

**Andrea Tostes de Oliveira**

**Auto-Anticorpo Anti- $\beta_1$ -Adrenorreceptor  
na Cardiomiopatia Dilatada**

Dissertação apresentada a  
Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal  
Fluminense para obtenção  
de título de Mestre em  
Ciências Cardiovasculares.

Área de Concentração:  
Cardiologia  
Orientador: Prof. Dr.  
Evandro Tinoco Mesquita

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Niterói-RJ**

**2009**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a minha família, por ser fonte constante de estímulo, conforto e equilíbrio em minha vida.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Prof. Dr. Evandro Tinoco Mesquita,  
meu orientador, pelo estímulo científico,  
pela confiança depositada e por todo o  
apoio e ajuda a esta tese.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Vitor Pordeus, pela ajuda científica na elaboração e acompanhamento da tese, importantes para concretização.

Ao Dr. Antônio Carlos Campos de Carvalho, por ter viabilizado a infraestrutura para realizar o projeto.

À Dra Ciria Carolina Quintero Hernandez, pela ajuda científica e dedicação na análise do anticorpo.

Ao Dr. Luiz Dias, pela ajuda científica e auxílio na análise do anticorpo.

Aos pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro, por terem consentido em participar do estudo.

## SUMÁRIO

Lista das tabelas	<i>vi</i>
Lista das figuras	<i>vii</i>
Lista de siglas	<i>viii</i>
Resumo	<i>ix</i>
Summary	<i>xi</i>
1 INTRODUÇÃO – FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA.....	1
1.1 CARDIOMIOPATIAS.....	4
1.2 ETIOPATOGENIA DAS CARDIOMIOPATIAS DILATADAS.....	6
1.3 CARDIOMIOPATIAS INFLAMATÓRIAS.....	8
1.4 MIOCARDITES.....	11
1.5 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA CMD: (CITOCINAS PRÓ- INFLAMATÓRIAS).....	15
1.6 DOENÇA DE CHAGAS.....	20
1.7 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA INVASIVA (BIÓPSIA ENDOMIOCÁRDICA – BEM ).....	21
1.8 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA NÃO INVASIVA.....	23
1.9 AUTO-ANTICORPOS NAS CARDIOMIOPATIAS DILATADAS.....	26
1.10 IMUNOADSORÇÃO.....	38
2 OBJETIVOS DO ESTUDO.....	42
3 MÉTODOS.....	43
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DO ANTICORPO ANTI 02 B1- ENTRE OS GRUPOS IC E DE CONTROLE.....	49
5.2 COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA NO GRUPO IC.....	49

5.3	COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR ENTRE OS SEXOS, NO GRUPO IC.....	50
5.4	COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1-AR EM RELAÇÃO HISTÓRIA DE INFECÇÃO PRÉVIA.....	50
5.5	COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1-AR ENTRE TEMPO DE DOENÇA: 6 MESES E 12 MESES.....	51
5.6	COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1 AR EM RELAÇÃO A FE: >35% E 35%.....	51
5.7	COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR ENTRE OS DOIS GRUPOS DE IC (MIOCARDITE E CMD NÃO INFLAMATÓRIA) ESTUDADOS EM RELAÇÃO A IDADE, FE E ELISA.....	51
5.8	COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR ENTRE OS GRUPOS MIOCARDITE E GRUPO CONTROLE.....	52
5.9	COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR ENTRE OS GRUPOS CMD NÃO INFLAMATÓRIA E GRUPO CONTROLE.....	53
5.10	CORRELAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO SIGNIFICATIVA ENTRE O ELISA E A IC.....	53
5.11	VERIFICAÇÃO SE EXISTÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO SIGNIFICATIVA ENTRE ELISA E GRUPO IC .....	54
6	DISCUSSÃO.....	55
7	LIMITAÇÃO DO ESTUDO.....	58
8	CONCLUSÃO.....	59
9	BIBLIOGRÁFIAS.....	60
10	ANEXOS.....	64



## LISTA DAS TABELAS

<b>Número</b>	<b>Descrição</b>	<b>Página</b>
TABELA 1	Cardiomiopatias	5
TABELA 2	Agentes indutores de miocardite	12
TABELA 3	Critério Histológico para diagnóstico de miocardite e critério WHF	22
TABELA 4	Anticorpos presentes nas CMD	27
TABELA 5	Características Clínicas dos Grupos Estudados	47
TABELA 6	Características Clínicas e laboratoriais dos Grupos Estudados	49
TABELA 7	Comparação da Titulação do Anticorpo anti $\beta$ 1- AR entre os Grupos IC e de Controle	49
TABELA 8	Comparação da Titulação do Anticorpo anti $\beta$ 1- AR de acordo a Idade no Grupo IC	50
TABELA 9	Comparação da Titulação do Anticorpo anti $\beta$ 1- AR entre os Sexos, no Grupo IC	50
TABELA 10	Comparação da Titulação do Anticorpo Anti $\beta$ 1-AR em relação história de Infecção prévia no Grupo IC	51
TABELA 11	Comparação da Titulação do Anticorpo Anti $\beta$ 1-AR em relação ao Tempo de Doença no Grupo IC: 6 meses e 12 meses	51
TABELA 12	Comparação da Titulação do Anticorpo Anti $\beta$ 1-AR em relação a FE no Grupo IC : $> 35$ e $\leq 35$ %	52
TABELA 13	Comparação da Titulação do Elisa nos Grupos Miocardite e CMD não Inflamatória	52
TABELA 14	Titulação do Anticorpo anti $\beta$ 1-AR entre os Grupos: Miocardite e Grupo Controle	53
TABELA 15	Titulação do Anticorpo anti $\beta$ 1- AR entre os Grupos: Controle e CMD não inflamatória	53
TABELA 16	Elisa $> 0,300$ : ELISA e IC	53
TABELA 17	Elisa $> 0,300$ : IC e grupo controle	54

## LISTA DAS FÍGURAS

<b>Número</b>	<b>Descrição</b>	<b>Página</b>
Figura 1	Patogênese da CMD inflamatória	9
Figura 2	Distribuição do genoma viral	11
Figura 3	Receptores enterovirais	13
Figura 4	Concentrações de anti O2 $\beta$ 1 AR nos grupos miocardite e CMD não inflamatória	51

## LISTA DE SIGLAS

AC	Anticorpos
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
B1-AR	Receptor beta-1 adrenérgico
B1-EC II	Receptor da segunda alça extracelular B1
BEM	Biópsia endomiocárdica
CAR	Receptor enteroviral
CK	Creatinafosfoquinase
CMD	Cardiomiopatia dilatada
CMDI	Cardiomiopatia dilatada idiopática
CMinf	Cardiomiopatia dilatada inflamatória
CF	Classe funcional
CH	Cardiomiopatia hipertensão arterial
DAF	Fator de decomposição de proteína
DV	Doenças valvares
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ESSV	Extrassístoles supra-ventriculares
ESV	Extrassístole ventriculares
FA	Fibrilação atrial
FE	Fração de ejeção
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FN	Fator nuclear
Gs	Proteína estimulatória
HLA	Complexo histocompatibilidade principal
IA	Imunoadsorção
IAM	Infarto agudo do miocárdico
IC	Insuficiência cardíaca
ICAM	Moléculas de adesão intracelular
IFL	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase-isoforme
ISFC	Força Tarefa da Sociedade Internacional e a Federação de Cardiologia
LPS	Lipossacarídeo
MAC	Moléculas de células de adesão
NYHA	New York American Association
ON	Óxido nítrico
ONS	Óxido nítrico sintase
PCR	Reação de cadeia de polimerase
PCR	Proteína-C-reativa
PSB	Soro fetal bovino
RNM	Ressonância magnética
TNF	Fator de necrose tumoral
TV	Taquicardia ventriculares
VCAM	Moléculas de células de adesão vascular
VE	Ventrículo esquerdo
WHO	Organização Mundial de Saúde

## RESUMO

OLIVEIRA, Andrea Tostes. **Auto-anticorpo Anti-Beta<sub>1</sub>-Adrenorreceptor na Cardiomiopatia Dilatada.** Niterói, 2009. Tese (mestrado). Universidade Federal Fluminense.

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma doença caracterizada por progressiva depressão da contratilidade miocárdica e dilatação ventricular. Distúrbios da imunidade humoral e celular têm sido descritos na miocardite e CMD. Uma variedade de auto-anticorpos contra proteínas cardíacas têm sido identificados. Auto-anticorpos contra proteínas contráteis, beta ( $\beta$ ) 1-adrenoreceptores, receptores muscarínicos, proteínas mitocondriais, canais de cálcio e retículo sarcoplasmático. As implicações funcionais dos auto-anticorpos cardíacos na patogenia da CMD ainda são incertas. Se auto-anticorpos têm relação com a iniciação ou progressão da CMD, a remoção desses auto-anticorpos poderia levar à estabilização ou melhora da doença. Auto-anticorpos pertencentes à fração de Ig G são extraídos pela técnica de Imunoadsorção (IA). A IA e subsequente substituição da IgG melhora os parâmetros funcionais e a resposta inflamatória em pacientes com CMD, podendo ser uma forma adicional de tratamento. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença do auto-anticorpo anti- $\beta$ 1-EC II em pacientes com CMD. Foram estudados 18 pacientes portadores de insuficiência cardíaca (IC), com média de idade  $48,2 \pm 11,9$  anos, sendo 61% do sexo masculino e 20 grupo-controle com média de idade  $22,8 \pm 1,7$  anos, sendo 50% masculino. Os pacientes com IC foram divididos em dois grupos. Grupo I, a CMD não inflamatória (8) e grupo II, a miocardite (10) que apresentavam cintilografia miocárdica com Ga-67 positiva ou biópsia endomiocárdica positiva baseado no critério de Dallas. A pesquisa do anticorpo anti- $\beta$ 1- adrenoreceptor, foi utilizado um peptídeo sintético correspondente  $\beta$ 1-EC II pelo método Elisa. Observou-se que pacientes com IC apresentavam níveis de anticorpos de  $0,40 \pm 0,37$  e o grupo-controle com  $0,27 \pm 0,15$ , não havendo diferença significativa no nível do Elisa, ( $p=0,48$ ). No grupo I, o anticorpo estava presente em 2 e no grupo II em 7 (70%),  $p = 0,05$ . Níveis dos títulos de anticorpos foram mais elevados no grupo II

com  $0,53 \pm 0,36$  em relação ao grupo I com  $0,23 \pm 0,31$ , ( $p = 0,033$ ). O resultado sugere uma resposta autoimune anormal na miocardite.

## SUMMARY

OLIVEIRA, Andrea Tostes. Autoantibodies Against the  $\beta_1$  Adrenergic Receptor in Dilated Cardiomyopathy. Niterói, 2009. Thesis (mestrado) - Universidade Federal Fluminense.

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a chronic myocardial disease characterized by progressive ventricular enlargement and myocardial contractile malfunction. Disturbances in humoral and cellular immunity have been described in cases of myocarditis and DCM. A number of autoantibodies against cardiac cell proteins have been identified in DCM. These include antibodies against contractile proteins, the cardiac beta-receptor, mitochondrial proteins, the calcium channel, the muscarinic receptor and the sarcoplasmic reticulum. The functional role of cardiac autoantibodies in DCM is still unclear. The possibility exists that antibodies play an active role in the pathogenesis and progression of the disease. If autoantibodies contribute to cardiac dysfunction in DCM, their removal would be expected to improve the hemodynamic variables. Cardiac autoantibodies that belong to the immunoglobulin G (IgG) fraction are extractable by immunoadsorption (IA). IA and subsequent IgG substitution also ameliorate myocardial inflammation in patients with DCM. IA may represent an additional therapeutic approach in patients suffering from DCM. Objective this study is identify the presence of the autoantibody that acts against the second extracellular loop of  $\beta_1$  adrenergic receptors in patients with dilated cardiomyopathy. Eighteen patients with heart failure were studied, with an average age of  $48.2 \pm 11.9$  and 61% men, as well as twenty patients in the control group with an average age of  $22.8 \pm 1.7$  and 50% men. The patients with heart failure were divided into two groups: Group I with non-inflammatory DCM (n=8) and Group II with myocarditis (n=10), who were diagnosed by Ga-67 myocardial scintigraphy or endomyocardial biopsy using the Dallas criteria. They were screened for the anti- $\beta_1$ -adrenergic receptor autoantibody by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Test, using a synthetic peptide corresponding to  $\beta_1$ -EC II. Patients with heart failure presented autoantibodies at  $0.40 \pm 0.37$ , while healthy subjects posted  $0.27 \pm 0.15$ , with no significant differences in the ELISA level

( $p=0.48$ ). The antibody was detected in two patients in Group I and in seven patients (70%) in Group II ( $p=0.06$ ). These results demonstrate that autoantibody titers were higher in Group II ( $0.53\pm 0.36$ ) than in Group I ( $0.23\pm 0.31$ ) ( $p=0.033$ ). The results suggest anomalous autoimmune responses in myocarditis, indicating that further studies are required for better understanding.

## 1 INTRODUÇÃO – FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

As cardiomiopatias constituem um grupo de doenças nas quais o achado dominante é o acometimento direto do músculo cardíaco. Existem cinco formas distintas de cardiomiopatias: dilatada, hipertrófica, restritiva, displasia ventricular arritmogênica e as não classificadas.<sup>1,2</sup>

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma doença caracterizada por progressiva depressão da contratilidade miocárdica e dilatação ventricular esquerda – ou de ambos os ventrículos – de diferentes etiologias – genética, inflamatória e infecciosa.<sup>1,2</sup> A CMD ocasiona Insuficiência Cardíaca (IC) levando à intolerância ao exercício, ao risco aumentado de morte súbita, comprometendo a qualidade de vida, e reduzindo a expectativa da vida.<sup>3</sup> Ao longo desses anos tem-se demonstrado que um componente inflamatório importante está presente na patogênese da cardiomiopatia dilatada idiopática (CMDI), com numerosas evidências científicas que comprovam a associação de miocardites e CMDI. Além de muitos estudos demonstrando a miocardite viral causa inicial da CMDI.<sup>4</sup> A classificação da Organização Mundial de Saúde sobre Cardiomiopatias define subgrupos de pacientes fases agudas e crônicas da doença inflamatória do miocárdio.<sup>5</sup>

As miocardites são uma síndrome de múltiplas etiologias – infecciosas, tóxicas e inflamatórias –, nas quais um número variado de viroses tem sido implicado mais freqüente na sua iniciação. Nos Estados Unidos da América, o agente viral mais comum é o Coxsackievirus B3.<sup>6</sup> É definido como um processo inflamatório envolvendo o miocárdio, levando muitas vezes a CMD, que, nos casos em que se comprova a presença de inflamação miocárdica associada a disfunção sistólica ventricular, é denominada cardiomiopatia dilatada inflamatória (CMInf.).<sup>7</sup> No passado, o diagnóstico de miocardite era tipicamente feito post-mortem; o avanço dos métodos de



cardioimagem e a difusão da biópsia endomiocárdica têm permitido delinear a doença no estado ante-mortem, e o reconhecimento se tornou mais factível. Na realidade, existe

uma limitação na compreensão entre o grau da lesão miocárdica e o da disfunção miocárdica gerada nas CMD. Esta discrepância sugere que o mecanismo imunológico contribui para o desencadeamento da lesão miocárdica na CMDI e para a miocardite.<sup>6</sup> Cerca de 10 a 30% das CMDI tem evidência patológica de miocardite, definida como a presença de infiltrado de células linfocitárias e mononucleares, e a presença do aumento da expressão do HLA (complexo de histocompatibilidade principal), classe I e II, na superfície dos miócitos, no interstício e perivascular, demonstrando a ativação imuno-inflamatória tecidual.<sup>8</sup> Várias teorias têm sido propostas para explicar o mecanismo de injúria do miocárdio nas miocardites. A necrose miocárdica poderia ocorrer como resultado direto da invasão dos miócitos por agentes infecciosos. Alternativamente, a citotoxicidade pode ser desenvolvida por efeitos químicos exógenos ou por ação de endotoxinas. Entretanto, o mecanismo mais aceito é a destruição dos miócitos e a progressiva disfunção ventricular, que seriam ocasionadas pelo próprio sistema imunológico devido a fatores ainda pouco compreendidos, levando à contínua lesão miocárdica.<sup>9</sup> Certos autores sugerem que o gatilho para a ativação linfocitária prejudicial ao miocárdio seria a infecção viral; entretanto, modelos experimentais demonstram a persistência da doença mesmo após a depuração dos elementos virais do miocárdio, sugerindo mecanismos auto-imunes na geração e progressão desta doença, bem como a indução de miocardite e cardiomiopatia dilatada idiopática, pela imunização com proteínas cardíacas autólogas, confirmando o modelo auto-imune dessas entidades.<sup>10</sup>

Sabe-se que a miocardite é uma doença com três fases cronologicamente distintas, e sucessivas, embora nas formas crônicas elas possam coexistir, em diferentes estágios, em outras áreas do miocárdio. Em modelos animais, e certamente em humanos, a separação entre essas três fases não é sempre distinta. Pode-se sobrepor uma fase a outra, e fases um e dois podem reaparecer, depois da cascata trifásica ter regredido, resultando em múltiplos ciclos da doença ocorrendo simultaneamente. A primeira fase representa o insulto inicial do miocárdio (como, por exemplo, uma agressão viral), fazendo com que se desencadeie a “cascata trifásica”.<sup>11,12</sup> Em muitos pacientes esta fase, não detectada precocemente, passa despercebida. Alguns pacientes apresentam inúmeros sinais e sintomas ocasionados pela infecção viral aguda, como febre, linfocitose e sintomas de infecção respiratória ou gastrointestinal. O paciente pode também apresentar dor torácica, com anormalidades do eletrocardiograma e dos marcadores de necrose miocárdica, simulando Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) e

arritmias atriais e ventriculares. O diagnóstico virológico com a biópsia é possível, utilizando-se técnicas de Biologia Molecular. São utilizados dois métodos: a reação de cadeia polimerase (PCR) e a hibridização in situ. A técnica de PCR tem sido usada para a detecção do genoma dos enterovirus, com resultados positivos em aproximadamente 20% dos pacientes com suspeita de miocardites e CMDI. A hibridação in situ detecta o genoma viral em 35 % dos pacientes.<sup>11</sup>

Depois da resolução do insulto inicial, a segunda fase é desenvolvida como resultado do mecanismo auto-imune desencadeado pela injúria aguda. Vários estudos presumiram a dominância de fatores imunológicos na fisiopatologia da disfunção ventricular. A biópsia endomiocárdica freqüentemente demonstra infiltrados linfocitários e outros indicadores histológicos de ativação imune. Clinicamente, não raro os pacientes desenvolvem IC nesta fase como resultado da extensa injúria miocárdica adicional. A terceira fase é um quadro típico de CMD desenvolvida; pode progredir a despeito da cessação da primeira e da segunda fase, e a doença toma característica de CMDI.<sup>11</sup>

Existe um mecanismo pelo qual o cardiotropismo de alguns vírus pode levar ao surgimento de IC aguda. As miocitólises por replicações de vírus na ausência de respostas imunes específicas são bem documentadas, em modelos animais. Este fenômeno pode levar à miocardite fulminante em humanos e a uma resposta imune efetiva desencadeada, sem subsequente persistência de auto-imunidade e viral, podendo ter uma taxa alta de reversão do quadro.<sup>12</sup>

Vários estudos têm observado anticorpos contra vários antígenos na miocardite e CMDI. Auto-anticorpos circulantes para uma variedade de antígenos cardíacos incluindo receptores acoplados a proteínas G (tais como beta ( $\beta$ ) 1-adrenoreceptor e receptores muscarínicos), proteínas mitocondriais, difosfato de adenosina (ADP), proteínas trifosfato de adenosina (ATP), e cadeia pesada de miosina estão presentes na miocardite e CMDI. Respostas auto-imunes contra vários antígenos miocárdicos têm sido envolvidas na patogênese, e auto-anticorpos contra proteínas de células cardíacas têm sido detectados nos soros desses pacientes.<sup>13,14</sup> Wallukat e col. demonstraram efeitos cardiodepressores e cardioestimulatórios de auto-anticorpos circulantes através de um ensaio com cultura de cardiomiócitos murinos.<sup>14</sup> Os pacientes portadores de CMDI, de 30 a 50% evidenciam os mesmos efeitos crono e inotrópicos sobre a cultura celular, sugerindo que a doença pode ter realmente uma patogênese comum. Paralelamente a isto, também se tem demonstrado anticorpos contra sarcolema e

antígenos miofibrilas, que, contudo, não foram correlacionados especificamente cardíaco porque fazem reação cruzada com músculo esquelético.<sup>5</sup>

