. *N England J Med*. 1994; 331 (11): 695-9.

Ijaola O, Falase AO. Distribution of antibodies against Coxsackie B viruses, arboviruses and *Toxoplasma gondii* among patients with endomyocardial fibrosis (EMF) compared with normal subjects from EMF-endemic and non endemic zones of Nigeria. *Afr J Med Sci*. 1990; 19: 93-103.

Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Tanaka M, Shimokawa R et al. Lymphangiogenesis in myocardial remodeling after infarction. *Histopathology*. 2007; 51: 345-53.

Jaiysemi F. Controversies and advances in endomyocardial fibrosis: a review. *Afr J Med med Sci*. 1982; 11: 37-46.

Janin A. Eosinophilic myocarditis and fibrosis. *Human Pathol*. 2005; 36 (5): 592-3.

Kartha CC. Endomyocardial fibrosis : a case for the tropical doctor. Mini-review. *Card Research*. 1995; 30: 635-43.

Kartha CC, Mathai A, Balakrishnam KG, Valiathan MS. Immunohistological studies in endomyocardial fibrosis. *Heart J*. 1984; 36 (2): 90-1.

Keeling PJ, Tracy S. Link between enteroviruses and dilated cardiomyopathy: serological and molecular data. *Br Heart J*. 1994; 72(suppl): S25-9.

Krieger EM. *Fisiologia Cardiovascular*. São Paulo. Ed Dep de Fisiologia Cardiovascular e respiratória da Soc Bras de Cardiologia. 1976. p. 249.

Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP. Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart*. 1996; 75: 295-300.

Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M. High prevalence of viral genomes and multiple infections in the myocardium of adults with "idiopathic" ventricular dysfunction. *Circulation*. 2005; 111: 887-93.

Kushwaha S, Fallon J, Fuster V. Restrictive Cardiomyopathy - review article. *N Engl J Med*. 1997; 336(4): 267-75.

Kwan T, Feit A. Late neovascularization of longstanding left ventricular mural thrombus – a case report. *Angiology*. 1993; 44 (8): 647-50.

Kytö V, Vuorinem T, Saukko P, Lautenschlager I, Lignitz E, Saraste A, Voipio-Pulkki. Cytomegalovirus infection of the heart is common in patients with fatal myocarditis. *Clin Inf Dis*. 2005; 40: 683-8.

Lam KM, Oldenburg N, Kahan MA, Gaylore V, Mikhail GW, Strouhal PD et al. Significance of reverse transcription polymerase chain reaction in the detection of human cytomegalovirus gene transcripts in thoracic organ transplant recipients. *J Heart Lung Transpl*. 1998; 17: 555-65.

Li Y, Peng T, Yang Y, Niu C, Archard LC, Zhang H. High prevalence of enteroviral genomic sequences in myocardium from cases of endemic cardiomyopathy (Keshan disease) in China. *Heart*. 2000; 83: 696-701.

Linder J, Cassling RS, Rogler WC, Wilson JE, Markin RS, Sears TD et al. Immunohistochemical Characterization of lymphocytes in uninflamed ventricular myocardium. *Arch Pathol Lab Med*. 1985; 109: 917-20.

Lira VMC. Patologia – “Endomiocardiofibrose”. *Arq Bras Card*. 1996; 67(4): 273-7.

Ludlum GB, Somers K. Incidence of toxoplasma antibodies in Uganda with special reference to cardiomyopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1966; 60(5): 621-5.

Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, Tamassia N et al. Endothelial cells' activation and apoptosis induced by a subset of antibodies against human cytomegalovirus: relevance to the pathogenesis of atherosclerosis. Available from <http://www.plosone.org/article/fetchArticle.action> 31/5/2007.

Mady C, Pereira Barreto AC, de Oliveira SA, Stolf N, Bellotti G, Jatene AD, Pileggi F. Effectiveness of operative and non operative therapy in endomyocardial fibrosis. *Am J Card* .1989; 63: 1281-2.