Auto-anticorpos com estimulação beta-adrenérgica (agonista) foram descobertos há trinta anos, no soro de pacientes com doença de Chagas, uma das causas mais comuns de CMD inflamatória no mundo em desenvolvimento.<sup>15,16</sup> Desde esse tempo, imunoglobulina G (IgG) com atividade agonista sobre o receptor adrenérgico beta-1 ( $\beta$ 1-AR) no soro de pacientes, não somente com doença de Chagas, mas também em pacientes com CMDI, miocardite e, em pequena porcentagem, nas CMD isquêmica.<sup>16</sup> Wallukat e Wollenberger demonstraram, em 1987, frações de IgG em pacientes com CMDI que foram capazes de mostrar efeito cronotrópico positivo na cultura de miócitos de ratos neonatais.<sup>15,17</sup> Um importante pré-requisito para auto-anticorpos potencialmente patogênicos é serem eles capazes de reconhecer antígenos correspondentes a conformação nativa; e acabam exercendo efeitos no mecanismo fisiopatogênico.<sup>18</sup>

Recentes experimentos clínicos sugerem que anticorpos com capacidade de interação com os  $\beta$ 1-AR, em particular os que interagem com a segunda alça extracelular do receptor ( $\beta$ 1- EC II), podem influenciar a patogênese da CMD, e tem sido associados à piora da função ventricular esquerda, e à alta incidência de arritmia ventricular e de morte súbita.<sup>18</sup>

Se auto-anticorpos têm relação com a iniciação ou progressão da CMD, a remoção desses auto-anticorpos poderia levar à estabilização ou melhora da doença. Auto-anticorpos pertencentes à fração de Ig G são extraídos pela técnica de Imunoadsorção (IA). Esta técnica foi introduzida no tratamento de pacientes com hipercolesterolemia heterozigota familiar, e tem sido usada em tratamento de pacientes com uma variedade de doenças auto-imunes, incluindo miastenia gravis, lupus eritematoso sistêmico, síndrome de Guillain-Barré e síndrome Sjogren.<sup>14</sup> Recentemente, vários trabalhos no contexto da IC com presença de auto-anticorpos circulantes evidenciaram que IA seletiva e não seletiva induzem a uma melhora do perfil hemodinâmico precoce e prolongado, e que a subsequente substituição da IgG também leva à melhora da inflamação miocárdica confirmada por biópsia endomiocárdica em pacientes com CMD, sendo, em potencial, uma nova forma de tratamento para casos selecionados de CMinf. e CMD no futuro.<sup>8</sup>

## 1.1 CARDIOMIOPATIAS

As mais importantes formas de cardiomiopatias reconhecidas são: dilatada, hipertrófica, restritiva, cardiomiopatia do ventrículo direito arritmogênica e cardiomiopatias não classificadas com propriedades distintas.<sup>19,20,21</sup> Em 1995, a Organização Mundial de Saúde (WHO), a Força Tarefa da Sociedade Internacional e a Federação de Cardiologia (ISFC), introduziram, na definição e classificação das cardiomiopatias, uma entidade chamada CMInf., que é caracterizada pela disfunção ventricular idiopática, com evidência de inflamação na biópsia endomiocárdica (BEM). Recentemente, o diagnóstico de CMInf. foi ampliado, com a introdução das técnicas de imuno-histoquímica e também da técnica de biologia molecular, que permite a identificação da presença do DNA ou RNA viral.<sup>8</sup> Assim, permitiu-se a identificação de formas idiopáticas, auto-imunes e infecciosas de CMInf.. Atualmente vem sendo utilizada a denominação cardiomiopatia viral, que é definida como persistência do vírus no miocárdio e pode ser acompanhada de inflamação miocárdica, sendo então denominada CMInf. viral. Logo, considera-se a CMD viral somente se o DNA ou RNA viral estiver presente e sem inflamação; quando vírus e inflamação estiverem presentes, utiliza-se o nome CMDinfl. viral. O nome cardiomiopatia é utilizado também nas doenças específicas e nas formas secundárias (Tabela 1), que podem ter diferentes etiopatogênicas como:<sup>20,21,22</sup>

- inflamação miocárdica (autoimune, viral ou pós-viral) mediada por células do sistema imune (linfócitos-T, células natural killer, macrófagos);
- efeitos regionais de mediadores inflamatórios (citocinas), liberados por infiltração de linfócitos, macrófagos ou células endoteliais);
- interação direta de auto-anticorpos contra beta-receptor, receptores de membranas ou proteínas, mitocondrial;
- toxinas que danificam o mecanismo de transporte das membranas ou processo bioquímico (álcool, antraciclina, cocaína, etc...);
- perda ou disfunção da matrix de proteínas (distrofina, lamininas, etc...)

**Tabela 1: CARDIOMIOPATIAS (definida pela Organização Mundial de Saúde)**

<b>Específica (secundárias)</b>	<b>Intrínsecas do miocárdio</b>
Cardiomiopatia Valvular	Cardiomiopatia Hipertrófica
Cardiomiopatia Isquêmica	Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito
Cardiomiopatia Secundária desencadeada por Doenças Sistêmicas	Cardiomiopatia Obliterativa
Cardiomiopatia Inflamatória	

## 1.2 ETIOPATOGENIA DAS CARDIOMIOPATIAS DILATADAS

A CMD é a 3ª causa mais comum de IC no mundo, depois da cardiomiopatia isquêmica e hipertensiva, sendo a forma mais comum de doença cardíaca primária. Clinicamente, a CMD é caracterizada pela progressiva dilatação e disfunção do ventrículo esquerdo (VE). Estágios diferentes da doença são encontrados, por apresentação assintomática com disfunção do VE, em pacientes com sintomas de IC desencadeado pela atividade física ou propriamente a apresentação de IC congestiva.

A expectativa de vida é limitada, e varia de acordo com a etiologia de base da doença. Miocardites, anormalidades imunológicas, toxicidade, fatores genéticos são causadores da doença.

### - Idiopática

A CMDI se caracteriza por dilatação VE ou de ambos os ventrículos, e disfunção sistólica na ausência de doença aterosclerótica coronariana, doença valvular, cardiopatia congênita, hipertensão arterial sistêmica, cor-pulmonale agudo ou crônico, ou doença pericárdica. Entre os casos de CMDI, 20% são de tipo familiar, ou seja, há pelo menos um parente de grau primário com cardiomegalia.<sup>23,24</sup>. Apesar do arsenal terapêutico usado nos dias atuais, a incidência da mortalidade ainda é alta. O problema principal é a heterogeneidade da etiologia. Atualmente têm sido identificados três

fatores potencialmente importantes da CMDI: a infecção enteroviral, o mecanismo imune e o fator genético. É plausível que certos subgrupos da CMDI apresentem uma forma crônica de doença auto-imune pós-infecciosa, especialmente em indivíduos com susceptibilidade genética.<sup>23</sup>

#### - Genética: CMD Familiar

A doença miocárdica pode ser causada por mutações em gens que ocasionam a codificação em proteínas “chave” dentro da biologia cardiovascular, e tem sido descrita em outras cardiopatias, principalmente na cardiomiopatia hipertrófica, reconhecida como uma doença genética das proteínas contráteis. A etiologia genética também é enfatizada em proporção considerável na CMDI, ainda freqüentemente pouco identificada pelos clínicos.

Estudos clínicos e de genética molecular têm agrupado informações de cardiomiopatia dilatada familiar (CMD familiar, definida como a presença de CMDI em dois ou mais membros familiares), indicando que mutações de gens, base única de mudanças na “chave” dos gens autossômicos, causam CMD familiar e CMDI.<sup>25,26</sup>

#### Autossômico dominante

Esta é a forma mais comum de CMD familiar, aproximadamente 90% com a herança autossômica dominante. A heterogeneidade genética e clínica sugere ser causada por um único gen, com múltiplos outros fatores genéticos e ambientais alterando a expressividade. Tem sido sugerido ser a mutação encontrada no gen autossômico 16 a causa da CMD familiar, reconhecida como CMD familiar e CMD familiar associada a doença sistêmica de condução. Incluíram-se famílias com mutações da laminina A/C, associadas freqüentemente com disfunção no nódulo sinoatrial e átrio-ventricular e arritmias cardíacas. Logo, as mutações da laminina A/C e gens de cadeia pesada beta-miosina podem ser, cada um, responsável por 5 a 10 % das CMD familiar. Os gens actina e desmina são causas incomuns de CMD familiar (< 1%) das CMDI e CMD familiar.<sup>25,26</sup>

#### Associação-X

A CMD familiar com associação-X representa aproximadamente 5 a 10% das CMDF, e é, usualmente, resultado de mutações de gens de distrofismo, que tem sido identificado em várias famílias que herdaram a associação-X. Têm sido observados casos de CMDF em indivíduos portadores de distrofia muscular de Becker, ou casos de transmissão feminina. Além disto, a distrofia muscular de Becker e CMD familiar têm sido vistas na mesma família, sugerindo que pode ser difícil tirar conclusões sobre o fenótipo do genótipo. Indivíduos com CMD familiar associação-X pode ter fraqueza no músculo esquelético, e, muitas vezes, cursar com elevação do nível da creatinafosfoquinase (CK).<sup>25,26</sup>

#### Autossômico recessivo

A mutação da troponina-I cardíaca tem sido associada com CMD familiar recessiva em uma família. A herança autossômica recessiva é mais comum entre grupos étnicos.<sup>25,26</sup>

#### CMD familiar com doença do músculo esquelético

Pequena fraqueza no músculo esquelético tem sido descrita em poucas famílias com CMD familiar autossômica dominante, incluindo famílias com mutações de lâmina. Pessoas afetadas podem apresentar níveis de CK elevados, mas têm sido notados valores que, com o tempo, oscilam entre o normal e o anormal.<sup>25, 26</sup>

#### Mutações mitocondriais

Mutações mitocondriais têm sido descritas em indivíduos com CMD familiar. Entretanto, muitas dessas mutações são também achadas em grupo controle; logo, não podem ser causa primária da doença, mas sim um co-fator para o seu desenvolvimento.<sup>25, 26</sup>

### 1.3 CARDIOMIOPATIAS INFLAMATÓRIAS

#### - Mecanismos fisiopatológicos



A caracterização da CMDinf. por disfunção ventricular idiopática, com evidências de inflamação na BEM., é baseada no uso da técnica de imuno-histoquímica e não no critério de Dallas, baseado nos achados histológicos. No momento, o maior foco para diagnóstico são os linfócitos T, ambos utilizados para diagnóstico da miocardite e da CMDinf. Entretanto, os linfócitos T derivados de corações com miocardite, bem como os macrófagos e as células “natural killer” podem exercer efeitos cardiotóxicos. Também são descritos vários auto-anticorpos direcionados contra antígenos cardíacos, sugeridos como uma pista patogênica para os linfócitos B.<sup>7</sup>

Vários pontos-chave do mecanismo patogênico estão envolvidos na CMDinf. e estão sendo elucidados ao longo desses anos. Depois da infecção viral cardiopática, inicialmente o antígeno HLA (complexo de histocompatibilidade principal) apresenta e processa os antígenos através de macrófagos e linfócitos ativados, devido ao sistema imune contra proteínas virais, os indivíduos são geneticamente predispostos a essa infecção, após a qual apresentam aumento de resposta imunológica contra antígenos cardíacos. Concomitantemente, citocinas induzem a moléculas de células de adesão (MAC), que medeiam a diapedese trans-endotelial dentro do miocárdio através de células executoras imunes, que atacam proteínas virais e antígenos cardíacos (reação cruzada). Logo, dois dos mais importantes mecanismos são responsáveis para a perpetuação da resposta inflamatória contra estruturas do miocárdio, resultando numa mitocitólise e remodelagem progressiva da matrix extra-celular, persistência viral e miocitólises imune-mediadas liberadas pelos antígenos cardíacos, que podem persistir mesmo após a eliminação viral.<sup>7</sup>

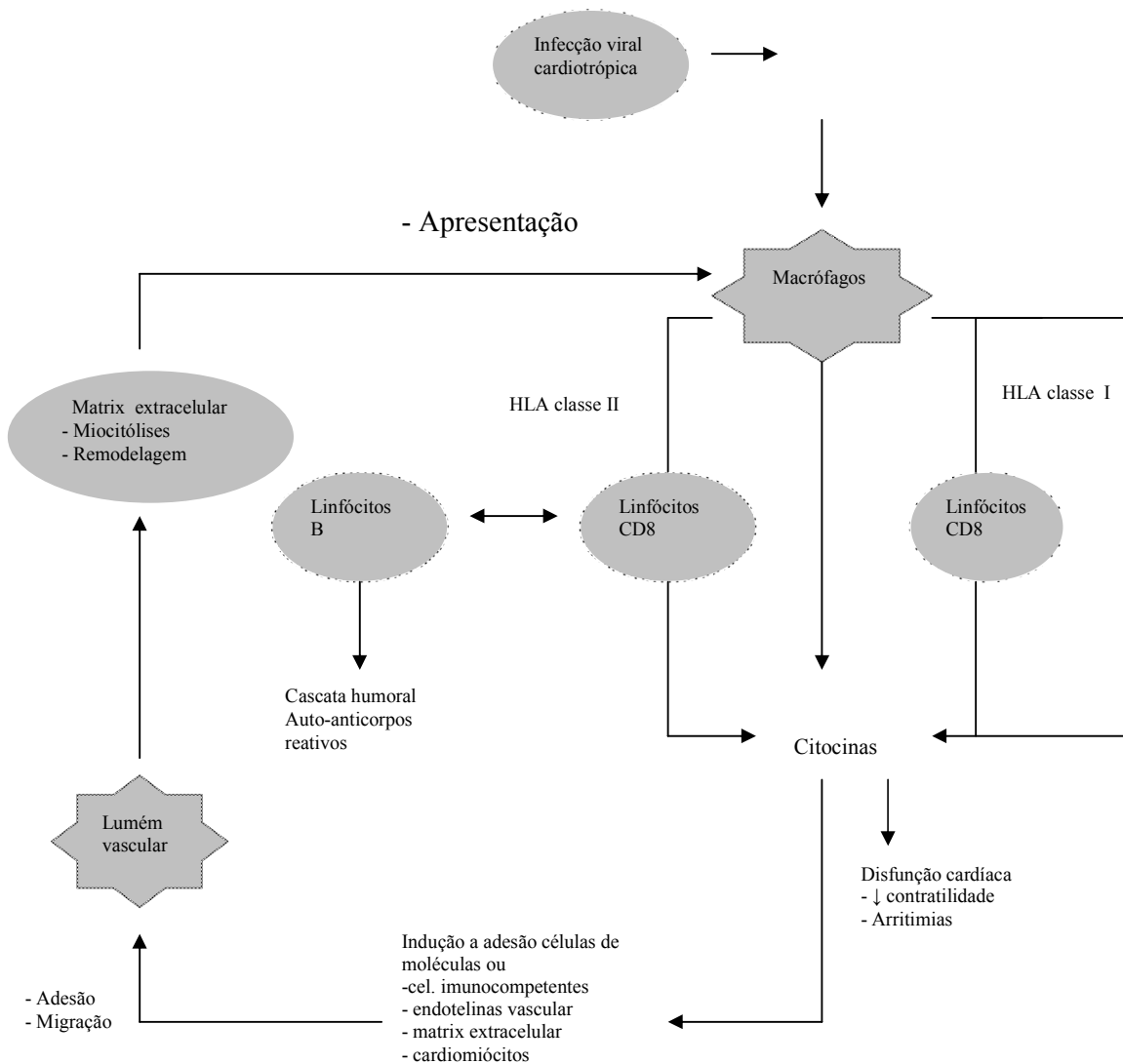
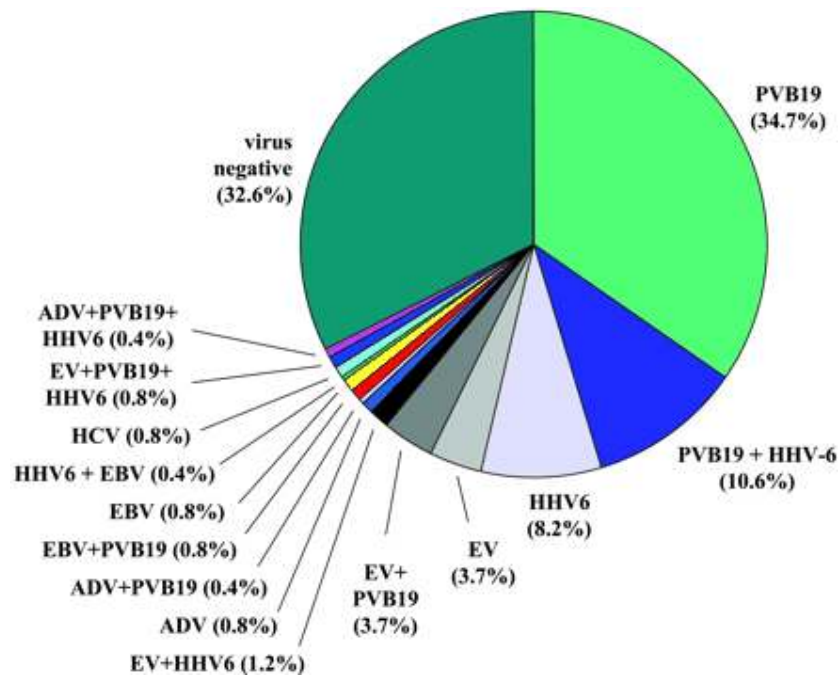


Figura 1: Patogênese da CMD inflamatória

Muito tem se debatido sobre ser realmente a miocardite um precursor da CMDI, e hoje ainda é bastante investigado este assunto, mas ainda precisa ser confirmado. O mecanismo inflamatório e o auto-imune estão envolvidos no desenvolvimento clínico de ambas as doenças, levando à insuficiência cardíaca, apesar da etiologia. Métodos de biologia molecular e imuno-histoquímico têm confirmado a persistência de infecção viral em pacientes com miocardites, bem como naqueles com diagnóstico de CMDI. A

infecção viral tem freqüentemente implicado na CMDI com o achado em estudos de níveis de auto-anticorpos para vírus (ex. Coxsackie B) em muitos casos, que também são encontrados na miocardite, especulando-se se a CMDI seria uma seqüela da miocardite causada pelo Coxsackie vírus B.<sup>4,27</sup> As observações do aumento dos anticorpos contra enterovírus, em pacientes com miocardites e CMDI, tradicionalmente mostram evidência de que as enterovirose são os agentes causadores. Infelizmente, as infecções enterovirais são comuns na população em geral, e tem sido difícil definir se títulos de anticorpos coincidem com o período agudo ou com o de convalescência, relacionados com os primeiros sintomas de disfunção cardíaca.<sup>4</sup>

Experimentos em animais têm demonstrado fortes ligações entre agentes infecciosos (usualmente vírus) e subseqüentes lesões imuno-mediadas no miocárdio, resultando em CMDI. Enterovirose, adenovirus, influenza, HIV e hepatite C têm sido implicados na patogênese da CMDI e na miocardite, uma vez que é possível detectar o genoma viral no coração, em estudos em humanos.<sup>6</sup> Uwe e col., em 2005, fizeram a BEM em 245 pacientes com CMDI, para detectar a presença do genoma viral utilizando a técnica PCR. O genoma viral foi detectado em 67,7 % dos pacientes com CMDI, sendo que 51,1% representavam parvovirus B19; 21,6 %, herpesvirus humano-6; 9,4 %, os enterovirus; 2,0 %, Virus Epstein-Barr; 1,6 %, adenovirus; 0,8 %, citomegalovirus, e incluindo 27,3% com múltiplas infecções (figura 2). Observaram em biópsias posteriores (6,8 meses) que a persistência do vírus no miocárdio, em pacientes com disfunção ventricular foi associada com diminuição progressiva da FE (fração de ejeção) do VE.<sup>28</sup>



**Figura 2:** Distribuição do genoma viral: 245 pacientes com apresentação clínica de DMDI. Adaptado de K. Uwe et al. EV: enterovirus; PVB19: parvovirus B19; HHV6: herpesvirus humano-6; HCV: citomegalovirus; ADV: adenovirus; EBV: vírus Epstein-Barr.