Mady C, Pereira Barreto AC, de Oliveira SA, Stolf N, Bellotti G, Pileggi F. Evolution of the endocardial fibrotic process in endomyocardial fibrosis. *Am J Cardiol*. 1991; 68: 402-3.

Marijianowski M, Teeling P, Mann J, Becker AE. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/III collagen ratio: a quantitative assessment. *J Am Coll Cardiol*.1995; 25:1263-72.

Mattos AG, Achutti A, Fagundes L, Lima CP, Faraco E. Fibrose endomiocárdica: o primeiro caso publicado no Brasil. *Arq Brasil Cardiol*. 1963; 16: 67-76.

Mayosi, BM. Contemporary trends in the epidemiology and management of cardiomyopathy and pericarditis in sub-Saharan Africa. *Heart*. 2007; 93(10): 1176-83.

Mayosi, BM, Somers K. Cardiomyopathy in Africa: heredity versus environment. *Cardiovasc J Afr*. 2007; 18: 175-9.

Meuwissen M, Somsen GA, Piek J. Neovascularity related to mural thrombus in endomyocardial fibrosis. *Int J of Cardiac Imaging*. 1999; 15: 205-7.

Moraes F, Lapa C, Hazin S, Tenorio E, Gomes C, Moraes CR. Surgery for endomyocardial fibrosis revisited. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999; 15(3): 309-12.

Munitz A, Levi-Shaffer F. Eosinophils: new roles for old cells. *Allergy*. 2004; 59: 268-75

Ni J, Bowles NE, Kim Y-H et al. Viral infection of the myocardium in endocardial fibroelastosis. *Circulation*. 1997; 95: 133-9.

Nield LE, Silverman ED, Taylor GP, Smallhorn JF, Mullen JB, Silverman NH et al. maternal anti-RO and anti-La antibody associated endocardial fibroelastosis. *Circulation*. 2002; 105(7): 843-8.

Noguchi H, Kephart GM, Colby TU, Gleich GJ. Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation in syndromes associated with fibrosis. *Am J Pathol*. 1992; 140(2): 521-8.

Noutsias M, Paushinger HP, Schultheiss HP, Kül U. Advances in the immunohistological diagnosis of inflammatory cardiomyopathy. *Eur Heart J. Supplement*. 2002; 4(suppl I): I54-61.

Oakley CM, Olsen GJ. Eosinophilia and heart disease. *Br Heart J*. 1977; 39: 233-7.

Ojo GO. The pathogenesis of endomyocardial fibrosis: the question of 5-hydroxytryptamine. *Br Heart J*. 1970; 32: 671-4.

Oliveira SA, Dallan LAO, Pereira Barretto AC, Mady C, Jatene AD. Cirurgia da endomiocardiofibrose com preservação das valvas atrioventriculares. *Arq Bras Cardiol*. 1996; 67(4): 289-95.

Oliveira SA, Pereira Barretto AC, Mady C, Dallan LAO, da Luz PL, Jatene AD, Pileggi F. Surgical treatment of endomyocardial fibrosis: a new approach. *J Am Coll Cardiol*. 1990; 16 (5): 1246-51.

Olsen EGJ, Spry CJF. Relation between eosinophilia and endomyocardial disease. *Prog Card Dis*. 1985; 27, 4: 241-254.

Ordóñez N. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol*. 2006; 13(2): 83-8.

Patel AK, D'Arbella PG, Somers K. Endomyocardial fibrosis and eosinophilia. *Br Heart J*. 1977; 39: 238-41.

Pellikka PA, Tajik AJ, Khandheria BK, Seward JB, Callahan JA, Pitot HC, Kvols LK. Carcinoid Heart Disease. Clinical and echocardiographic spectrum in 74 patients. *Circulation*. 1993; 87: 188-96.