#### 1.4 MIOCARDITES

As miocardites são uma doença inflamatória do miocárdio, em que o diagnóstico é estabelecido por critérios histológicos, imunológicos e imuno-histoquímico, em associação com disfunção cardíaca.<sup>27</sup> A etiologia é muito variável, de infecções até doenças sistêmicas; medicamentos e toxinas têm sido associados ao desenvolvimento dessa doença; viroses, bactérias, protozoários e vermes têm sido implicados como agentes infecciosos. Existe um consenso de que as viroses são a causa mais importante de miocardite na América do Norte e na Europa.<sup>4</sup>

A miocardite é um processo de doença contínuo, distinto em três fases:<sup>3,11,12,21</sup>

##### **Fase 1: Infecção viral**

Os enterovirus, tais como Coxsackievirus B3 e B4, são as viroses dominantes detectadas em sorologias e por técnicas moleculares diretas, tais como PCR ou hibridação *in situ*. Mais recentemente, por causa do aprimoramento dessas técnicas, e, em parte, pelas próprias mudanças na epidemiologia, outros agentes virais têm ganhado predominância, como adenovirose, detectadas principalmente em população jovem, e o vírus da hepatite C.<sup>4</sup> (tabela 2)

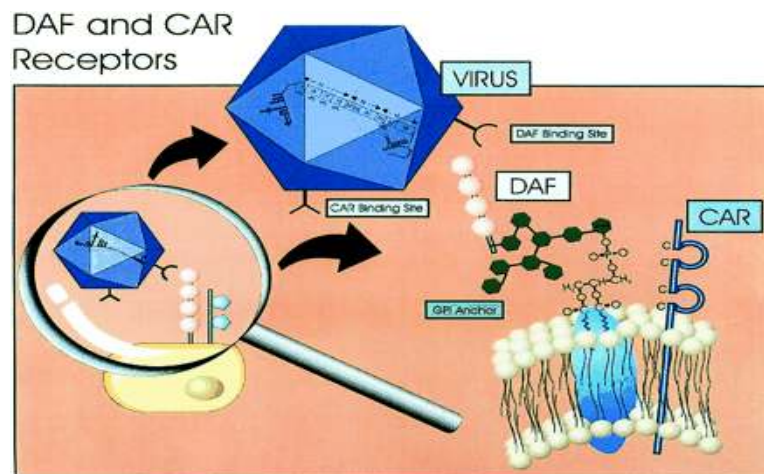
<b>Vírus RNA</b>	Picornavírus (entero, rhino); orthomyxovírus (influenza A,B); paramyaovírus (rubéola, mumps); retrovírus(HIV-1, vírus da hepatite C
<b>Vírus DNA</b>	Adenovírus, hepesvírus (cytomegalo, Vírus Epstein-Barr, varicela-zoster), Parvovírus Big
<b>Bactérias</b>	Stafilococcus, Streptococcus, Pneumococcus, Meningococcus, Meningococcus, gonococcus, salmonellas, Corynebacterium diphtheriae, Haemophilus influenzae, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , espécie de brucella
<b>Mycobactérias</b>	Tuberculose, Avium Intracelular, Leprae
<b>Fungos</b>	Aspergillus, Candida, Actinomyces, Blastomyces, Cryptococos, Histoplasma
<b>Protozoários</b>	Toxoplasma gondii, Trypanossoma cruzi
<b>Rickettsiae</b>	Coxiella burnetii (febre Q), <i>Rickettsia rickettsia</i> , <i>Rickettsia tsutsugamushi</i>
<b>Chlamydiae</b>	<i>Trachomatis</i> , <i>Psittaci</i>
<b>Parasita</b>	Trichinella spiralis

**Tabela 2:** Agentes indutores de miocardite: adaptado de O' Connell and Renfund

### **Receptor enteroviral: CAR**

Estudando a miocardite por coxsackies e adenovirus, identificou-se um receptor comum para ambos os vírus. O CAR permite a internalização do genoma do vírus coxsackie depois do ataque, sendo um passo para infecção viral no miocárdio. CAR pertence à superfamília de imunoglobulinas, provavelmente tem uma função de molécula de adesão, ainda a ser identificada precisamente. O CAR aparentemente pode

atuar como um internalizador multifuncional para todos os membros da família do vírus coxsackie B e outros membros da família enteroviral.<sup>11</sup> O Coxsackie vírus B utiliza o complemento de fator de decomposição de proteína (DAF, CD55) como co-receptor, fazendo com que haja uma eficiente ligação entre coxsakievirus e o complexo CAR-DAF para facilitação da internalização do CAR. (figura 2) <sup>11,30</sup>



**Figura 3:** Receptores enterovirais: Internalização do CAR (receptor coxsackie-adenoviral) e DAF produzido na miocardite.<sup>11</sup>

A resposta imune secundária à infecção viral tem, na patogênese da doença, um papel mais importante do que a infecção primária.<sup>4,30</sup> Quando ocorre a infecção no hospedeiro, primeiro o vírus infecta células imunes nos gânglios linfáticos e baço, e escapa temporariamente da depuração imunológica; posteriormente, o vírus é transportado para outros sítios, como coração e pâncreas.<sup>30</sup>

## Fase 2: Autoimunidade

A fase 1 é o gatilho da porta de entrada e proliferação do vírus no miocárdio. Conclui-se com a ativação do sistema imunológico do hospedeiro, do qual se atenua a proliferação viral, mas também pode aumentar a entrada viral. Idealmente, o sistema imunológico deveria cessar se a proliferação viral estivesse controlada. Entretanto, a ativação imunológica continua sem pausa, a despeito da eliminação do vírus, resultando numa doença auto-imune, e iniciando a fase 2.<sup>4</sup>

## **Auto-reatividade das células T**

As células-T são estimuladas a partir da infecção viral no miocárdio, através da resposta da imunidade clássica mediada por células. Fragmentos do peptídeo viral são processados no sistema Golgi das células do indivíduo, e apresentados à superfície das mesmas através do complexo principal histocompatibilidade. Esta ativação imune protege teoricamente as células-T, que vão de encontro às células infectadas com vírus, destruindo-as através de produção de citocinas ou citólises das células mediadas por perforin. Entretanto, a ativação exuberante e contínua das células-T é deletéria ao hospedeiro, porque ambas as reações mediadas pelas citocinas, e as lesões dos miócitos mediadas pela ação direta das células-T, reduzem o número de unidades contráteis. O efeito cumulativo da perda dos miócitos causa a diminuição da função contrátil, levando à remodelação cardíaca e à fase 3 da doença, a cardiomiopatia dilatada. A persistência da ativação das células-T é induzida por auto-antígenos do miocárdio, que reagem cruzadamente com peptídeos virais. O vírus também pode estimular uma resposta do tipo específico da célula-T por células-T helper, ativando mais células CD8 killer.<sup>4,30</sup>

## **Ativação das citocinas**

O principal mediador da ativação imunológica são as citocinas. Matsumori e col. mostraram que pacientes com miocardite tinham marcada ativação das citocinas, incluindo fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 e IL-6. O padrão da ativação pode determinar profundamente o tipo de reação da célula-T e o subsequente grau de perpetuação auto-imune.<sup>4,30</sup>

## **Reação cruzada dos anticorpos**

A ativação de células CD 4 também leva à expansão de células-B clonais e à produção de anticorpos. Os auto-anticorpos podem não ser o fator crítico da iniciação da doença, mas podem contribuir para a progressão dela. Em pacientes com miocardite provada histologicamente, ou na CMD familiar, anticorpos auto-reagem frequentemente com componentes do miocárdio, tais como traslocador ADP/ATP, proteínas mitocondriais, beta- adrenorreceptor e outros.<sup>11,30</sup>

## 1.5 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA CMD: (citocinas pró-inflamatórias)

Durante os últimos anos tem-se estudado os mediadores inflamatórios, devido à ativação do sistema imune, tornando-se este crucial para o desenvolvimento da IC. Estão envolvidos na CMD as citocinas pró e anti-inflamatórias e seus receptores, endotoxinas, moléculas de adesão, óxido nítrico e diferentes tipos de leucócitos.<sup>31</sup>

As citocinas são moléculas de baixo peso molecular, proteínas ativas farmacologicamente. Essas substâncias são secretadas por diferentes tipos de células, com o propósito de alterar suas próprias funções ou as de células adjacentes. As principais citocinas implicadas na progressão da CMD são o TNF- $\alpha$ , IL1 e IL-6.<sup>31</sup>

Várias hipóteses têm sido levantadas para ativação do sistema imunológico na CMD. A produção de pró-citocinas tem sido atribuída principalmente às células mononucleares, embora o miocárdio pareça ser outra origem importante dessas células. Algumas evidências sugerem que as catecolaminas aumentam a produção de citocinas no miocárdio. Esta concepção tenta explicar o aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios como resposta à agressão miocárdica e à hipoperfusão tecidual periférica. Tem sido proposto que o aumento do edema da parede do intestino causa translocação bacteriana de endotoxinas, que eventualmente leva à produção de citocinas pró-inflamatórias nos monócitos na corrente sanguínea e, possivelmente, a outros tecidos. De fato, a endotoxina, também conhecida como um lipossacarídeo (LPS), é um dos fortes indutores de produção de TNF- $\alpha$  e de outros mediadores pró-inflamatórios. Pequenas quantidades dessas substâncias são capazes de induzir a secreção TNF- $\alpha$ . Então, a elevação na concentração plasmática de vários mediadores pró-inflamatórios na miocardite aguda e infarto agudo do miocárdio podem ser hipóteses de lesão tecidual.

Esses mediadores inflamatórios são conhecidos agora por se expressarem por todos os tipos celulares de células nucleares no miocárdio, incluindo miócito cardíaco, sugerindo que essas moléculas podem colaborar nas respostas inflamatórias no coração. O interesse na compreensão dos mediadores inflamatórios na IC tem aumentado pela observação de que na síndrome da IC muitos aspectos podem ser explicados pelos efeitos biológicos das citocinas pró-inflamatória. Quando há expressão em concentrações suficientemente altas, tais como aquelas observadas na IC, as citocinas são suficientes para mimetizar alguns aspectos chamados de fenótipos do coração, que



incluem progressão da disfunção ventricular, edema pulmonar, remodelagem do ventrículo esquerdo, expressão do gene fetal e cardiomiopatia. Então, a hipótese de que a citocina na IC ocasiona a progressiva disfunção ventricular pode resultar, em parte, em efeitos tóxicos exercidos pelas cascatas citocinas endógenas no coração e na circulação periférica. A hipótese da citocina não pode ser vista como causa da IC, mas sim a super-expressão da cascata das citocinas, que contribui para a progressão da doença. Logo, funciona como uma elaboração de neuro-hormônios, podendo representar um mecanismo biológico que é responsável pela piora da IC.<sup>31</sup>

### **Proteína C-reativa**

Foi descoberta em 1930, sendo este nome dado devido a reações com polissacarídeo C somático do *Streptococcus pneumoniae*. A proteína-C-reativa (PCR) se liga a polissacarídeos microbianos específicos, em relação ao qual esta substância tem uma característica defensiva. Após esta ligação, a PCR ativa as normas clássicas de complemento e opsoniza por fagocitose. A PCR é exclusivamente produzida no fígado, e tem um aumento da secreção até 6 horas após o estímulo inflamatório quando é, então, é observada como um marcador inflamatório agudo.<sup>31</sup>

Estas primeiras observações do aumento da concentração da PCR na IC foram publicadas em 1990. Recentemente, um grupo mensurou a PCR em 188 pacientes portadores de CMDI. Todos os pacientes tinham disfunção ventricular com FE menor que 40%. Aqueles pacientes que morreram durante o seguimento num período de cinco anos tinham concentrações significativas mais altas do que os que sobreviveram {1.05 (1.37) mg/dl v 0.49 (1.04) mg/dl,  $p < 0.05$ }. Entretanto, a PCR é capaz de aumentar a IL-1 $\beta$  induzida pela produção de iNOS (óxido nítrico sintase-isoforme), embora FN-k  $\beta$  (fator nuclear k  $\beta$ ) não seja alterada. Ainda não está definido se a PCR é meramente um marcador inflamatório sem nenhuma participação no desenvolvimento da doença cardíaca ou se diretamente modula o processo da doença.<sup>31</sup>

### **Moléculas de adesão**

Moléculas de adesão são receptores da superfície de células, envolvidos na ligação dos leucócitos com outras células endoteliais ou com a matrix celular. Essas moléculas têm sido implicadas em várias doenças cardiovasculares. Têm sido descritas

três diferentes famílias de proteínas: (1): a superfamília de imunoglobulina, que consiste em um número de moléculas de adesão, incluindo moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1), ICAM-2, ICAM-3, moléculas de células de adesão vascular- 1 (VCAM-1), e outras. (2) Integrinas formam um co-receptor para um segundo tipo de receptor, mediado por aderências de leucócitos no endotélio vascular e outras interações célula-célula. (3) As selectinas estão envolvidas na adesão dos leucócitos no endotélio ativado. Essa fraca interação causa típica rotação dos leucócitos na superfície endotelial, que é principalmente mediada por selectina-leucócitos (L) e selectina-plaquetas (P). Outras selectinas, tais como a selectina-endotelial (E), parecem produzir forte interação, que eventualmente leva ao extravasamento de células na superfície endotelial. A ativação imune é um importante achado na CMD; a partir daí, tem-se especulado que as interações entre células endoteliais, leucócitos e possivelmente plaquetas são importante condição para o desencadeamento dessa ativação. Nesse estudo, os valores tiveram um aumento da concentração normal 149 (10) ng/ ml para 207 (9.4) ng/ ml na CMD leve, e 293.18 ng/ ml na severa CMD (todos  $p < 0.05$ ). Entretanto, uma significativa correlação negativa entre a FEVE e ICAM-1 solúvel foi observada ( $r = -0.36$ ;  $p < 0.001$ ), e esses valores foram preditores independentes da sobrevivência. Outras concentrações séricas elevadas têm sido demonstradas para outros marcadores solúveis, tais como VCAM-1, seletina-P e seletina-E. É interessante observar que somente concentrações de VCAM-1 diminuíram depois do transplante cardíaco.<sup>31</sup>

### **Óxido nítrico**

O óxido nítrico (ON) foi descoberto em 1980 por Furchgott e Zawadski. É uma proteína lipofílica, difunde livremente gás solúvel, que tem uma meia vida curta – menos que 4 segundos em soluções biológicas. O ON é produzido do ácido-amino arginina-L pelo óxido nítrico sintase (ONS), e reage com oxigênio em soluções aquosas, transformando-se em nitrato e nitrito. Entretanto, ON também reage com o oxigênio derivado dos radicais livres (chamado de anion superóxido), formando em peroxinitrito tóxico (ONO). O ON é produzido por um grupo bem característico de isoformas pelo ONS. Três isoformas foram identificadas: 1- A isoforma endotelial (ONSc), produz grande quantidade de ONO, do qual atua como vasodilatador. Dentro das células endoteliais, ONSc é principalmente achado nas membranas do *caveolae*, pequenas invaginações, caracterizadas pela presença de proteína sinalizadora chamada de

*caveolin*. Depois da síntese no endotélio, ON se difunde através das membranas das células e entra no meio vascular das células do músculo liso, induzindo ao relaxamento do músculo. 2- O ONS isoforme (ONSi) tem uma ligação diferente na membrana, em relação à ligação pelo ONSc; ONSi é achado no citoplasma de grande número de diferentes tipos de células. Depois da indução ONSi por exemplo, citocinas pró-inflamatórias, interferon  $\gamma$  ou LPS, o NOSi excede o ONSc. Desde que o conteúdo de ON intracelular nos macrófagos aumenta durante a infecção bacteriana, ON é um importante mecanismo na resposta imune nata para destruir a bactéria. 3- A terceira isoforma do ONS é ONSn (isoforma neuronal). É expressa no sistema nervoso periférico e central, e no músculo esquelético.<sup>31</sup>

A falta do ON ocasiona piora da disfunção endotelial, causando a diminuição da perfusão tecidual, isquemia miocárdica e remodelagem vascular. Por outro lado, a alta concentração de ON tem sido observada na falência miocárdica, podendo causar a perda dos miócitos e a inibição da contratilidade dos miócitos. Enquanto a baixa concentração de ON (fisiológica) tem efeitos benéficos, a alta concentração (patológica), possivelmente mediada por ONSi, parece deletéria. O ON induzido por citocinas também exerce efeito cronotrópico negativo, e é capaz de causar apoptose. De fato, a alta expressão do gen ONSi está associada com baixa FE do VE, mas não com a severidade clínica da IC.<sup>31</sup>

### **Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ )**

O TNF- $\alpha$  foi descrito em 1975 e em 1990, Levine e associados observaram que concentrações séricas elevadas de TNF- $\alpha$  em pacientes portadores de CMD, em relação a pessoas saudáveis (115 (25) v 9 (3) U/ ml, p <0.001). Observaram também que aqueles pacientes com concentrações altas de TNF freqüentemente sofriam de caquexia cardíaca.<sup>31</sup>

O TNF- $\alpha$  exerce o efeito via receptores TNF- $\alpha$  (TNFR), que são expressados por quase todas as células nucleares. Dois TNFRs foram identificados; TNRF-1 é mais expressada, e parece ser o principal receptor de sinalização. A maioria dos efeitos deletérios causados pelo TNF- $\alpha$  parece ser mediada por via deste receptor. O TNFR-2 parece ter mais efeito protetor no coração. Estudos prévios têm identificado ambos os tipos de receptores, no miocárdio com disfunção e sem disfunção, em humanos.

Vários efeitos parecem estar associados com o aumento da produção do TNF- $\alpha$  na CMD. Ele tem sido implicado em desenvolvimento da disfunção ventricular esquerda, remodelagem ventricular esquerda, aumento da apoptose dos miócitos cardíacos, desenvolvimento de anorexia e caquexia, redução do fluxo sanguíneo no músculo esquelético e disfunção endotelial, resistência a insulina severa, ativação da forma de ONSi, não acoplamento da adenil-ciclase no receptor beta, e outros efeitos.<sup>31</sup>

### **Interleucina-6**

O TNF- $\alpha$  não é a única citocina implicada na piora da CMD. De acordo com a hipótese de ação das citocinas, a CMD progride devido à exacerbação das citocinas, causando anormalidades hemodinâmicas e efeito tóxico direto no coração. Concentrações aumentadas de IL-6 foram percebidas na circulação sanguínea de pacientes com CMD. A IL-6 pode produzir hipertrofia dos miócitos, disfunção miocárdica. Por outro lado, a IL-6 parece bloquear a apoptose cardíaca. A IL-6 parece ser uma resposta direta do TNF- $\alpha$ , e não é surpresa observar uma correlação linear entre as duas. Sugere-se a existência de uma cascata de citocinas. O aumento da concentração de IL-6 foi associado com o pior prognóstico de pacientes com CMD.<sup>31</sup>

### **Interleucina-1**

A IL-1 tem sido demonstrada em pacientes com CMD idiopática e depressão da contratilidade miocárdica. Este efeito é sinérgico com o TNF- $\alpha$  e a estimulação do NOSi parece estar envolvida. Achados adicionais têm mostrado IL-1 sendo envolvido em apoptose miocárdica, hipertrofia e arritmogênico.<sup>31</sup>

### **Interleucina-10**

É uma das mais importantes citocinas anti-inflamatórias. É conhecida sua regulação na produção do TNF- $\alpha$ , IL-1, e IL-6, respectivamente. Isto tem sido confirmado porque os LPS estimulam as células mononucleares no sangue periférico, em pacientes com CMD. Além do mais, IL-10 limita a produção do ON e de radicais

livres provenientes dos macrófagos. IL-10 também aumenta a liberação de TNFR solúvel, que contribui para a redução da atividade do TNF- $\alpha$ . Similarmente às outras pró-citocinas inflamatórias, IL-10 RNAm tem sido detectado na disfunção miocárdica. Têm sido descritas concentrações de circulantes de IL-10, aumentadas ou diminuídas na CMD, na comparação com pessoas saudáveis.<sup>31</sup>

### **Vias de sinalização**

O fator nuclear  $\kappa$ B (FN- $\kappa$ B) está envolvido na regulação dos genes inflamatórios, incluindo pró-citocinas inflamatórias e moléculas de adesão. A família FN- $\kappa$ B consiste em um número de proteínas, que se tornam homo e heterodímeros para formar o fator transcrição ativo. Em células não estimuladas, a ligação do FN- $\kappa$ B se faz por meio da proteína inibitória I $\kappa$ B.<sup>31</sup>

### **Subgrupos de leucócitos na CMD**

A análise do tecido miocárdico de pacientes em estágio final de CMD em transplante cardíaco detectou a presença abundante de linfócitos T CD3+ e de macrófagos CD68+ em relação ao grupo controle, sugerindo uma lista de moléculas de adesão. De fato, isto pode contribuir para a deterioração estrutural baseada na disfunção cardíaca.<sup>31</sup>

## **1.6 DOENÇA DE CHAGAS**

A doença de Chagas é uma das mais comuns causas de IC e de morte súbita no mundo. É causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi), largamente encontrado na América do Sul e Central. O acometimento acentuado de grave disfunção ventricular no coração, na ausência de parasita intracelular, fez com que os investigadores estudassem os mecanismos imunológicos, desencadeando a patogênese na CMD.<sup>32</sup>

A geração da auto-imunidade na doença de Chagas é explicada pela quebra da tolerância do sistema imunológico, ocasionando a produção de linfócitos auto-reativos, que causam lesões auto-imunes e desencadeando a destruição do tecido de condução cardíaca e de nervos autonômicos cardíacos, observada durante a fase crônica da

doença. A doença de Chagas apresenta múltiplos efeitos imunológicos envolvendo respostas humorais e celulares.<sup>32</sup>

Nos últimos anos, têm-se fortalecido evidências de que AC circulantes se ligam a receptores  $\beta$ -adrenérgico e muscarínicos no miocárdio, na doença de Chagas. A interação desses AC com os neurotransmissores dos receptores cardíacos estimula os sinais de transdução intracelular, alterando o comportamento fisiológico do coração. Esses eventos convertem as atividades celulares normais em patológicas. A interação dos AC anti  $\beta$ - adrenoceptores e colinérgicos desencadeia alterações fisiológicas, morfológicas, enzimáticas e moleculares, levando a lesões cardíacas. A análise da prevalência e distribuição desses AC mostra uma forte associação com pacientes soropositivos assintomáticos com a disfunção autonômica em comparação com aqueles assintomáticos mas sem desordem autonômica no coração. A presença desses AC pode explicar parcialmente a cardioneuropatia da doença de Chagas, que afeta os sistemas simpático e parassimpático. Logo, AC induz a dessensibilizações dos receptores.<sup>32</sup>

#### 1.7 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA INVASIVA (Biópsia endomiocárdica - BEM )

Idiopática, auto-imune e infecciosa são as três etiologias principais de CMD inflamatória. A CMD viral é definida pela persistência viral em biópsia de pacientes com CMD. Pode ser acompanhada de inflamação miocárdica, e, assim, a expressão CMD viral inflamatória é aplicada. A Força Tarefa da Federação Mundial de Cardiologia (WHF) ensina que nas CMD inflamatórias específicas na BEM estão presentes focos de linfócitos e/ ou  $\geq 14$  linfócitos e macrófagos /mm<sup>2</sup>.<sup>22</sup>

O diagnóstico histológico de miocardite foi introduzido em 1986 (Critérios de Dallas), tornando-se, desde então, padrão ouro. As amostras de BEM são consideradas diagnósticas para miocardite ativa, se a microscopia óptica evidenciar infiltração de linfócitos e miocitólises. O diagnóstico de miocardite limítrofe, crônica, é considerado no caso de ausências de miocitólises, a despeito de infiltrados linfocitários identificados por amostras de tecidos coradas por hematoxilina-eosina.<sup>22</sup> A biópsia é considerada negativa se ambos, miocitólises e infiltrado linfocitário, estiverem ausentes.<sup>33</sup> O infiltrado inflamatório deve ser sub-classificado como linfocítico, eosinofílico, neutrofilico, de células gigantes, granulomatoso. Formas mistas de distribuição devem ser classificadas como focal, confluyente ou difusa.<sup>22</sup>

O critério de Dallas provavelmente subestima a verdadeira incidência da miocardite, pela grande variabilidade inter-observador. Biópsias obtidas de diferentes partes do ventrículo direito mostram infiltrados focais diferentes (variabilidade espacial), e biópsias feitas em tempos diferentes desde o início da doença mostram infiltrados inflamatórios intermitentes (variabilidade temporal). Portanto, existem importantes mudanças da aplicação desses critérios, e patologistas têm buscado novas técnicas para aprimorar o diagnóstico histológico da miocardite.<sup>4,33</sup>

A definição de miocardite consiste em apresentar um mínimo de infiltrados de 14 leucócitos/mm<sup>2</sup>, preferencialmente linfócitos-T, com ou sem marcadores de ativação, macrófagos. No caso de aglomerados de leucócitos (três ou mais linfócitos, preferencialmente células-T) localizados fora do lúmen do vaso, um processo inflamatório focal é diagnosticado (miocardite). Se os focos de linfócitos-T estão presentes, a miocardite pode ser diagnosticada devido à natureza do infiltrado, mesmo quando números críticos (14 linfócitos/ mm<sup>2</sup>) não forem atingidos. A quantidade de fibrose deve ser descrita como grau 0 (nenhuma fibrose), grau 1 (leve), grau 2 (moderado), grau 3 (severo).<sup>22</sup> Tabela 3.

**Tabela 3: Critério Histológico para diagnóstico de miocardite e critério WHF**

	Critério Dallas	Histopatológico		Termo WHF	Imunohistológico
		Infiltrado			
		Miocitólises	Edema		
1°	Miocardite	+	+	Miocardite	Correspondendo
Biópsia	ativa	+		ativa	ao Critério de Dallas
2°	Miocardite	+	-	Miocardite	≥ 14
Biópsia	boderline	-		crônica/CMDI	linfócitos/mm <sup>2</sup>
	Miocardite em atividade	+	+	Miocardite em andamento	Correspondendo ao Critério de Dallas
	Miocardite em resolução	+	-	Miocardite crônica ou em resolução/CMDI	≥ 14 linfócitos/mm <sup>2</sup>
	Miocardite resolvida	-	-	Miocardite em resolução	≥ 14 linfócitos/mm <sup>2</sup>

A técnica de imuno-histoquímica tem sido introduzida para identificar e caracterizar infiltrados celulares mononucleares, nas biópsias miocárdicas em pacientes com CMD.

Investigadores compararam 299 pacientes com suspeita clínica de CMD; a inflamação intra-miocárdica foi confirmada, usando-se o critério de Dallas, em 5-6 % (miocardite ativa com evidência de miocitólise somente em 1- 3%), e o diagnóstico imuno-histológico de CMDinf. foi estabelecido em 43% desses pacientes. Células imunocompetentes freqüentemente exibem normas de infiltração na CMD inf. Não obstante, o aumento estatístico dos números de linfócitos T, – fenômeno que é sugestivo de miocitólises, especialmente em focos agrupados de linfócitos adjacentes aos cardiomiócitos –, foi observado nas BEM das CMDinf. positivas, em número substancialmente mais freqüente (aproximadamente 8%) que nos casos observados com o critério de Dallas. Esses achados apontam para a substituição do critério de Dallas, que é embasado na presença de miocitólise pelas técnicas imuno-histológicas, provavelmente mais sensíveis e específicas para diagnóstico de miocardite ativa.<sup>7</sup>

O complexo de histocompatibilidade principal (HLA) está correlacionado ao desenvolvimento de respostas auto-imunes no miocárdio. Vários investigadores têm demonstrado que o nível da expressão HLA depende de vários fatores, tais como infiltração de células inflamatórias, toxicidade, isquemia e outros agentes. Similarmente, moléculas de células de adesão (CAMs) são componentes essenciais para eventos agudos e crônicos, incluindo doença coronariana e miocardite aguda e crônica. A técnica imuno-histoquímica permite a identificação inequívoca da diferenciação entre os tipos de células intersticiais.<sup>8,34</sup>

## 1.8 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA NÃO INVASIVA

### - Cintilografia com Indium - 111

Quando os miócitos cardíacos sofrem lesões irreversíveis, gerando necrose devido a isquemia, inflamação e agentes tóxicos, a integridade das células da membrana se perde, e cadeias pesadas de miosinas dentro das células são expostas à circulação sanguínea. O anticorpo monoclonal anti-miosina, conjugado com o isótopo radioativo Indium-111, quando injetado no sangue de pacientes, liga-se especificamente às cadeias



pesadas expostas de miosina; tem sido usado com sucesso para delinear as lesões miocárdicas no Infarto agudo do Miocárdio (IAM), miocardites e CMDI, doenças do músculo cardíaco específico e rejeição do coração após transplante cardíaco.<sup>35</sup>

A aplicação desta técnica tem demonstrado a sensibilidade de 83% e especificidade de 53%, com um valor preditivo positivo de 92%.<sup>36</sup>

#### - Cintilografia com Gálio-67 (Ga-67)

O emprego diagnóstico do gálio-67 foi inicialmente proposto em meados da década de 60, com a constatação de intenso acúmulo desse composto em lesões proliferativas sistêmicas, nos pacientes com diagnóstico clínico de linfoma de Hodgkin. Acreditava-se inicialmente que esse composto apresentasse exclusiva avidéz para estruturas ósseas, incorporando-se seja à trabécula óssea, seja a componentes específicos da medula óssea.

Após administração intravenosa, o gálio-67 concentra-se de forma fisiológica na medula óssea, no fígado, no baço, e nas glândulas lacrimais e salivares. Pode-se identificar atividade em alças intestinais e rins, pois estes formam vias de excreção orgânica do composto.

Múltiplos ensaios experimentais têm demonstrado que o gálio-67, administrado por via intravenosa na forma de citrato, pode mostrar distintos mecanismos de captação.

Na circulação sanguínea, o gálio-67 liga-se a proteínas plasmáticas transportadoras de ferro, dentre as quais destacam-se, em ordem de afinidade: lactoferrina, ferritina e transferrina. O complexo gálio-proteína circulante pode localizar-se em processos inflamatórios e neoplásicos, por mecanismos distintos .

Nos processos inflamatórios pode ocorrer extravasamento do complexo gálio-67-proteína pelo processo normal de transudação ou exsudação, com concentração preferencial do gálio-67 nos locais inflamados. Para que isso ocorra, portanto, devem predominar alterações histológicas típicas de processo inflamatório/infeccioso, que incluem vasodilatação, alteração da permeabilidade capilar e infiltrado celular polimorfonuclear ou mononuclear. Acreditava-se também que poderia ocorrer captação do gálio-67 pelas células inflamatórias ativadas, embora pouca evidência científica

experimental permita reforçar tal hipótese. Igualmente, postulava-se que o acúmulo nos sideróforos também pudesse explicar parte dos fatores que aumentariam a incorporação e a retenção de gálio-67 nos processos inflamatórios.

Contudo, para que se identifique um foco inflamatório por esse tipo de imagem é necessário que esses substratos histológicos estejam presentes e ativos no tecido. Esse é um dos mais importantes fatores entre os que podem limitar a sensibilidade do método.

Fatores técnicos podem igualmente comprometer a eficácia do método, sendo impreterível a realização do exame em câmaras de cintilação adequadamente calibradas para os três fotópicos principais do gálio-67. A utilização de colimadores adequados pode também interferir com a acurácia do método. A utilização de compostos férricos (administração de sulfato ferroso) pode igualmente modificar o padrão de distribuição normal do gálio-67, e assim interferir com possíveis achados de imagem.<sup>37</sup>

A permanência prolongada de gálio livre de carreador na circulação sanguínea pode propiciar aumento da atividade sanguínea do referido composto, limitando o contraste de imagem e a detectabilidade em especial de processos inflamatórios cardíacos.<sup>36</sup>

Em nosso meio, Camargo, em 1990, estudando crianças portadoras de CMD, tomando como padrão-ouro a BEM do ventrículo direito, observou sensibilidade de 87% da cintilografia e especificidade de 81% na detecção de miocardite.

A incapacidade de a cintilografia detectar a presença de inflamação miocárdica está diretamente relacionada com a fase evolutiva em que se encontra a doença. Temos uma capacidade de detecção de cerca de 80% na fase 1, 40% a 60% na fase 2, e 2% a 12% na fase 3.<sup>36</sup>

#### - Ressonância magnética (RNM) do coração

A RNM cardiovascular tem sido atualmente um atrativo para detecção da miocardite. A RNM visualiza todo o miocárdio, conseguindo identificar áreas com processo de miocardite. É também sensível a mudanças de composição tecidual, a qual está alterada na inflamação.<sup>37</sup>

O processo de inflamação aguda na miocardite envolve a liberação de citocinas locais e mobilização de células inflamatórias, anticorpos, no local da inflamação. Na fase subaguda, o tecido experimenta remodelagem com necrose de células locais, aumento da permeabilidade vascular, edema tecidual e, finalmente, fibrose. Essas alterações teciduais marcam o contraste de cinéticos, fazendo com que esses processos possam ser detectados na RNM.<sup>37</sup>

Para detectar a sensibilidade intrínseca na inflamação cardíaca, o tempo de relaxamento T2 tecidual é um indicador de tecido que contém água, que está aumentado na inflamação ou necrose tecidual, como no infarto agudo do miocárdio ou miocardite. O estudo de Abdel-Arty e col. usou a seqüência de imagens sensíveis T2 em 25 pacientes com suspeita de miocardite, e em 23 pessoas no grupo controle. O aumento da intensidade no sinal da seqüência T2 demonstrou sensibilidade de 84% e especificidade de 74% para distinguir os pacientes com miocardite dos pacientes do grupo controle. O valor da seqüência T2 também pode ser correlacionado com marcadores de lesão cardíaca nesta população, refletindo o grau de necrose e o edema tecidual agudo local. A melhora na detecção da patologia na RNM requer o uso do gadolínio como agente de contraste extracelular na seqüência T1.<sup>38</sup> O mesmo estudo também demonstrou altos níveis de melhora miocárdica globaldepois da infusão do gadolínio, como secundário ao aumento da permeabilidade da membrana ou aumento do fluxo sanguíneo capilar, porque a inflamação lesa as membranas das células pela agressão das células T e B complemento- mediadas. Isto resulta no aumento do volume da distribuição, levando ao aumento de imagem extracelular pela impregnação de gadolínio.<sup>37,38</sup>

É interessante notar que estes autores também acharam que a melhora esteve presente em aproximadamente metade dos pacientes com miocardite. Este achado é similar a achados em pacientes com IAM, e confere especificidade à necrose miocárdica. O mecanismo fisiopatológico é incerto, mas a correlação patológica, em recentes estudos em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica, sugere que a formação local de feixes de colágeno pode elucidar este fenômeno, explicando a alta freqüência da melhora com gadolínio tardio, observado na miocardite subaguda, cuja cicatrização começa com o depósito de colágeno.<sup>37,38</sup>

Da mesma forma que a cintilografia, a RNM tem menor capacidade de detecção nas fases mais tardias da doença, sendo sua maior acurácia nas fases 1 e 2.<sup>37</sup>

## 1.9 AUTO-ANTICORPOS NAS CARDIOMIOPATIAS DILATADAS

Durante os últimos 10 anos têm sido muito investigados, em sub-grupos heterogêneos de CMD, auto-anticorpos distintos, que têm contribuído com evidências para a hipótese de que múltiplos mecanismos auto-imunes estão envolvidos na CMD. Na CMD e nas miocardites estão presentes anormalidades na imunidade de células mediadas indicadas através de achados na alteração da função dos linfócitos, no sistema imunológico de citocinas ativadas, na expressão inapropriada do complexo de histocompatibilidade principal no tecido cardíaco e na expressão de moléculas de adesão nos miócitos cardíacos.<sup>24</sup>

Existe uma variedade de auto-anticorpos circulantes no soro de pacientes com CMD. Diferentes antígenos têm sido implicados, tais como miosina, receptores acoplados a proteína G (beta-adrenoreceptores e receptores muscarínicos), Na- K-ATP ase respectivamente e outros. Tabela 4.<sup>6,7,14,24</sup>

**Tabela 4: Anticorpos presentes nas CMD (21)**

ANTÍGENO	ANTICORPO	ATIVIDADE CRUZADA	MECANISMO PATOLÓGICO
Actina	Anti-actina	Desconhecido	Desconhecido
Receptor Ach	Anti-Ach	Desconhecido	Bradycardia?
AH	Anti-AH	Desconhecido	↓metabolismo energético?
PK	Anti-PK		
DLD	Anti-DLD		
CK	Anti-CK		
ANT	Anti-ANT	Enterovirus?	↓metabolismo energético?
Receptor β1	Anti-β1	Enterovirus?	Cronotrópico positivo
Receptor β1	Anti-β1		Inotrópico negativo?
Canal de cálcio	Anti-Ca	ANT? Enterovirus?	Desconhecido
Carnitina	Anti-carnitina		Desconhecido
Sistema de condução	Anti-sinus	Desconhecido	Defeito de condução?
	Anti-AV nodal		
	Anti-Purkinge		
Desmina	Anti-desmina		Desconhecido
Laminina	Anti-laminina		Desconhecido
Mitocôndria/microsomas	AMA	Múltiplos	Inibição da dehidrogenase sarcosina
Miolema	AMLA	Enterovirus	Lítica
Miosina	Anti-miosina		Inotrópico negativo?