Pereira Barretto AC, Bellotti G, Higuchi ML, Stolf NAG, Dauar D, Mady C et al. Biópsia endomiocárdica do ventrículo direito em portadores de endomiocardiofibrose. *Arq Bras Cardiol*. 1986; 46(1): 19-21.

Pereira Barretto AC, da Luz PL, de Oliveira AS, Stolf NAG, Mady C, Bellotti G et al. Determinants of survival in endomyocardial fibrosis. *Circulation*. 1989; 80(suppl I): I-177-I-182.

Pereira Barretto AC, Mady C, Nussbacher A, Ianni BM, Oliveira SA, Jatene A et al. Atrial fibrillation in endomyocardial fibrosis is a marker of worse prognosis. *Int J Cardiol*. 1998; 67: 19-25.

Pereira Barretto AC, Mady C, Oliveira AS, Arteaga E, Bó CD, Ramires JAF. Clinical meaning of ascites in patients with endomyocardial fibrosis. *Arq Bras Cardiol*. 2002; 78(2): 196-9.

Pereira Barretto AC, Mady C, Pileggi F. Seguimento longitudinal dos pacientes não submetidos a cirurgia. *Arq Bras Cardiol*. 1996; 67 (4): 285-8.

Pereira Barretto AC, Pileggi F. Endomiocardiofibrose: cem casos, dez anos de experiência. *Arq Bras Cardiol*. 1988; 51(1): 117-20.

Perez RL, Rivera-Marrero CA, Roman J. Pulmonary. Granulomatous Inflammation: from sarcoidosis to tuberculosis. *Seminars Resp Infections*. 2003; 18 (1): 23-32.

Radhakumary C, Kumari TV, Kartha CC. Endomyocardial Fibrosis is associated with selective deposition of type I collagen. *Indian Heart J*. 2001; 53: 486-9.

Rashwan MA, Ayman M, Ashour S, Hassanin MM, Zeina AAA. Endomyocardial fibrosis in Egypt: an illustrated review. *Br Heart J*. 1995; 73: 284-9.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386: 671-4.

Roufosse F, Cogan E, Goldman M. Recent advances in pathogenesis and management of hypereosinophilic syndromes. *Allergy* 2004; 59: 673-89.

Rutakingirwa M, Ziegler JL, Newton R, Freers J. Poverty and eosinophilia are risk factors for endomyocardial fibrosis (EMF) in Uganda. *Trop Med Int Health*. 1999; 4(3): 229-35.

Salemi VMC. *Preditores ecocardiográficos da capacidade funcional em pacientes com endomiocardiofibrose* [Tese de Doutorado]. São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo, 2002. 126p.

Salemi VMC, Mady C. Aspectos clínicos e fatores prognósticos em pacientes com endomiocardiofibrose. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2003; 13 (4): 509-15.

Salemi VMC, Mady C. Assessment of diastolic function in endomyocardial fibrosis: value of flow propagation velocity. *Artificial organs*. 2004; 28(4): 343-6.

Sari I, Soydinc S, Davutoglu V, Sezen Y, Aksoy M. Uncomplicated diabetes mellitus is equivalent for coronary artery disease: new support from novel angiographic myocardial perfusion-myocardial blush. *Int J Cardiol*. (2007), doi: 10.1016/j.ijcard.2007.04.002.

Schneider U, Jenni R, Turina J, Turina M, Hss OM. Long Term follow up of patients with endomyocardial fibrosis: effects of surgery. *Heart*. 1998; 79: 362-67.

Schowengerdt KO, Ni J, Denfield SW, Gajarski RJ, Bowles NE, Rosenthal G et al. Association of parvovirus B19 genome in children with myocarditis and cardiac allograft rejection: diagnosis using the polymerase chain reaction. *Circulation*. 1997; 96: 3549-54.