	Miosina	Anti-miosina	Enterovírus?	Inotrópico negativo?
	NADD	Anti-NADD	Desconhecido	↓ metabolismo energético?
nuclear	Antígeno	ANA	Desconhecido	Complexo imune-mediado
	Sarcolema	ASA	Enterovírus ·	lítica ·
	SR-Ca-ATPase			Interações metabólicas

---

### **Iniciação da injúria cardíaca: o papel dos auto-anticorpos patogênicos**

Evidências de que auto-anticorpos podem lesar diretamente o miocárdio e iniciar uma seqüência de eventos que levam a CMD, são demonstradas exclusivamente em modelos experimentais.<sup>12</sup>

Vários grupos têm achado anticorpos para vários antígenos cardíacos na miocardite e CMD. Usando a técnica de imunofluorescência indireta (IFL), Rose e col. identificaram anticorpos para antígenos da sarcolema e de miofibrilas, mas esses não são estritamente anticorpos específicos cardíacos, porque eles também interagiriam com músculo esquelético. Entretanto, permanece a dúvida sobre serem esses anticorpos de doenças específicas para miocardite e / ou CMD, porque grupos controle portadores de outras doenças cardíacas não foram incluídos.<sup>7</sup>

Anticorpos contra antígenos mitocondriais, M7, translocador de adenosina nucleotídeo (ANT) têm sido também detectados. Antígenos mitocondriais têm sido geralmente classificados como não-órgãos específicos. Entretanto, anticorpos M7 foram demonstrados em estudo de adsorção nas CMD e miocardite, como específicos cardíacos.<sup>7</sup>

#### **Anticorpo anti-miosina**

A miosina é expressa pela cadeia pesada  $\alpha$  e  $\beta$ . A cadeia  $\beta$  é expressada no músculo esquelético e no ventricular, que é especificamente cardíaco. A cadeia  $\alpha$  é expressada unicamente no miocárdio atrial. Auto-anticorpos para esta molécula representam verdadeiramente auto-anticorpos de órgãos específicos. A identificação de cadeia pesada  $\alpha$  e  $\beta$  de miosina como auto-antígenos relevantes em pacientes

com CMD, é vista no modelo experimental de miocardite/CMD auto-imune e na miocardite em humanos,<sup>7</sup>

Caforio e col., em 1997, selecionaram 110 pacientes portadores de CMD, e analisaram o anticorpo cardíaco, utilizando a técnica de imunofluorescência. A dosagem desse anticorpo (AC) foi feita na ocasião do diagnóstico e durante o acompanhamento (média de 12 meses). Apresentaram 57 pacientes com mensurações de títulos de AC anti-  $\alpha$ -miosina realizadas pelo método Elisa, realizadas também na ocasião do diagnóstico e durante o seguimento. Essas mensurações foram feitas com o mesmo soro usado na identificação do AC na imunofluorescência.<sup>42</sup>

Na imunofluorescência indireta, os AC foram classificados como órgãos específicos: AC produzia uma mancha no citoplasma dos miócitos; AC com “reação cruzada 1” coloria finas estrias no tecido cardíaco, mas coloria fracamente fibras do músculo esquelético; AC com “reação cruzada 2” coloria, com amplas manchas, o coração e o músculo esquelético. Utilizaram grupo controle, testando 30 pacientes com outras doenças cardíacas, 141 pacientes portadores de CMD isquêmica, 55 com doença reumática, 67 com cardiomiopatia hipertrófica, 38 com cardiomiopatia congênita e 200 doadores de sangue saudáveis.<sup>42</sup>

Pela técnica de imunofluorescência, na ocasião do diagnóstico os AC do tipo órgão específico foram mais frequentemente detectados na CMD (28/110, 25%) do que em outras doenças cardíacas (1/160, 1%,  $P= 0.0001$ ), na CMD isquêmica 1/141, 1%,  $P= 0.0001$ ) e grupo controle saudável (7/200, 3%,  $P=0.0001$ ). Durante o seguimento, o AC foi detectado em 22 pacientes com CMD, 11 deles (10%) tinham AC para órgão específico. Os AC foram significativamente menos comuns no seguimento do que na época do diagnóstico.(11 (10%) v 28 (25%);  $P= 0.002$ ).<sup>42</sup>

Utilizando-se o Elisa, viu-se que títulos de AC anti  $\alpha$ -miosina durante o seguimento foram também mais baixos do que durante a época do diagnóstico (0.24 (0.02) v 0.30 (0.02),  $P= 0.038$ ); 24% dos pacientes na época do diagnóstico e 14% no seguimento tinham resultados anormais no Elisa. Nenhum paciente com AC negativo na época do diagnóstico, tanto por imunofluorescência quanto por Elisa, tornaram-se positivos durante o seguimento.<sup>42</sup>

A presença do AC no diagnóstico foi associada a sintomas leves e capacidade física boa durante o seguimento; e a persistência do AC no seguimento foi associada a doença estável e sintomas leves. Isto sugere que AC pode ser marcador precoce da CMD. Pacientes com CMD podem permanecer livres de sintomas, ou por longos períodos podem ser oligosintomáticos, e explicar-se, assim, a pobre correlação do AC na época do diagnóstico e entre AC e duração de sintomas. Os seguimentos desses pacientes nesse estudo indicam que auto-AC na CMD torna-se indetectável com a progressão da doença. Pacientes podem ter um período pré-clínico com títulos de auto-AC altos, mas disfunção cardíaca ainda não reconhecida.<sup>42</sup>

### **Anticorpo anti-receptor m2-muscarínico**

O receptor muscarínico induzido pelo auto-imunidade tem mostrado estar envolvido em diversas doenças miocárdicas. A miocardite auto-imune experimental em ratos, a Ig G, foi capaz de mimetizar os efeitos muscarínicos, como o aumento do acúmulo do GMP cíclico, diminuição do nível do AMP cíclico e redução da contratilidade cardíaca, sugerindo a presença de auto-anticorpos contra os receptores muscarínicos. Entretanto, alguns grupos de pesquisadores demonstraram em outro estudo que a Ig G oriunda do rato chagásico foi capaz de se ligar e estimular os receptores muscarínicos mediando os efeitos biológicos, indicando que a presença do AC receptor muscarínico está envolvida na síndrome disautônômica descrita em pacientes chagásicos. Esses resultados indicam fortemente que auto-AC contra receptor muscarínico está envolvido em doenças miocárdicas das quais pode-se ter base auto-imune.<sup>43,44</sup>

Os receptores muscarínicos são membros da super-família dos receptores proteína G dependente, tendo estrutura bioquímica e imunológica que permitem serem eles alvos auto-imunes.<sup>43,44</sup>

Até agora receptores muscarínicos têm sido classificados de duas formas diferentes. Os que são definidos farmacologicamente foram designados de M1- M4; os receptores clonados foram chamados de m1-m5. A proteína codificada em gen-m1 corresponde ao receptores M1 do tecido neural, a do gen-m2 corresponde ao tecido

cardíaco (m2 cardíaco) ou cerebelo, e a do gen-3 corresponde ao músculo liso ou tecido glandular.<sup>44</sup>

Tem-se sugerido que o anti-AC receptor muscarínico esteja também implicado, em alguns casos, no desenvolvimento e manutenção da fibrilação atrial (FA). Akiyasu Baba e col. selecionaram 101 pacientes com CMD e fração de ejeção (FE) do VE menor ou igual 45%, usando terapia convencional; 104 pacientes com fibrilação atrial idiopática; e 104 pessoas saudáveis. O auto-AC foi mensurado no soro desses pacientes através do método Elisa, utilizando-se um peptídeo sintético que correspondia à seqüência da 2ª alça extracelular do receptor M2 humano. Também foi usada a purificação da Ig G através da coluna de proteína A como anticorpo primário, no Elisa. Os auto-AC anti receptores M2 foram encontrados em 40% dos pacientes com CMD e em 36% de pacientes usando a IgG purificada. Encontraram-se também em pacientes com FA idiopática (23%), e essas frequências foram significativamente mais altas em relação ao grupo controle (8%). Observou-se na CMD que a FA foi mais comum em pacientes com anti-AC muscarínico positivo do que nos que apresentavam AC negativo. Mostrou-se, pois, que o anti-AC M2 foi um preditor independente da FA presente neste grupo.<sup>44</sup> Este fato sugere que auto-AC anti M2 pode mudar a eletrofisiologia atrial, promovendo a perpetuação da FA nestes pacientes. Em embriões de pintos, o soro de pacientes com auto-AC anti M2 positivo de pacientes com FA e CMD, produziu efeitos cronotrópicos negativos e induziu a arritmias atriais, sugerindo que o anti-AC M2 possa promover o desenvolvimento de FA crônica em pacientes com ou sem CMD.<sup>44,45</sup>

### **Receptor $\beta$ – adrenérgico**

Geralmente é aceito que a elevada estimulação do sistema beta ( $\beta$ ) adrenérgico cardíaco é tóxico para o coração, e que a estimulação pode contribuir para patogênese da ICC de várias causas. A elevação das catecolaminas circulante leva a um mecanismo compensatório para diminuição do nível e de função da atividade dos  $\beta$ 1-ARs, marcando a dessensibilização da estimulação  $\beta$ -adrenérgica inotrópica do coração.<sup>46</sup>



A contratilidade miocárdica é uma resposta aos neuro-hormônios adrenérgicos que são aumentados nos terminais dentro do coração e/ou da glândula adrenal. Esses sinais neuro-homonais são detectados e processados por complexos de proteínas localizados dentro da membrana do sarcolema, resultando na conversão dos sinais adrenérgicos, em alterações na propriedade biomecânicas dos miócitos individuais. Este complexo de proteína no sarcolema consiste em receptores adrenérgicos (ARs), proteínas regulatórias de ligação guanina-nucleotídea e efeito da enzima adenilciclase.<sup>47</sup>

Os  $\beta$ 1-ARs constituem aproximadamente 80% dos receptores  $\beta$ -AR. Como os  $\beta$ 2-AR, os  $\beta$ 1-ARs são constituídos por sete membranas em espiral, que envolvem o receptor, com três seqüências de polipeptídeos extracelulares, conectando com a transmembrana em hélice  $\alpha$ . Com o domínio intracelular, os  $\beta$ -ARs se ativam, acoplando a proteína estimulatória. (Gs). A ativação do  $\beta$ 1-AR requer uma conformação específica do receptor, que é estabilizada pelo agonista (aparentemente onde se ligam certas Ig Gs na segunda alça extracelular).<sup>16</sup>

Foram identificados 3 subtipos de receptores  $\beta$ -bloqueadores,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3. Os  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 receberam maior atenção, porque são principalmente reguladores da performance cardíaca; e o  $\beta$ 3 ainda têm sua função desconhecida. O receptor  $\beta$ 1-adrenérgico é primariamente associado à proteína G estimulatória (G $\alpha$ s) dentro do sarcolema, a qual se associa à adenilciclase, resultando na produção de AMPc. O receptor  $\beta$ 2-adrenérgico é associado a ambos (G $\alpha$ s) e a proteína G inibitória (G $\alpha$ i), cuja função diminui em parte, a atividade adenilciclase e subsequente nível AMPc.<sup>47</sup>

Nas cardiomiopatias existe um *downregulation* dos receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos, sendo que a taxa de  $\beta$ 1 para  $\beta$ 2 é 50: 50%, fazendo com que ocorra o aumento de sinais (G $\alpha$ i) e diminuição de AMPc. A regulação da contratilidade miocárdica, a ativação do receptor  $\beta$  pelo G $\alpha$ s, pode também diretamente se associar com canal de cálcio tipo-L- voltagem dependente no sarcolema, aumentando influxo de cálcio. Uma vez gerado, o AMPc leva a uma lista de regulação da contratilidade do miócitos através da ativação direta do AMPc dependente da proteína cinase A (PKA).<sup>50</sup>

## **Anticorpo anti $\beta$ 1 adrenoceptor**

Tem sido observado que as CMD são precipitadas em muitos casos pela lesão progressiva miocárdica induzida por uma reação auto-imune, a qual é desencadeada por agentes infecciosos ou por auto-antígenos. O papel patogênico do auto-AC vem sendo relatado em muitas doenças. Venter e col. relataram auto-anticorpos contra receptores  $\beta$ 2 adrenérgicos na rinite alérgica e na asma, em 1980. Atualmente existem grandes evidências descrevendo os auto-ACs contra receptor  $\beta$ 1-adrenérgico em pacientes com CMD. A observação de Wallukat e Wollenberger, em 1987, que mostrou que a fração de Ig G em pacientes com CMD idiopática poderia induzir a um efeito cronotrópico positivo em cardiomiócitos em rato neonatal *in vitro*, foi posteriormente confirmada, com a descrição da presença de auto-anticorpos contra beta-1-adrenoceptor em pacientes com CMDI.<sup>24</sup> A presença de auto-anticorpos anti-beta1-adrenoceptores na cardiomiopatia chagásica, induzida pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, como detectado por Borda e col., fortalece a hipótese da origem infecciosa como gatilho para a produção desses auto-anticorpos.<sup>15</sup>

Depois das primeiras observações de Wallukat e Wollenberger, Limas e col., demonstraram a presença de auto-anticorpos contra receptores  $\beta$ -adrenérgicos em 40 % dos pacientes com CMD, baseados na inibição de proteínas ligantes que se ligam em membranas cardíacas de ratos, usando soro diluído de pacientes. Magnusson e col., usando peptídeos sintéticos correspondentes à segunda alça extracelular de  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-adrenoceptores de humanos como antígenos, utilizando o método Elisa para classificar pacientes com CMD, acharam auto-anticorpos contra peptídeo  $\beta$ 1 adrenoceptor em 31 % dos casos, mas nenhum caso de auto-anticorpo contra peptídeo  $\beta$ 2-adrenoceptor.<sup>24</sup>

Nos últimos anos tem-se levantado a hipótese de que um auto-anticorpo natural está envolvido na patogênese da IC sistólica. Esta questão surgiu 30 anos

atrás, quando anticorpos com atividade estimulatória  $\beta$ -adrenérgico foram descobertos no soro de pacientes chagásicos, uma das causas mais comuns de IC em todo mundo. Desde esse tempo, frações de Ig Gs com atividade agonistas para receptor  $\beta$ 1-adrenérgico tem sido encontradas no soro de pacientes portadores de CMD idiopática, como nos de etiologia isquêmica. Porém, observam-se auto-anticorpos que se ligam a receptores  $\beta$ -adrenérgico em condições fisiológicas.<sup>17</sup>A prevalência do AC anti  $\beta$ 1-adrenorreceptor varia de 30 a 95% em pacientes com CMD, e 0 a 16% em indivíduos normais, dependendo da técnica utilizada.<sup>49</sup>

De acordo com estudos prévios, foi achada alta prevalência (51%) de anticorpos diretamente contra vários domínios sintéticos  $\beta$ -receptores quando se teve por base o peptídeo similar, quando o Elisa foi testado. Entretanto, muitos desses anticorpos são inespecíficos, eles não reagem com receptores  $\beta$ -adrenérgico nativos e não têm nenhum efeito na função de receptores. Somente metade desses anticorpos detectados ligam-se a fragmentos do receptor, e também reconhecem e se acoplam à membrana do receptor  $\beta$ -adrenérgico, ligando-se diretamente ao domínio da segunda alça extracelular, sugerindo induzir a ativação do  $\beta$ -receptor.<sup>51</sup>

Especula-se que o aumento da atividade  $\beta$ -receptor ocasiona cronicamente um círculo vicioso de super-estimulação adrenérgica, promovendo as manifestações clínicas de IC. Esses anticorpos que ativam o receptor e sensibilizam o sistema cardiovascular para as ações catecolaminas, poderiam causar efeitos a longo prazo como disfunção miocárdica.<sup>51</sup>

Limas, em 1990, estudaram a comparação da frequência de distribuição do antígeno HLA em 100 pacientes com CMD (HLA-A, -B, -C, em 100 pacientes e -DR em 97 pacientes) e em uma população normal do hospital. A presença do ABR-1 foi avaliado em 50 dos 100 pacientes com CMD. Foram excluídos pacientes com doenças conhecidas por estarem associadas com fenótipos do HLA. Para fins de comparação, a distribuição do antígeno HLA e do anticorpo anti-receptor foi examinada em 16 pacientes com CMD, com história de ingestão excessiva de álcool. Os resultados mostraram a distribuição do antígeno HLA-A, B, e C, não ocorrendo diferença entre os pacientes com CMD e pessoas normais. Porém a presença do HLA-DR4 foi significativamente mais alta em pacientes com CMD (40% x 24%,  $p < 0,001$ ). Em contraste, a distribuição do fenótipo HLA na CMD alcoólica não mostrou diferença com o grupo de pessoas normais. Entretanto, 72% (13 dos 18)

com CMD com HLA- DR4 tinham anticorpo antibeta1 receptor comparado com 22% (7 dos 33) dos pacientes com HLA-DR4- negativos. Inversamente, 67% (15 dos 23) tinham ABR – positivo e foram tipados como HLA-DR4, comparados com somente 10% dos ABR- negativos dos pacientes. Nenhum dos 23 pacientes com ABR-positivo foi tipado como HLA-DR3, 37% dos ABR- negativos. Somente 25% das CMD alcoólicas tinham ABR- positivos, e nenhuma preponderância da associação com HLA poderia ser demonstrada.<sup>52</sup>

Tipicamente, há muitas demonstrações de auto-anticorpos, através de procedimentos como imunohistoquímica ou análises de citotoxicidade, de que existe uma vasta quantidade de informações disponíveis; porém é limitada a identificação das reações dos antígenos. Schultheiss e col., acharam, em alguns pacientes com CMD, anticorpos para proteínas de translocador nucleotídeo de adenosina para mitocôndrias do coração. Recentes investigações sugeriram que esses anticorpos reagem cruzadamente com moléculas ligadas a função inter-celular e outras moléculas de superfície de miócitos como complexos de proteínas e canais de cálcio dos miócitos cardíacos.<sup>53</sup>

A cultura de cardiomiócitos de ratos é utilizada como modelo para estudo dos receptores adrenérgicos e dos caminhos de sinais de transdução deles. A curta estimulação através do agonista beta-adrenérgico, o isoproterenol, causa um aumento da frequência cardíaca (FC) dos cardiomiócitos, e a estimulação prolongada é acompanhada de dessensibilização e *downregulation* dos  $\beta$ -AR. Podlowski e col., em 1998, observaram que o soro de pacientes com CMD contendo auto- anticorpos anti- $\beta$ 1-AR aumentavam a FC dos cardiomiócitos. A atividade inotrópica diferenciou o efeito do uso do isoproterenol no  $\beta$ -AR, da reação nos pacientes que não foram dessensibilizados num curto período do experimento. Propôs-se que a estimulação crônica  $\beta$ 1-AR por auto- anticorpos anti  $\beta$ 1-AR poderia desencadear CMD. Evidência para esta hipótese foi levantada também por Dorffel e col., em 1997, que removeram auto-anticorpos anti- $\beta$ 1-AR dos pacientes com CMD, através da técnica de imunoabsorção, e evoluíram com a melhora do perfil hemodinâmico e melhora da função cardíaca, o que foi correlacionado inversamente com a diminuição dos títulos dos auto-anticorpos. Então Podlowski e col. trabalharam com cardiomiócitos incubados com o agonista  $\beta$ -adrenérgico, o isoproterenol ou auto-anticorpo, por 72 horas. A expressão do receptor  $\beta$ -adrenérgico foi estudada no plano RNAm (RNA

mensageiro) através da reação de cadeia polimerase transcrição reversa semiquantitativa e Imunoblotting. A não seletividade do isoproterenol ocasionou dessensibilização em ambos os RNAm de subtipos de receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  adrenérgico e na proteína dos cardiomiócitos de ratos neonatais, onde auto-anticorpos anti  $\beta_1$ -adrenoreceptor diminuíram somente o receptor  $\beta_1$ -adrenérgico do RNAm e a proteína  $\beta_1$ -adrenoreceptor. Esses achados mostram a especificidade da ação dos auto-anticorpos anti  $\beta_1$ -adrenoreceptor. Estas observações foram confirmadas com a cultura de cardiomiócitos incubados com isoproterenol de longa duração ou auto-anticorpos  $\beta_1$ -adrenoreceptor na presença de bisoprolol. O bisoprolol ocupou o  $\beta_1$ -AR, inibindo a dessensibilização de ambos, que estavam expostos ao isoproterenol e ao auto-anticorpo anti  $\beta_1$ -adrenoreceptor, concluindo-se que a exposição prolongada do auto-anticorpo  $\beta_1$ -adrenoreceptor em culturas de cardiomiócitos de ratos, mostrou que a expressão do  $\beta_1$ -adrenoreceptor era similar à observada nos pacientes com CMD.<sup>54</sup>

Jahns e col., em 1999, selecionaram 47 pacientes submetidos a coronariografia, sendo 28 pacientes portadores de doenças valvares (DV), 19 portadores de história de longa duração HAS (CH) e em estágios avançados de CMD hipertensiva. Todos apresentavam CF II a IV e FE menor que 55% (ventriculografia). O grupo controle era de pacientes doadores de sangue saudáveis. Soro de pacientes com CH, DV, e dos saudáveis foi inicialmente avaliado pelo método Elisa, utilizando-se peptídeos sintéticos correspondentes à 2<sup>o</sup> alça extracelular  $\beta_1$  e  $\beta_2$ -AR; posteriormente buscou-se saber se esses auto-anticorpos circulantes eram funcionais para  $\beta_1$ -AR humano. Primeiro, o soro de pacientes com CH, DV e do grupo controle foi avaliado, para descobrir se anticorpos Ig G eram capazes de se ligarem a peptídeos sintéticos correspondentes a aminoterminus, 2<sup>o</sup> alça extracelular ou carboxiterminus  $\beta_1$  e  $\beta_2$ -AR humanos. Então, 36% dos pacientes (39% dos DV e 32% dos CH) revelaram aumento da reatividade com pelo menos um dos domínios dos receptores. Verificou-se que 59% dos soropositivos apresentavam múltiplas reatividades, com diferentes domínios do receptor ou reações cruzadas entre os subtipos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ -AR. Essas altas prevalências de múltiplas reatividades indicam resposta imune policlonal contra moléculas dos receptores ou altos níveis de ligações não específicas. As frações de Ig G com aumento da reatividade para Elisa foram analisadas para ligações com albumina sérica bovina e para controle de

peptídeo não-receptor por *dot-blotting*. O número de pacientes com anticorpo positivo ainda permaneceu elevado, indicando que mais da metade das reações múltiplas com domínios de vários receptores foram ligações não específicas: 25% DV (n=7/28) e 11% CH (n= 2/19); e menos de 4% do grupo controle tinham anticorpos específicos para domínios  $\beta$ -AR sintéticos. A especificidade imuno-reativa da Ig G para ligação para fragmentos do receptor peptídeo sintético foi analisada buscando-se descobrir a capacidade deles de reconhecer a  $\beta$ -AR humano nativo. Somente duas preparações de pacientes com Ig G (um de cada grupo) coloriram as membranas de células Sf9 (tipo de vírus infectado na célula, utilizado como controle negativo), produzindo a conformação nativa da anti 2° alça extracelular  $\beta$ 1-AR deles. Esses anticorpos Ig G foram direcionados contra a 2° alça extracelular  $\beta$ 1-AR. Entretanto, nenhum dos anticorpos foi capaz de reconhecer os receptores renaturados pela técnica de *western blotting* da lise de células Sf9, sugerindo que anti 2° alça extracelular  $\beta$ 1-AR preferencialmente reconhece a conformação específica nativa do receptor que é sensível a desnaturação, e não pode ser totalmente restaurado depois pela técnica de *western blotting*. Logo, somente um paciente com doença de válvula aórtica, concomitante com doença coronariana, e um do grupo controle, tinham efeito funcional no anti 2° alça extracelular  $\beta$ 1-AR, concluindo-se que reações auto-ímmunes contra a anti 2° alça extracelular  $\beta$ -AR humana não parecem estar associadas com cardiomiopatias secundárias como doença valvar e /ou hipertensiva.<sup>55</sup>

Em outro estudo, Jahns e col. avaliaram 104 pacientes portadores de CMD (CMDI = 65 e CMI= 39), em CF II a IV, apresentando FE menor, 55% definido pela ventriculografia e grupo controle com 108 pessoas saudáveis. As preparações de Ig G dos pacientes e as do grupo controle foram inicialmente identificadas como AC, capazes de se ligarem aos domínios sintéticos dos receptores humanos  $\beta$ 1-AR e  $\beta$ 2-AR, utilizando-se o método Elisa (aminoterminus, e carboxiterminal e/ou domínio da 2° alça extra-celular). Por este critério, 51% dos pacientes mostraram aumento da reatividade maior ou igual a um domínio receptor selecionado. Dos soropositivos, 24% mostraram múltiplas reatividades, e 59% revelaram reação cruzada entre  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2-AR. A alta prevalência (24%) de múltiplas reações com vários domínios de receptores poderia indicar respostas imunes policlonais de moléculas de receptores de altos níveis de ligação não específica. Para diferenciar entre essas possibilidades

preparações de IgG com aumento da reatividade em direção ao domínio  $\beta$ -AR sintético foram também analisadas para ligações com albumina e controle do peptídeo não receptor por “*dot blotting*”, que permite claramente diferenciar entre ligações específicas para um ou para vários domínios receptores, resultados negativos e/ou ligações não específicas para todas as proteínas nas membranas. A prevalência específica verdadeira para AC, depois da eliminação de reações não específicas, permaneceu 34% CMDI e 31% CMI, mas somente 4% dos indivíduos saudáveis tinham IgG específica circulante para o domínio  $\beta$ -AR sintético. Na CMD, 83% desses AC foram direcionados ao domínio da 2<sup>o</sup> alça extracelular, 86% reconhecendo o  $\beta$ 1-AR; 4% reconheceram  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2-AR; e somente 14% foram seletivos  $\beta$ 2-AR. Em contraste, na CMI esses AC foram direcionados com similar frequência contra todos os três domínios dos receptores testados e ambos os subtipos de receptores.<sup>49</sup>

Posteriormente, analisaram a ligação da Ig G humana em preparações com  $\beta$ -AR presentes em sua conformação nativa de células de membrana ( $\beta$ 1 e  $\beta$ 2-AR humanos expressados em bacilovírus Sf 9 de células de insetos), utilizando experimentos com imunofluorescência. Somente um subgrupo de AC direcionado contra o receptor do domínio da 2<sup>o</sup> alça extracelular foi reconhecido para AR humanos nativos situados na célula da membrana. Todos os AC desse subgrupo diminuíam a ligação do receptor com “ligante” e aumentavam a sinalização do receptor mediada (através da medição do AMPc), a qual poderia ser bloqueada com bisoprolol *in vitro*. A prevalência foi de 1 % no grupo controle, 10% na CMI e 26 % na CMDI, sendo associada com pior disfunção ventricular.<sup>49</sup>

Iwata e col., 2001, selecionaram 104 pacientes portadores de CMD idiopática com FE menor que 55%, confirmado por ventriculografia radioisotópica. Os auto-anticorpos foram mensurados pela técnica do Elisa, usando-se peptídeo sintético correspondente à 2<sup>o</sup> alça extracelular  $\beta$ 1-AR de humanos. Todos os pacientes foram monitorizados com Holter após coleta da amostra de sangue, para mensurações de auto-anticorpos. O Holter assegurou número total de extrassístoles ventriculares (EV), estrassístoles supra-ventriculares (ESSV) e taquicardias ventriculares (TV). Os auto-anticorpos anti- $\beta$ 1-AR da 2<sup>o</sup> alça extracelular foram detectados em 40 pacientes (38%). Não ocorreram diferenças entre idade, tempo de doença, sexo, CF, uso de medicações, FE e níveis de norepinefrina entre auto- anticorpos positivos e

negativos. Nos achados do eletrocardiograma do Holter, não se evidenciaram diferenças entre números de ESSV e ESV entre pacientes com auto- anticorpos positivos e negativos. A presença de TV foi mais comum no grupo de pacientes com auto-anticorpos positivos, com ESV multifocais sendo predominantes. A presença de auto-anticorpos e FE do VE baixa foi um preditor independente para TV. A morte súbita foi um preditor independente para a presença de auto-anticorpos, bem como FE menor que 30 %. Os pesquisadores concluíram que auto-anticorpos anti  $\beta$ 1-AR da 2° alça extracelular podem estar relacionados com arritmias ventriculares sérias em pacientes com CMD, e que a presença de auto-anticorpos é preditor independente de morte súbita. Logo, esses auto-anticorpos podem contribuir para instabilidade elétrica em pacientes com CMDI.<sup>56</sup>

Janhns e col., imunizaram ratos com anti  $\beta$ 1-AR da 2° alça extracelular humano (seqüência 100% idêntica humana e do rato) resultando em desenvolvimento de AC anti  $\beta$ 1-AR estimulatórios, desenvolvendo dilatação e disfunção progressiva cardíaca. A transferência anti  $\beta$ 1-AR de ratos com cardiomiopatia para animais sadios reproduziram a doença. Este achado de cardiomiopatia é agora referida como anti  $\beta$ 1-AR induzindo a cardiomiopatia dilatada imune. Pois esses experimentos sugerem fortemente relação causa e efeito entre a função ativa do (auto-) anticorpos anti  $\beta$ 1-AR e iniciação e/ou curso da cardiomiopatia dilatada e a relevância clínica verdadeira desses AC na cardiomiopatia humana permanece a ser determinada.<sup>57</sup>

Esses achados em conjunto apontam para a participação funcional dos auto-anticorpos  $\beta$ -adrenérgicos na patogênese e no curso clínico das cardiomiopatias, a partir de evidências experimentais em animais e em culturas de células, e avaliando-se a resposta desses auto-anticorpos isolados em portadores de IC.

## 1.10 IMUNOADSORÇÃO

A partir das evidências experimentais de que AC cardíacos são importantes na indução manutenção e progressão da CMDI, tem-se buscado o desenvolvimento



de técnicas capazes de eliminar esses AC através da adsorção Ig G extra-corpórea. Desta forma poderíamos melhorar ou pelo menos estabilizar a função do coração.<sup>58</sup> A remoção de auto-anticorpos utilizando-se a imunoadsorção (IA) é feita através da remoção do plasma de pacientes sobre colunas que contêm anticorpos imobilizados contra imunoglobulina (IgG) de cadeias leve kappa e lambda, e de cadeias pesadas de Ig G. A prevenção de complicações infecciosas, que deve aumentar com a diminuição de níveis de Ig G circulante, é evitada com a reposição Ig G intravenosa.<sup>14</sup>

Dörffel e col, em 1997, num estudo piloto não controlado, avaliaram o efeito hemodinâmico em pacientes portadores de IC avançada a curto prazo. Utilizaram 9 pacientes com CMD, CF III e IV da NYHA, com FE menor 25% ao ecocardiograma e na ventriculografia; todos faziam uso de terapia medicamentosa como IECA, digital, diurético. Como os AC anti- $\beta$ 1-AR são competitivamente deslocados pelo beta- bloqueador, a terapia venosa com beta-bloqueador foi iniciada um dia antes da IA com esmolol, posteriormente seguido com terapia oral com metoprolol. Todos os pacientes se submeteram a sessões de IA diariamente, em 5 dias consecutivos. Após cada sessão de IA, o nível plasmático da Ig G era diminuído em 20 a 30 %. Depois da última sessão, todos recebiam a infusão de Ig G para restaurar os níveis adequados da Ig G. Esses pacientes ficaram monitorizados com cateter de Swan-Ganz para avaliação do desempenho hemodinâmico antes, durante e após a sessão de IA, assim como avaliação ecocardiográfica da função VE e a mensuração dos níveis do AC-anti-  $\beta$ 1-AR após cada sessão. A IA foi efetiva na diminuição dos níveis do AC-anti- $\beta$ 1-AR em todos os pacientes. Embora a cada sessão de IA não houvesse diferença significativa dos parâmetros hemodinâmicos mensurados, evidenciou-se uma melhora marcada do perfil hemodinâmico dentro de 6 dias, através da elevação significativa do IC (índice cardíaco) ( $2.0 \pm 0.42$  para  $2.9 \pm 0.79$  L.min<sup>-1</sup>.m<sup>2</sup>, P<0,1), acompanhada da diminuição da resistência vascular periférica ( $1965 \pm 332$  para  $949 \pm 351$  dyne.s.cm<sup>-2</sup>, P< 0,01).<sup>59</sup>

Felix e col., em 2000, fizeram um estudo randomizado para investigar o efeito prolongado da IA em pacientes (18) com CMD (CF III e IV NYHA, FE do VE menor que 30%, e IC menor ou igual 2.5L/min/m<sup>2</sup>) em tratamento com medicação oral para Insuf. Cardíaca. Selecionaram grupo controle com CMD, com as mesmas características, que continuaram com a medicação oral por três meses. No grupo da

IA, os pacientes foram tratados inicialmente com sessões de IA diariamente por três dias consecutivos. Então, em intervalos de um mês, a IA foi repetida por três meses seguidos, com sessões de IA diariamente durante dois dias consecutivos, até o terceiro mês. Depois de cada curso de IA, a Ig G policlonal era transfundida nos pacientes. A monitorização hemodinâmica foi feita com o cateter de Swan-Ganz a cada sessão IA, e a FE do VE foi mensurada pelo ecocardiograma. A FE no ECO no perfil hemodinâmico não melhorou no final de três meses no grupo controle. Em contraste, no grupo da IA o índice cardíaco aumentou de 2.1 ( $\pm 0.1$ ) para 2.8 ( $\pm 0.1$ ) L/min/m<sup>2</sup> ( $p < 0.01$ ), o índice do volume sistólico (SVI) 27.8 ( $\pm 2.3$ ) para 36.2 ( $\pm 2.5$ ) ml/m<sup>2</sup> ( $p < 0.01$ ) e a resistência vascular periférica diminuiu de 1.428 ( $\pm 74$ ) para 997 ( $\pm 55$ ) dyne·s·cm<sup>-2</sup> ( $p < 0.01$ ). A melhora hemodinâmica persistiu depois de três meses, além do aumento significativo da FE do VE.<sup>60</sup>

Muller e col., em 2000, avaliaram o efeito da função cardíaca em pacientes portadores de CMDI durante um ano. Os auto-anticorpos anti  $\beta 1$ -AR foram usados como marcadores para a presença de auto-anticorpos, para identificar os que poderiam se beneficiar da IA. Os pacientes tiveram a função cardíaca avaliada através do ecocardiograma bidimensional (FE e diâmetros das cavidades), assim como a classe funcional (NYHA). Selecionaram-se 34 pacientes portadores de CMDI (17 grupo controle e 17 para tratamento). Todos faziam uso de medicações cardiológicas semelhantes, e eram candidatos a transplante cardíaco. A mensuração do auto-AC anti- $\beta 1$ -AR foi feita através do efeito cronotrópico dos auto-AC anti- $\beta 1$ -AR em culturas de cardiomiócitos de ratos neonatais. O aumento da contratilidade, depois da adição da fração Ig G preparada do soro de pacientes, foi definido como positivo ou negativo. IA foi feita em 5 dias consecutivos e o nível de Ig G foi mensurado. A redução da Ig G abaixo de 120mg/ dc foi planejada com risco de infecção aceitável. Depois de um ano de tratamento com IA, a FE aumentou de 0.223  $\pm$  0.33% para 0.379  $\pm$  0.79% , o diâmetro diastólico do VE diminuiu de 74.5  $\pm$  7.1 para 63.7  $\pm$  6.0 mm e o diâmetro sistólico do VE diminuiu de 65.9  $\pm$  6.1 para 55.4  $\pm$  6.0 mm. Todas essas mudanças foram significativas ( $p = 0.0001$ ). No grupo controle não houve diferenças importantes. A classe funcional (NYHA) foi significativamente melhor no grupo da IA em relação ao grupo controle, depois de 1 ano. Isto demonstra que a IA pode ser superior ao uso padrão da terapia medicamentosa, com melhora significativa da performance cardíaca e funcional dos pacientes.<sup>61</sup>

Staudt e col., em 2001, selecionaram 25 pacientes portadores de CMD com AC anti-  $\beta$ 1-AR presente no próximo soro, apresentando na BEM sinais aparentes de inflamação miocárdica (linfócitos  $> 2,5$  cells/  $\text{mm}^2$ ). Foram excluídas doenças coronariana, orovalvar e hipertrófica. Selecionaram-se 20 pacientes para tratamento com IA e subsequente substituição Ig G (grupo IA/ IgG) em intervalos consecutivos de um mês até completar três meses. Utilizaram-se 13 pacientes portadores de CMD, com as mesmas características acima, como grupo controle, utilizando a terapia convencional sem IA/Ig G. Todos os pacientes apresentavam, ao ecocardiograma, disfunção ventricular, com FE menor que 30% e CF III e IV. Antes de se iniciar o estudo, e depois de três meses, foram obtidas biópsias de todos os pacientes. Então avaliaram-se novamente os parâmetros ecocardiográficos e níveis de AC anti- $\beta$ 1-AR do grupo controle, e os compararam aos do grupo IA/Ig G. No grupo IA/IgG, o nível do AC anti- $\beta$ 1-AR diminuiu de  $4.3 \pm 0.3$  para  $1.1 \pm 0.4$  unidades relativas ( $p < 0.01$  x grupo controle). Simultaneamente, houve aumento significativo da FE do VE no grupo IA/ IgG de  $21.3 \pm 1.7$  % para (de 15 a 29 %) para  $27.0 \pm 1.3$  % (22 % para 36 %), ( $p < 0.01$  X grupo controle). O diâmetro sistólico do VE diminuiu de  $59.0 \pm 2.0$  mm (50 a 72 mm) para  $55.0 \pm 2.1$ mm (40 para 68 mm) e o diâmetro diastólico do VE diminuiu de  $70.1 \pm 1.9$  mm (60 para 78 mm) para  $67.5 \pm 1.7$  mm (56 para 78 mm) ( $p < 0.05$  x grupo controle/  $p = 0.2$  x grupo controle). A classe funcional da NYHA melhorou no grupo da IA ( $p < 0.05$  x grupo controle). No grupo controle, os achados histológicos foram de que o número de linfócitos (CD3, CD4 e CD8) de células de antígeno comum de leucócitos no miocárdio permaneceu estável Não houve nenhuma mudança na expressão do antígeno HLA da classe II. No grupo IA/ Ig G, o número de células positivas CD3 diminuiu de  $5.7 \pm 0.8$  para  $2.9 \pm 0.5$  células/  $\text{mm}^2$  ( $p < 0.01$  X grupo controle) dentro de três meses. Este declínio mostrou um paralelo na diminuição de linfócitos CD4 positivos de  $2.3 \pm 0.4$  para  $0.8 \pm 0.1$  células/  $\text{mm}^2$  ( $p < 0.01$  x controle) e de linfócitos CD8 positivos de  $2.8 \pm 0.5$  para  $1.8 \pm 0.3$  células/  $\text{mm}^2$  ( $p < 0.05$  x controle. O número de células LCA positivas também diminuiu de  $20.0 \pm 3.2$  para  $9.9 \pm 2.8$  células/  $\text{mm}^2$  ( $p < 0.01$  x controle). A redução de células inflamatórias foi paralela ao declínio do HLA tipo II de  $2.1 \pm 0.7$  para  $1.1 \pm 0.4$  5 ( $p < 0.05$  x controle). No grupo IA/Ig G e no grupo controle, o grau de fibrose permaneceu não modificado durante o seguimento.<sup>62</sup>

O tratamento com a IA/Ig G pode influenciar o sistema imunológico através de vários mecanismos. Auto-anticorpos são neutralizados por propriedades anti-idiotípicas da IgG venosa. Além do mais, a ligação de imunoglobulinas anti-idiotípicas para os receptores Fr de células B diminui a produção de auto-anticorpos dentro da célula B, e por isso previne a possibilidade de fenômenos de re-ligação após IA. E, finalmente, a Ig G modula a imunidade celular e o metabolismo das citocinas, que são marcadores de respostas imunológicas na CMD. Logo, a IA/Ig G é usada com sucesso para tratamento de várias doenças auto- imunes. Em adição, a substituição depois da depleção da Ig G induzida por vários métodos (ex. plasmaferese) representa uma opção terapêutica para várias doenças auto- imunes.<sup>61</sup>

Concluindo, a IA é hoje um novo método terapêutico a promover a remoção de auto-anticorpos; é capaz de interferir no estado imuno-inflamatório sistêmico e miocárdico, ocasionando melhora dos parâmetros funcionais, e de induzir remodelamento cardíaco reverso. Essa nova técnica, ainda experimental, necessita de estudos fase III direcionados para desfechos robustos, como mortalidade e redução de hospitalizações por IC para sua incorporação na prática clínica.

## 2 OBJETIVOS DO ESTUDO

Os objetivos do presente estudo são:

Primário:

- Identificar a presença do auto-anticorpo contra a segunda alça extracelular do  $\beta$ 1-adrenorreceptor em pacientes portadores de IC.

Secundários:

- Correlacionar a presença do auto-anticorpo contra a segunda alça extracelular do  $\beta$ 1 adrenorreceptor em portadores de IC
  - ✓ com a idade
  - ✓ com o sexo do paciente
  - ✓ com história de infecção prévia
  - ✓ com o tempo de doença
- ✓ com o grau de disfunção ventricular
- ✓ Correlacionar o AC entre os subgrupos da IC (CMD de origem não inflamatória e miocardite) em relação a idade, o grau de disfunção ventricular e níveis de titulação do ELISA
  - ✓ Correlacionar os níveis de AC entre o grupo controle, CMD de origem não inflamatória e Miocardite.