Senra T, Shiozaki AA, Salemi VMC, Rochitte CE. Delayed enhancement by multidetector computed tomography in endomyocardial fibrosis. Available from: <http://www.eurheartj/ehm372>

Shaper AG. Endomyocardial fibrosis and rheumatic heart-disease. *Lancet*. 1966; i: 639-41.

Shaper AG. The aetiology of endomyocardial fibrosis. In: Valiathan MS, Somers K, Kartha CC. *Endomyocardial fibrosis*. Delhi: Oxford University Press; 1993. p. 111-20.

Shillingford JP, Somers K. Clinical and haemodynamic patterns in endomyocardial fibrosis. *Br Heart J*. 1961; 23: 433-45.

Sliwa K, Damasceno A, Mayosi BM. Epidemiology and etiology of cardiomyopathy in Africa. *Circulation*. 2005; 112: 3577-83.

Somers K. A history of endomyocardial fibrosis in Uganda. In: Valiathan MS, Somers K, Kartha CC. *Endomyocardial Fibrosis*. Delhi: Oxford University Press; 1993. p.3-9.

Somers K, Hutt MSR, Patel AK, D'Arbela PG. Endomyocardial biopsy in diagnosis of cardiomyopathies. *Br Heart J*. 1971; 33: 822-32.

Soulen RL, Grollman JH, Paglia D, Kreulen T. Coronary neovascularity and fistula formation – a sign of mural thrombus. *Circulation*. 1977; 56 (4): 663-6.

Spry CJF. Eosinophils in eosinophilic endomyocardial disease. *Postgrad Med J*. 1986; 62: 609-13.

Teixeira MM, Wells TNC, Lukacs NW, Proudfoot AEI, Kunkel SL, Williams TJ et al. Chemokine-induced eosinophil recruitment. *J Clin Invest*. 1997; 100: 1657-66.

Ueno H, Yokota Y, Shiotani H et al. Significance of detection of enterovirus RNA in myocardial tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Int J Cardiol*. 1995; 51: 157-64.

Valiathan MS, Kartha CC. Endomyocardial fibrosis – the possible connexion with myocardial levels of magnesium and cerium- review. *Int J Cardiol*. 1990; 28 (1): 1-5.

Valiathan MS, Kartha CC, Nair RR, Shivakumar K, Eapen JT. Geochemical basis of tropical endomyocardial fibrosis. In *Endomyocardial fibrosis*. Valiathan MS, Somers K, Kartha CC. *Endomyocardial fibrosis*. Delhi: Oxford University Press; 1993. p. 98-110.

Valiathan M.S. Endomyocardial fibrosis- review article. *Nat Med J of India*. 1993; 6 (5):212-6.

van der Geld H, Peetom F, Somers K, Kanyerezi BR. Immunohistological and serological studies in endomyocardial fibrosis. *Lancet*. 1966. ii: 1210-3.

Viana CB, Pereira Barretto AC, Bellotti G. Correlação entre eosinofilia e endomiocardiofibrose. Situação atual. *Arq Brasil Cardiol*. 1990; 54(4): 247-50.

Williams AW, Somers, K. The electrocardiogram in endomyocardial fibrosis. *Br Heart J*. 1960; 22: 311-5.



**Apêndice**



**INSTITUTO DO CORAÇÃO**  
(Fundação E. J. Zerbiní)  
Hospital das Clínicas  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



Mem. CC. 1283

São Paulo, 6 de novembro de 2003.

Ao  
Dr. Luiz Alberto Benvenuti

A Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração, apreciou na sessão 439/03/18 de 6.11.2003, o Protocolo de Pesquisa SDC 2354/03/148 **“Endomiocardiofibrose: Estudo anátomo patológico em biópsias cirúrgicas e autópsias. Sua correlação clínica em 35 casos”**, e foi o seguinte o parecer: **“Aprovado no mérito científico, sem ônus para a Instituição”**.

Atenciosamente,

  
**Selma Cristina Quaia**  
Secretária da Comissão Científica e de Ética  
InCor/HC/FMUSP

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)