### 3 METODOS

Foram selecionados prospectivamente 18 pacientes homens (n 11) e mulheres (n 7) portadores de insuficiência cardíaca de origem não isquêmica, no período de janeiro de 2005 a agosto de 2005. Os critérios de inclusão foram as classes funcionais (CF II a IV, seguindo o critério da New York Heart Association – NYHA), a FE inferior 50% em repouso (identificados ao ecocardiograma bidimensional pelo método de Simpson). Os pacientes foram acompanhados no ambulatório de Cardiologia do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP); foram detalhadamente informados sobre os procedimentos de investigação incluídos no estudo e, após leitura completa e aceitação por escrito em termo de consentimento livre e informado, foram definitivamente aceitos para o estudo; foram submetidos a história clínica, coleta de sangue para dosagem do AC, ecocardiograma bidimensional, medicações em uso, e exames de cardio-imagem. A terapia regular da IC incluía inibidores da enzima de conversora da angiotensina (ou antagonistas dos receptores de angiotensina II), digitálicos, diuréticos, espirolactona. Foram selecionados apenas os pacientes admitidos no ambulatório, sem uso prévio de betabloqueadores e, após a coleta do sangue, iniciava-se a medicação.

Os pacientes com IC foram estratificados em dois grupos: Grupo I, com CMD não-inflamatória e Grupo II, com miocardite. No Grupo I (n=8), 5 pacientes apresentavam cintilografia miocárdica com Galium (Ga)-67 negativa para miocardite, e 3 pacientes apresentavam história clínica não sugestiva de miocardite. O diagnóstico de miocardite (n=10) foi feito através da cintilografia miocárdica com Ga-67 positiva, ou biópsia endomiocárdica positiva baseado no critério de Dallas<sup>9</sup>.

Os critérios de exclusão foram doença de Chagas, doença orovalvar – de moderada a grave –, diabetes ou outra doença endócrina, doenças do colágeno, neoplasias, HAS estágio 3 (consenso SBC), uso de betabloqueadores, uso de drogas ilícitas e consumo de álcool. Os pacientes com história de *angina pectoris* ou idade superior a 50 anos, com dois ou mais fatores de risco, foram submetidos a coronariografia. A doença coronariana epicárdica aterosclerótica foi excluída por cineangiocoronariografia, com identificação de lesão aterosclerótica maior ou igual 50 % de um ou mais artérias coronarianas. O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina / Hospital Universitário Antônio Pedro n ° 140/04.

Do grupo da CMD não inflamatória, sete foram submetidos a cineangiocoronariografia, excluindo a doença aterosclerótica obstrutiva. Do grupo da miocardite, dez realizaram cintilografia miocárdica, sendo nove positivas para miocardite e um negativo, tendo sido este incluído no grupo devido à biópsia endomiocárdica histológica positiva para miocardite; e seis realizaram cineangiocoronariografia, afastando a hipótese de doença aterosclerótica obstrutiva.

Para estabelecimento de níveis de referência de normalidade de anticorpo contra a segunda alça extracelular do  $\beta$ 1-adrenoreceptor, foram selecionados 20 indivíduos que não apresentavam evidências de cardiopatia de qualquer etiologia, e que aceitaram participar do estudo.

As principais características dos grupos estudados se encontram descritas na tabela 5.

## **Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

Foram coletados 10 ml do sangue na veia do antebraço de cada participante no HUAP, após repouso de 15 min deitado. Os pacientes não precisavam estar em jejum. As amostras de sangue foram coletadas em tubos secos, a vácuo, mantidas em gelo e levadas imediatamente ao laboratório, onde o soro foi separado em centrifuga refrigerada a 4°C, 2000 RPM por 12 min, após o que foi aliquoteado e encaminhado ao Instituto de Biofísica, armazenado em caixa com gelo na temperatura de 10°C e, posteriormente, armazenado em freezer a 0°C, até ser analisado.

A pesquisa do anticorpo anti- $\beta_1$ -adrenoreceptor foi realizada no Laboratório de Eletrofisiologia Antônio Paes de Carvalho, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O reconhecimento do peptídeo sintético cuja seqüência corresponde à segunda alça extracelular (o2) do  $\beta_1$ -AR (HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTN) foi feito através do ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Para tanto, cada poço de uma microplaca de titulação (Corning, Inc., USA) foi recoberto com 500 ng de peptídeo em tampão carbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6 e incubado por 12 horas a 4°C. Após esse período, os poços foram saturados com PBS + 5% (v/v) de soro fetal bovino e Tween 20 0,05% por 90 min a 25°C para o bloqueio dos sítios de ligação residuais. As amostras de soro CMD (cardiomiopatia dilatada) ou NBD (doadores normais) foram diluídas 1:100 ou 1:50 em PBS - soro fetal bovino + 0.05% (v/v) Tween-20 (PBS-SFB-T) e incubadas com o peptídeo por 180 min a 37°C. Diluições seriadas de um anticorpo policlonal de coelho, específico contra a segunda alça extracelular (o2) do  $\beta_1$ -AR, foram utilizadas como controle positivo. IgG biotinizada de cabra anti-IgG humana ou anti-IgG de camundongo foi diluída (1:5000) em PBS-SFB-T e deixada para reagir por 60 min a 37°C. As interações dos anticorpos foram detectadas através de estreptavidina conjugada a peroxidase (1  $\mu$ g/ml) em PBS-T. Peróxido de hidrogênio + diamina de o-fenilano foram usados como substrato para a enzima, e o desenvolvimento de cor foi medido a uma absorbância de 450 nm.

Como resultado, foi aplicada a média dos valores obtidos no grupo controle.



#### 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelos seguintes métodos:

- para comparação de dados quantitativos (por exemplo, Elisa) entre dois grupos (IC e controle), foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* pois as variáveis não apresentaram distribuição normal (distribuição Gaussiana), devido principalmente à dispersão dos dados e ao tamanho reduzido da amostra;
- para comparação de dados qualitativos (Elisa alterado) foi aplicado o teste de *qui-quadrado* ( $\chi^2$ ) ou o teste exato de *Fisher*.

O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%, ou seja, quando o valor de  $p$  do teste estatístico for menor ou igual a 0,05, então existe significância estatística. A análise estatística foi processada pelo software estatístico SAS<sup>®</sup> System.

## 5 RESULTADOS

**Tabela 5: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS**

	IC (n = 18)	CONTROLE (n =20)	P
Idade (anos)	48,2 ± 11,9	22,8 ± 1,70	P < 0,001
Sexo n (%)			P = 0,49
Masculino	11 (61,1)	10 (50,0)	
Feminino	7 (38,9)	10 (50,0)	
Fração de ejeção de VE (%)	35,3 ± 7,77	-	-
Tempo de doença: n (%)			
< 6 meses	11 (61,1)	-	-
> 6 e >12 meses	7 (38,9)	-	-
CF (NYHA) n (%)			
II	10 (55,6)	-	-
III	4 (22,2)	-	-
IV	4 (22,2)	-	-
Infeção prévia n (%)			
Presente	8 (44,4)	-	-
Ausente	10 (55,6)	-	-
Cintilografia miocárdica n (%)			
Positiva	9 (64,3%)	-	-
Negativa	5 (35,7)	-	-
Digoxina (mg/d) – (n)	0,25 ± 0 (6)	-	-
Furosemida (mg/d) – (n)	40,0 ± 27,9 (10)	-	-
Captopril (mg/d) – (n)	52,5 ± 21,0 (10)	-	-
Enalapril (mg/d) – (n)	15,71 ± 5,3 (7)	-	-
Losartam (mg/d) – (n)	50,0 ± 0 (2)	-	-
Espiro lactona (mg/d) – (n)	25,0 ± 0 (8)	-	-

n= número de pacientes; VE= ventrículo esquerdo; CF = classe funcional (NYHA).

Valores apresentados em média ± erro padrão

**Tabela 6: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS GRUPOS ESTUDADOS**

	<b>MIOCARDITE</b> (n = 10)	<b>CMD</b> (n = 8)	<b>P</b>
Idade (anos)	49,6 ± 13,1	46,5 ± 10,7	0,62
Sexo % (n)			
Masculino	70 (7)	50 (4)	ns
Feminino	30 (3)	50(4)	
Fração de ejeção de VE (%)	33,80 ± 8,6	37,13 ± 6,56	0,30
Tempo de doença, (n)			
< 6 meses	6	5	ns
> 6 e >12 meses	4	3	ns
Classe funcional (NYHA) (n)			
II	6	4	ns
III	2	2	ns
IV	2	2	ns
Digoxina (mg/d) – (n)	0,25 ± 0 (3)	0,25± 0 (3)	ns
Furosemida (mg/d) – (n)	53,3 ± 20,6 (6)	60 ± 40 (4)	ns
Captopril (mg/d) – (n)	46,4 ± 21,3 (7)	66,6 ± 14,4 (3)	ns
Enalapril (mg/d) – (n)	12,5 ± 5 (4)	17,5± 5 (4)	ns
Espiro lactona (mg/d)– (n)	25,0 ± 0 (6)	25,0 ± 0 (2)	ns
Anticorpo anti 02 B1- AR positivos % (n)	70 (7)	25 (2)	0,057

n = número de pacientes. Valores apresentados em média ± erro padrão.

### 5.1 ANÁLISE DAS TITULAÇÕES DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR ENTRE OS GRUPOS IC E DE CONTROLE

**Tabela 7: Comparação da Titulação do Anticorpo Anti 02  $\beta$ 1- AR entre os Grupos IC e Controle.**

Variável/ Grupo	IC (n = 18)	Controle (n = 20)	P
Elisa (valor)	0,40 $\pm$ 0,37	0,27 $\pm$ 0,15	0,48

Valores apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (p)

Na análise da titulação do Elisa, não se observou diferença significativa entre os dois grupos: IC e controle.

### 5.2 COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA NO GRUPO IC

Análise da titulação do Elisa entre as idades: < 45 anos e  $\geq$  45 anos. (tabela 8)

**Tabela 8: Comparação da Titulação do Anticorpo Anti 02  $\beta$ 1- AR de acordo com a Idade no Grupo IC**

Variável	< 45 anos (n = 9)	$\geq$ 45 anos (n = 9)	p
Elisa (valor)	0,50 $\pm$ 0,40	0,29 $\pm$ 0,32	0,20

Valores apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (p)

Observou-se que não existe diferença significativa no nível do Elisa entre os dois grupos.

### 5.3 COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1-AR ENTRE OS SEXOS, NO GRUPO IC

Não houve diferença do nível do Elisa entre os dois grupos: sexo masculino e sexo feminino (tabela 9).

**Tabela 9. Comparação da Titulação do Anticorpo Anti 02  $\beta$ 1-AR entre os Sexos, no Grupo IC**

<b>Variável</b>	<b>Masculino (n = 11)</b>	<b>Feminino (n = 7)</b>	<b>p</b>
Elisa (valor)	0,46 $\pm$ 0,42	0,29 $\pm$ 0,26	0,49

Valores apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (p)

### 5.4 COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1-AR EM RELAÇÃO HISTÓRIA DE INFECÇÃO PRÉVIA

Não houve diferença do nível do Elisa em relação à história prévia de infecção no grupo de IC (tabela 10).

**Tabela 10: Comparação da Titulação do Anticorpo Anti 02  $\beta$ 1-AR em relação história prévia de Infecção no Grupo IC**

<b>Variável</b>	<b>Presente (n = 8)</b>	<b>Ausente (n =10)</b>	<b>p</b>
Elisa (valor)	0,30 $\pm$ 0,28	0,47 $\pm$ 0,42	0,37

Valores apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (p)

### 5.5 COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR EM RELAÇÃO AO TEMPO DE DOENÇA NO GRUPO IC: 6 MESES E 12 MESES

**Tabela 11: Comparação da Titulação do Anticorpo Anti 02 β1-AR em relação ao Tempo de Doença no Grupo IC: 6 meses e 12 meses**

Variável	6 meses (n=11)	12 meses (n=7)	p
Elisa (valor)	0,43 ± 0,43	0,34 ± 0,26	0,89

Valores apresentados em média ± desvio padrão (p)

Não houve diferença do nível do Elisa em relação ao tempo de doença no grupo de IC.

### 5.6 COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR EM RELAÇÃO A FE NO GRUPO IC: >35% E ≤ 35 %

**Tabela 12: Comparação da Titulação do Anticorpo Anti 02 β1-AR em relação à FE no grupo IC: > 35 e ≤ 35 %**

Variável	FE > 35 % (n=10)	FE ≤ 35 % (n=8)	P
Elisa (valor)	0,45 ± 0,39	0,32 ± 0,35	0,47

Valores apresentados em média ± desvio padrão (p)

Não houve diferença do nível do Elisa em relação à FE no grupo de IC.

### 5.7 COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR ENTRE OS DOIS GRUPOS DE IC (MIOCARDITE E CMD NÃO INFLAMATÓRIA) ESTUDADOS EM RELAÇÃO A IDADE, FE E ELISA.

A análise das concentrações do anticorpo anti 02 β1- AR entre o grupo da miocardite e o da CMD não inflamatória, em relação à níveis de Elisa, idade e FE como mostra a tabela 13.

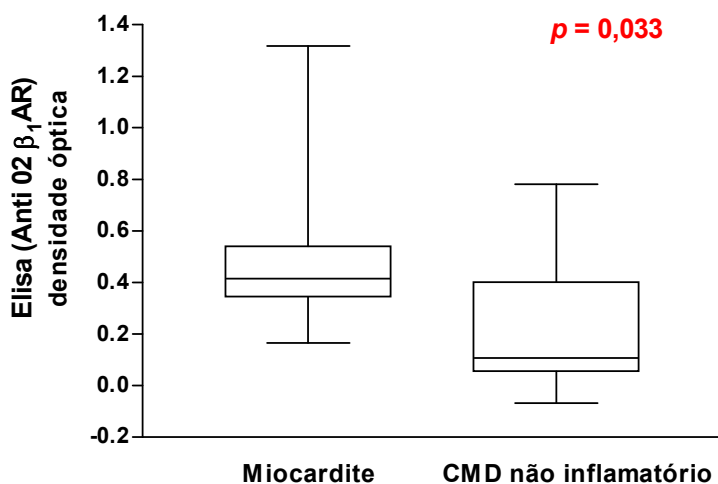
**Tabela 13: Comparação da Titulação do Elisa nos grupos Miocardite e CMD não Inflamatória**

Variável	Miocardite (n=10)	CMD não Infl. (n=8)	P
Elisa (valor)	0,53 ± 0,36	0,23 ± 0,31	0,033
Idade	49,60 ± 13,17	46,50 ± 10,76	0,62
FE (%)	33,80 ± 8,6	37,13 ± 6,56	0,30

Valores apresentados em média ± desvio padrão (p)

Observaram que existem diferenças significativas no nível do Elisa ( $p = 0,033$ ) entre os dois grupos de IC. O gráfico abaixo ilustra a relação entre o Elisa nos grupos IC (miocardite e CMD inflam.)(fig.4)

Não existe diferença significativa, ao nível de 5%, nas demais variáveis.



**Figura 4.** Concentrações de anti 02  $\beta$ 1 AR nos grupos Miocardite e CMD não Inflamatória.  $p = 0,033$

#### 5.8 COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR ENTRE OS GRUPOS MIOCARDITE E GRUPO CONTROLE

**Tabela 14: Titulação do Anticorpo Anti 02  $\beta$ 1- AR entre os Grupos:**

Variável/ Grupo	Controle (n = 20)	Miocardite (n=10)	P	p
Elisa (valor)	0,27 ± 0,15	0,53 ± 0,36	0,03	0,48

Valores apresentados em média ± desvio padrão (p)

Observaram que existem diferenças significativas no nível do Elisa ( $p = 0,03$ ) entre os dois grupos, controle e miocardite.

#### 5.9 COMPARAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTICORPO ANTI 02 B1- AR ENTRE OS GRUPOS: CONTROLE E CMD NÃO INFLAMATÓRIA

**Tabela 15: Titulação do Anticorpo Anti 02  $\beta$ 1- AR entre os Grupos: Controle e CMI inflamatória**

Variável/ Grupo	Controle (n = 20)	CMD não inflamatória (n=8)	P	p
Elisa (valor)	0,27 $\pm$ 0,15	0,23 $\pm$ 0,31	0,24	0,48

Valores apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (p)

Na análise da titulação do Elisa, não se observou diferença significativa entre os dois grupos: controle e CMD não inflamatória.

#### 5.10 CORRELAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO SIGNIFICATIVA ENTRE O ELISA E A IC

A tabela 16 fornece a frequência e o percentual do Elisa segundo a IC. A análise estatística foi realizada pelo teste exato de Fisher.

Esta análise tem por objetivo verificar se os dois grupos (miocardite e CMD não inflamatória) são estatisticamente diferentes sob o ponto de vista do Elisa alterado, ou seja, se a proporção de Elisa alterado difere significativamente entre os dois grupos.

**Tabela 16: Elisa > 0,300 (ELISA e IC)**

Elisa	Insuficiência Cardíaca		Total
	Miocardite	CMD não inflam.	
Frequência			
Col Pct			
> 0.300	7 70.00	2 25.00	9
$\leq$ 0.300	3 30.00	6 75.00	9
Total	10	8	18

Observou-se que não existe associação significativa entre **Elisa > 0,300** e a **IC (p=0,076)**, ao nível de 5%. Isto significa que a proporção de Elisa > 0,300 não



difere significativamente entre os grupos miocardite (70%) e CMD não inflamatória (25%), nesta casuística.

#### 5.11 VERIFICAÇÃO SE EXISTÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO SIGNIFICATIVA ENTRE ELISA E O GRUPO IC.

A tabela 17 fornece a frequência e o percentual do Elisa segundo o grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de qui-quadrado.

Esta análise tem por objetivo verificar se os dois grupos (IC e controle) são estatisticamente diferentes sob o ponto de vista do Elisa alterado, ou seja, se a proporção de Elisa alterado difere significativamente entre os dois grupos.

**Tabela 17: Elisa > 0,300, IC e Grupo Controle**

Elisa	Grupo		
	IC	Controle	Total
Frequência			
Col Pct			
> 0.300	9 50.00	9 45.00	18
≤ 0.300	9 50.00	11 55.00	20
Total	18	20	38

Observou-se que não existe associação significativa entre o Elisa > 0,300 e o grupo ( $p=0,750$ ). Isto significa que a proporção de Elisa 0,300 não difere significativamente entre os grupos IC (50%) e controle (45%), nesta casuística.

O anticorpo anti-β1-EC II esteve presente em 70% dos pacientes com miocardite (Grupo II) e 25% com CMD (Grupo I)  $p=0,07$ . Foram encontrados títulos mais elevados do anticorpo anti-β1-EC II na miocardite, havendo uma diferença significativa na titulação pelo ELISA ( $p=0,03$ ). Comparando o grupo miocardite com o grupo controle, observamos títulos mais elevados de anticorpos na miocardite,  $p=0,03$ , sugerindo uma resposta auto-imune anormal na miocardite.

## 6 DISCUSSÃO

Desde as primeiras descrições sobre AC circulantes anti-beta-1-adrenorreceptor na CMD, vários grupos têm investigado as implicações funcionais das anormalidades auto-imunes relacionadas nos receptores miocárdicos sobre desenvolvimento e/ou curso da doença. Entretanto, dependendo dos critérios de seleção e dos métodos imunológicos empregados, a prevalência e/ou o impacto funcional de tais AC podem apresentar-se diferentes.<sup>55</sup>

Alguns estudos, que utilizam AC reagindo com peptídeos sintéticos derivados de receptores beta-adrenérgicos ou afetando as funções dos beta-receptores mediadas em células animais, têm sido feitos. A prevalência varia de 30 % a 95 % dos pacientes e, entre indivíduos normais, 0 % a 16 %.<sup>49</sup>

De acordo com estudos prévios, foi achada alta prevalência (51%) de anticorpos diretamente contra vários domínios sintéticos  $\beta$ -receptores quando se teve por base o peptídeo similar, quando o ELISA foi testado. Entretanto, muitos desses anticorpos são inespecíficos, eles não reagem com receptores  $\beta$ -adrenérgicos nativos e não têm nenhum efeito na função de receptores. Somente a metade desses anticorpos detectados liga-se a fragmentos do receptor, e também reconhecem e se acoplam à membrana do receptor  $\beta$ -adrenérgico, ligando-se diretamente ao domínio da segunda alça extracelular, sugerindo induzir a ativação do  $\beta$ -receptor.<sup>51 63</sup>

Wallukat e col. postulam a influência dos auto-AC no metabolismo e contratilidade miocárdica e auto-AC anti  $\beta$ -1 AR, que se têm mostrado capazes de aumentar inotropismo e cronotropismo cardíaco espontâneo em miócitos cardíacos de ratos neonatais. Esses reagentes bivalentes poderiam exercer um efeito agonista, por induzir ou estabilizar dímeros receptores, levando a uma contínua ativação do sistema adrenérgico.<sup>8</sup>

Diferentes estudos têm mostrado a presença do AC anti- $\beta$ 1 adreno-receptor em pacientes com graus mais avançados de disfunção ventricular esquerda em relação a pacientes com AC negativos.<sup>55</sup> Neste trabalho não foram encontradas diferenças entre o grau de disfunção ventricular e idade. A prevalência e os títulos de auto-AC em doenças auto-imunes comumente declinam com o tempo, e é possível que alguns estudos tenham sido dirigidos para fases em que a doença estivesse mais estável, podendo-se realmente subestimar a frequência verdadeira dos auto-AC.<sup>51</sup>

Outros trabalhos avaliaram o teste funcional dos batimentos cardíacos espontâneos em miócitos de ratos neonatais, com soro de portadores de CMD com anticorpos positivos, ou a afinidade purificada do AC receptor beta-1, ocorrendo o aumento da frequência cardíaca em miócitos isolados *in vitro*. Esses trabalhos sugerem que a estimulação AC mediada no beta-1 receptor, observada *in vitro*, poderia ocorrer *in vivo* e poderia estar envolvida com o declínio da função sistólica ventricular em pacientes com miocardite e CMD.<sup>5</sup>

Anormalidades na imunidade humoral e celular têm sido descritas na miocardite e CMD. Um episódio de necrose dos miócitos induz a ocorrência de reações imunes, podendo resultar em fibrose como um fenômeno comum na CMD. Ao longo desses anos, têm se identificado diferentes auto-anticorpos cardíacos em pacientes com miocardite e CMD. Entretanto, existe dúvida sobre serem esses AC diretamente patogênicos ou meramente representarem marcadores humorais da imunidade. Logo, alguns AC podem em parte representar apenas um repertório imunológico normal, nem sempre patogênico.<sup>8</sup>

Estimulo crônico da atividade do beta-receptor cria um círculo vicioso chamado de super-estimulação adrenérgica, promovendo manifestações crônicas de IC. Então AC, que estabiliza o receptor ativo e sensibiliza o sistema beta adrenérgico para catecolaminas, poderia causar efeitos a longo prazo na IC, suportando a evidência da alta prevalência de AC na CMD e associação com severa disfunção ventricular, e com pior prognóstico.<sup>51,55,63,64</sup>

A auto-imunidade tem sido discutida como importante mecanismo na patogênese da CMD idiopática. O processo auto-imune poderia ser estimulado por diversas causas, desde a lesão miocárdica até o insulto de infecção viral. O mimetismo molecular entre as proteínas virais e moléculas cardiopáticas endógenas

pode estimular a patogenia de auto-reatividade específica do coração e a produção de quantidade acentuada de auto-AC, tendo como alvo os antígenos cardíacos.<sup>65,66</sup>

Portadores de IC com auto-AC positivos têm sido beneficiados com a técnica de imunoadsorção. É um novo método terapêutico que promove a remoção de auto-anticorpos; é capaz de interferir no estado imuno-inflamatório sistêmico e miocárdico, ocasionando melhora dos parâmetros funcionais, e de induzir remodelamento cardíaco reverso. Essa nova técnica, ainda experimental, necessita de estudos fase III direcionados para desfechos clínicos robustos, tais como mortalidade e redução de hospitalizações por IC para sua incorporação na prática clínica.<sup>8,14,67,68</sup>

A determinação do papel fisiopatológico dos auto-anticorpos contra estruturas da membrana cardíaca, proteínas de receptor e antígenos intracelulares, pode ter implicações e levar a novas terapias, como a imunoadsorção na CMD. O nosso estudo identificou a presença do anticorpo anti-  $\beta$ 1-EC II na IC e com titulações mais elevadas na miocardite, abrindo perspectivas para novas investigações e avaliação para o estudo funcional desses AC.

## 7 LIMITAÇÃO DO TRABALHO

Uma das limitações do presente estudo é o tamanho pequeno da amostra, a não-avaliação funcional e ao grupo-controle sem IC - que era significativamente mais jovem em relação aos pacientes portadores de IC, podendo ter influenciado nos valores obtidos para os auto-anticorpos.

## 8 COCLUSÃO

Os níveis dos títulos do anticorpo anti-  $\beta$ 1-EC II foram mais elevados no Grupo da Miocardite, em relação ao Grupo CMD não Inflamatória.

Comparando o Grupo da Miocardite com o Grupo controle observamos títulos mais elevados anticorpo anti-  $\beta$ 1-EC II na miocardite.

Não houve diferença dos níveis do anticorpo anti-  $\beta$ 1-EC II entre o Grupo controle e o Grupo da CMD não inflamatória.

O presente estudo identificou a presença do anticorpo anti- $\beta$ 1-EC II na IC e com titulações mais elevadas no grupo da miocardite, mostrando uma resposta imunológica anormal neste grupo

**Screening para anticorpos anti o2  $\beta_1$  AR no soro de pacientes com ICC e grupo controle. Diluição dos soros de 1:200**

Caso	Grupo		$^{\circ}$ D.2- $\beta_1$ AChR	Média	O.D.BSA	Média	O.D <sub>i</sub> -O.D <sub>i</sub>
1	ICC	MIO	3,2728	3,273	3,0468	3,047	0,226
2	ICC	MIO	3,3773	3,377	3,0779	3,078	0,299
3	ICC	CMD	3,7013	3,701	3,5826	3,583	0,119
4	ICC	MIO	3,2014	3,201	2,7657	2,766	0,436
5	ICC	CMD	3,3666	3,367	2,5852	2,585	0,781
6	ICC	MIO	3,6637	3,664	3,1348	3,135	0,529
7	ICC	CMD	3,7476	3,748	3,0629	3,063	0,685
8	ICC	CMD	3,626	3,626	3,5337	3,534	0,092
9	ICC	CMD	2,0653	2,065	2,1335	2,134	-0,068
10	ICC	CMD	3,0468	3,047	3,0278	3,028	0,019
11	ICC	CMD	3,702	3,702	3,5961	3,596	0,106
12	ICC	MIO	2,2867	2,287	2,1205	2,121	0,166
13	ICC	MIO	3,287	3,287	2,7341	2,734	0,553
14	ICC	CMD	3,6207	3,621	3,5126	3,513	0,108
15	ICC	MIO	3,4177	3,418	3,0278	3,028	0,390
16	ICC	MIO	3,6249	3,625	3,232	3,232	0,393
17	ICC	MIO	4	4,000	2,9593	2,959	1,041
18	ICC	MIO	3,6899	3,690	2,3728	2,373	1,317
19	Controle		3,4394	3,439	3,2629	3,263	0,177
20	Controle		3,4689	3,469	3,1549	3,155	0,314
21	Controle		3,6007	3,601	3,1354	3,135	0,465
22	Controle		3,7092	3,709	3,3276	3,328	0,382
23	Controle		3,1931	3,193	2,8585	2,859	0,335
24	Controle		3,5267	3,527	3,3077	3,308	0,219
25	Controle		3,1432	3,143	2,9135	2,914	0,230
26	Controle		3,4799	3,480	3,052	3,052	0,428
27	Controle		3,6644	3,664	3,6162	3,616	0,048
28	Controle		3,6902	3,690	3,6379	3,638	0,052
29	Controle		3,7223	3,722	3,645	3,645	0,077
30	Controle		3,3878	3,388	2,841	2,841	0,547
31	Controle		3,6467	3,647	3,4786	3,479	0,168
32	Controle		3,7418	3,742	3,3067	3,307	0,435
33	Controle		3,6597	3,660	3,3001	3,300	0,360
34	Controle		3,6655	3,666	3,5518	3,552	0,114
35	Controle		3,6145	3,615	3,146	3,146	0,469
36	Controle		3,8056	3,806	3,5674	3,567	0,238
37	Controle		3,698	3,698	3,4658	3,466	0,232
38	Controle		3,4884	3,488	3,3785	3,379	0,110

## 7. Referências:

1. Richardson P, Mekenna WJ, Briston M, et al. Report of the 1995 WHO/ISFC Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93:841-842
2. Thiene G, Carrado D, Basso C. Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification? *Eur Heart J* 2004;25:1772-1775
3. Brown AC, O'Connell BJ. Miocarditis and Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Am J Medicine* 1995;99:309-314
4. Parrilo E J. Inflammatory Cardiomyopathy (Miocarditis) *Circulation* 2001;104(1):4
5. Caforio PLA, Mahon JN, Tossa F, Mckenna JW. Circulation cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenic and clinical significance. *Eur J Heart Failure* 2002;4:411-417
6. Rose RN, Hill LS. Autoimmune myocarditis. *Inter J Cardiol* 1996;54:171-175
7. Noutsias M, Pouschinger M, Schultheiss HP, Kuhl U. Advances in the immunohistological diagnosis of inflammatory cardiomyopathy. *Eur Heart J Supplementes* 2002;4 (Supplement I) 154-162
8. Felix BS, Staudt A, Boumann G. Imunoadsorption as a new therapeutic principle for treatment of dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J Supplementes* 2002-4 (Supplement I) 163-168
9. McMullan RM, O'Connell BJ. Miocarditis: Diagnostic and Therapeutic Approaches. *ACC Current J Review Septembes/October* 1995
10. Afanasyera M, Georgakopoulos D, Rox NR, Autoimmune myocardis: cellular mediators of cardiac disfunction. *Autoimmun Re.* 2004 Nov;3(7-8):476-489
11. Liu PP, Mason WJ. Advances in the understanding of Myocarditis. *Circulation* 2001;104:1076-1082
12. Mason WJ. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: An inflammatory link. *Cardiovascular Research* 2003;60:5-10
13. Limas JC. Cardiac Autoantibodies in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 1997;95:1979-1980
14. Mann LD. Autoimmunity, Immunoglobulin Adsorption and Dilated Cardiomyopathy: Has the Time Come for Randomized Clinical Trials? *J Am Coll Cardiol* 2001;38:184-186
15. Magnusson Y, Hjalmarsan A, Hoebeke J.  $\beta$ 1-Adrenoreceptor autoimmunity in cardiomyopathy. *Inter J Cardiol* 1996;54:137-141
16. Freedman JN, Lefkowitz JR. Anti- $\beta$ 1-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *The Journal of Clinical Investigation.* 2004;113(10):1379-1382
17. Wallukat G, Wollenberger . Effect of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic  $\beta$ -adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed Biochin Acta.* 1987;46: 634-639
18. Janhns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermam EC, Erth G, Lohse JM.. Direct evidence for a  $\beta$ 1-adrenergic receptor directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 2004;113 (10):1419-1429
19. Davies MJ. The cardiomyopathies: an overview. *Heart* 2000;83:469-475
20. Maish B, Ristic DA, Hufnagel G et al. Dilated cardiomyopathies as a cause of congestive heart failure. *Herz.* 2002; 27, n° 2:113-134
21. Pankuweit S, Ruppert V, Maish B. Inflammation in Dilated Cardiomyopathy. *Herz* 2004; 29(8):788-793
22. Maisch B, Richter A, Sandmüller A, Portig I, Pankuweit S. Inflammatory Dilated Cardiomyopathy (DCMI). *Herz* 2005;30, n°6, 535-544.
23. Fu M, Matsui S. Is cardiomyopathy an autoimmune disease? *Keio J. Med.* 2002, Dec;51(4): 208-212
24. Robert C, Schlant. The cardiomyopathies and myocarditis. *ACC Current J Review.* 1998; Vol 7; Issue 3;36-41
25. Burkett LE, Hershberger ER. Clinical and Genetic Issues in Familial Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:969-81



26. Castro BA, Monserrat L, Hermida M. Familial Dilated Cardiomyopathy: Current Status and Clinical Benefits of Basic Research. *Rev. Esp. Cardiol.* 2003;56(supl.1):7-12
27. Hjalmarson A, Fu M, Mobini R. Who are the enemies? Inflammation and autoimmune mechanisms. *Eur Heart J Supplements* 2002;4(Suppl.G):G27-32
28. Uwe K, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, et al. High Prevalence of Viral genomes and Multiple Viral Infections in the Myocardium of Adults with "Idiopathic" Left Ventricular Dysfunction. *Circulation* 2005;111:887-893
29. Wojnicz R, Nowalany-Kojielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, et al. Randomized, Placebo-Controlled Study for Immunosuppressive Treatment of Inflammatory Dilated Cardiomyopathy: Two-Year Follow-Up Results. *Circulation* 2001;104:39-45
30. Liu P, Lee P, Fuse K, Nian M. Molecular pathophysiological mechanisms in virus infected host myocardium. *Eur Heart J Supplements* 2002;4(Suppl. I): 137-141
31. Anker DS, Haehling VS. Inflammatory Mediators In Chronic Heart Failure: an Overview. *Heart* 2004;90:464-470
32. Borda SE, Sterin-Borda L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Inter J Cardiol* 1996;54:149-156
33. Feldman MA, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 2000;343(19):1388-1398
34. Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, Kapp FJ, Schultheiss PH.. Diagnosis and treatment of patients with virus induced inflammatory cardiomyopathy. *Eur Heart J Supplements* 2002;4 (Suppl. I):173-180
35. Matsumori A, Yamada T, Sasayama S. Antimyosin antibody imaging in clinical myocarditis and cardiomyopathy: principle and application. *Inter J Cardiol* 1996;54:183-190
36. Lipiguel AC, Junior SJ. Valor da cintilografia miocárdica com gálio-67 na abordagem de pacientes com febre reumática. *Revista Socesp* 2005;vol.15-nº1-jan/fev.
37. Liu PP, Yan TA. Cardiovascular Magnetic Resonance for the diagnosis of Acute Myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1823-1825.
38. Abdel-Arty H, Boyé P, Zagrosek A, Wassmuth R, Kumar A, Messroghli D, Bock P et al. Diagnostic Performance of Cardiovascular Magnetic Resonance in Patients With Suspected Acute Myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1815-1822
39. Vaz MN, Pordeus V. Visita á Imunologia. *Arq Bras Cardiol* 2005;45:1815-1822
40. Mann DL. Inflammatory Mediators and the failing Heart. *Cir Res* 2002;91:988-998
41. Caforio PLA, Goldman HJ, Haven JA, Baig MK, McKenna. Evidence for autoimmunity to myosin and heart-specific autoantigens in patients with dilated cardiomyopathy and their relatives. *Inter J Cardiol* 1996;54:157-168
42. Caforio PLA., Goldman HJ, Baig KM, Haven JA, Libera DL, et al. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression. *Heart* 1997;77:62-67
43. Fu XLM. Anti-M2 muscarinic receptor autoantibodies and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Inter J Cardiol* 1996 ;54:127-135
44. Baba A, Yoshikama T, Fukuda Y, Sugiyama T, Shimada M, Akaishi M, et al. Autoantibodies against M2-muscarinic acetylcholine receptors: new upstream targets in atrial fibrillation in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2004;25:1108-1115
45. Dobrev D, Christ T, Ravens U. Muscarinic subtype- 2 receptor autoantibodies: actors or bystander in human atrial fibrillation? *Eur Heart J* 2004;25(13):1091-1092
46. Wallukat G, Muller J, Podlowski S, Nissen E, Morwinski R, et al. Agonist-like beta-Adrenoreceptor Antibodies in Heart Failure. *Am J Cardiol* 199;83:75H-79H
47. Pinto JW, Cardoso GMS, Areas M. Fisiologia dos Adrenoreceptores Cardíacos. *Ciênc Méd* 2005;14(1):77-96
48. Dorn WG, Molckentin DJ. Manipulating Cardiac Contractility in Heart Failure. Data From Mice and Men. *Circulation* 2004;109:150-158
49. Janhs R, Boivin V, Siegmund C, Inselmann G, Lohse JM, Boege F. Autoantibodies Activating Human  $\beta$ 1-Adrenergic Receptors Are Associated With Reduced Cardiac Function in Chronic Heart Failure. *Circulation* 1999;99:649-654

50. Staudt Y, Mobini R, Fu M, Felix BS, Kühn PJ, Staudt A.  $\beta$ 1-Adrenoreceptor antibodies induce apoptosis in adult isolated cardiomyocytes. *Eur J of Pharmacology* 2003;466:1-6
51. Jahns R, Boivin V, Lohse MJ.  $\beta$ 1-adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med.* 2006;16:20-22.
52. Limas JC, Limas C, Kubo HS, Olivari MT. Anti-Beta-Receptor Antibodies in Human Dilated Cardiomyopathy and Correlation with HLA-DR Antigens. *Am J Cardiol* 1990;65:483-487
53. Neumann AD, Burek LC, Baughman LK, Rose RN, Herskowitz A. Circulating Heart-Reactive Antibodies in Patients With Myocarditis or Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:839-846
54. Podlowski S, Luther PH, Morwinski R, Müller J, Wallukat G. Agonistic Anti- $\beta$ 1-Adrenergic Receptor Autoantibodies From Cardiomyopathy Patients Reduce the  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor Expression in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Circulation*;98:2470-2476.
55. Jahns R, Boivin V, Siegmund C, Boege F, Lohse JM, Inselmann G. Activating beta-1-adrenoceptor antibodies are not associated with cardiomyopathies secondary to valvular or hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1545-1551
56. Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Mitamura H, Ogawa S. Autoantibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:418-424
57. Jahns R, Boivin V, Lohse MJ. Beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmunity as a cause of dilated cardiomyopathy in rats. *Int J Cardiol* 2006;112:7-14
58. Staudt A., Böhm M, Knebel F, Grosse Y, Bischoff C, Hummel A, et al. Potential Role of Autoantibodies Belonging to the Immunoglobulin G-3 Subclass in Cardiac Dysfunction Among Patients With Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 2002;106:2448-2453
59. Dörffel VW, Felix BS, Wallukat G, Brehme S, Bestvater K, Hofmann T, et al. Short-term Hemodynamic Effects of Immunoabsorption in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 1997;95:1994-1997
60. Felix BS, Staudt A, Dörffel VW, Stongl V, Merkel K, Pohl M, et al. Hemodynamic Effects of Immunoabsorption and Subsequent Immunoglobulin Substitution in Dilated Cardiomyopathy.- Three-Month Results from a Randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1590-1598
61. Müller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelshergger S, et al. Immunoglobulin Adsorption in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 2000;101:385-391
62. Staudt A, Schäper F, Stangl V, Plagemann A, Böhm M, Merkel K, et al. Immunohistological Changes in dilated Cardiomyopathy Induced by Immunoabsorption Therapy and Subsequent Immunoglobulin Substitution. *Circulation* 2001;103:2681-2686
63. Matsui S, Fu M. Pathological importance of anti-G-protein coupled receptor autoantibodies. *Int J Cardiol.* 2006;112:27-29.
64. Jane-wit D, Altuntas CZ, Johnson JM, et al.  $B_1$ -adrenergic receptor autoantibodies mediate dilated cardiomyopathy by agonistically inducing cardiomyocyte apoptosis. *Circulation.* 2007;116:399-410.
65. Mobini R, Maschke H, Waagstein F. New insights into the pathogenesis of dilated cardiomyopathy: possible underlying mechanisms and therapy. *Autoimmunity Reviews* 2004;3:277-284
66. Genetically determined myocarditis: clinical presentation and immunological characteristics. *Cur Opin Cardiol.* 2008;23:219-226
67. Felix SB, Staudt A. Non-specific immunoabsorption in patients with dilated cardiomyopathy: mechanisms and clinical effects. *Int J Cardiol.* 2006;112:30-33.
68. Staudt A, Felix SB. Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy. *Transfusion and Apheresis Science.* 2007;37:187-190





# 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](#)