

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina -Cardiologia

**Gradiente Imunoinflamatório Sérico em Pacientes
com Insuficiência Cardíaca**

Dissertação de Mestrado

Autor : Gabriel Leo Blacher Grossman

Orientadora : Profa. Dra. Nadine Clausell

Co-orientador: Dr. Luis Eduardo P. Rohde

Porto Alegre, dezembro de 1999

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande amor, Angela, inspiração de todos os momentos.

Aos meus pais, pelo exemplo e educação, fundamentais para as minhas conquistas.

À minha irmã, pelo carinho e amizade constantes.

Aos meus avós, por acreditarem em mim sempre.

À família Hunsche, pelo carinho e convívio enriquecedor.

À Prof. Dra. Nadine Clausell, pelo exemplo, paciência e dedicação fantásticos.

Ao Dr. Luís Eduardo Rohde, pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Dr. Jarbas Oliveira, por sua ajuda e dedicação.

Ao Drs. Jose Raudales e Leandro Zimmerman, pela cooperação durante a coleta dos dados.

Ao Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro, que me iniciou na vida acadêmica e sempre esteve ao meu lado.

Aos Drs. Eduardo Ludwig, César Graeff Santos, Roberto Ludwig e Paulo Carvalho, pela amizade e ensinamentos diários.

Aos meus amigos, pelas alegrias e pelo companheirismo.

À família Grinblat, por estar sempre ao meu lado.

À Candice Pasqualin e Andrea Biolo, por sua ajuda e dedicação.

Aos pacientes, que consentiram com o estudo.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

SINOPSE.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	v
INTRODUÇÃO	
1. Epidemiologia.....	1
2. Etiologia.....	1
3. Patogênese.....	2
4. Fisiopatologia.....	4
4.1 Modulação neuro-humoral e simpática.....	5
4.2 Modulação imunoinflamatória.....	9
4.2.1 Fator de necrose tumoral.....	11
4.2.2 Receptores solúveis do fator de necrose tumoral.....	15
4.2.3 Interleucina 6.....	16
4.2.4 Receptor solúvel da interleucina 2.....	18
5. Modulação imunoinflamatória – evidências clínicas	19
HIPÓTESE	23
OBJETIVOS.....	23
MATERIAL E MÉTODOS	
1. População em estudo.....	24
2. Delineamento.....	24
3. Seleção da amostra.....	24

3.1 Critérios de inclusão.....	24
3.2 Critérios de exclusão	24
3.3 Grupo controle.....	25
4. Procedimentos realizados	
4.1 Cateterização do seio coronário	25
4.2 Procedimentos no grupo controle	25
5. Análise das citoquinas	
5.1 Coleta das amostras	26
5.2 Método de dosagem sérica dos marcadores biológicos	26
6. Análise estatística	27
7. Considerações éticas	28
RESULTADOS	
1. Características clínicas da amostra	29
2. Concentração sérica das citoquinas	31
3. Correlação com fração de ejeção	35
DISCUSSÃO	39
1. Características clínicas da população estudada	40
2. Análise das citoquinas	
2.1 Fator de necrose tumoral	42
2.2 Receptores solúveis do fator de necrose tumoral	44
2.3 Interleucina 6 e receptor solúvel da interleucina 2	45
3. Correlação entre citoquinas e fração de ejeção	47
4. Limitações do estudo	48

5. Síntese	50
CONCLUSÕES	51
ESTUDOS FUTUROS	52
ANEXO I	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

SINOPSE

Introdução - Diversos estudos têm apontado que uma modulação imunoinflamatória possa desempenhar papel importante na fisiopatologia da insuficiência cardíaca, através da determinação de aumento dos níveis séricos de várias citocinas em pacientes com a síndrome. No entanto, o sítio da produção aumentada destas moléculas ainda não está claro.

Métodos - Foram estudados 18 pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV com fração de ejeção $\leq 35\%$ (47 ± 11 anos; 14/18 com etiologia não isquêmica) e 7 indivíduos controles (38 ± 9 anos). Foram analisadas as concentrações de TNF- α , seus receptores solúveis I e II, da interleucina 6 e do receptor solúvel da interleucina 2 pelo método de ELISA no sangue periférico e sangue do seio coronário de todos os indivíduos.

Resultados - Nos pacientes, as concentrações periféricas do TNF- α , e dos receptores solúveis I e II do TNF- α foram significativamente maiores do que nos indivíduos controles ($3,9 \pm 2,7$ vs. $0,6 \pm 1,9$ pg/ml, $p = 0,009$; 1477 ± 489 pg/ml vs. 965 ± 214 pg/ml, $p = 0,01$; 3149 ± 983 pg/ml vs. 1700 ± 526 pg/ml, $p = 0,001$; respectivamente). Apenas o TNF- α e a interleucina 6 apresentaram maior concentração periférica quando comparada ao sangue do seio coronário ($3,9 \pm 2,7$ vs. $2,7 \pm 2,1$ pg/ml, $p = 0,007$ e $4,5 \pm 2,8$ vs. $3,6 \pm 2,8$ pg/ml, $p = 0,01$, respectivamente) em pacientes com insuficiência cardíaca. Além disto, foi observada correlação inversa entre a concentração periférica do TNF- α ($r = - 0,5$, $p = 0,01$) e seus receptores solúveis I e II ($r = - 0,46$, $p = 0,02$ e $r = -$

0,59, $p = 0,001$, respectivamente) e a fração de ejeção, bem como a concentração no seio coronário dos receptores solúveis I e II do TNF- α e a fração de ejeção ($r = - 0,46$, $p = 0,02$ e $r = - 0,58$, $p = 0,002$, respectivamente).

Conclusões - A existência de maiores concentrações de TNF- α e interleucina 6 no sangue periférico do que no seio coronário em pacientes com insuficiência cardíaca sugere que a produção destas citocinas seja predominantemente periférica. O TNF- α e seus receptores solúveis I e II correlacionaram-se inversamente com a fração de ejeção.

ABSTRACT

Introduction – Several studies have indicated the presence of an immunoinflammatory modulation as playing an important role in the development of heart failure, through assessment of circulating levels of different cytokines in heart failure patients. However, the source of the production of these markers remains unclear.

Methods – Eighteen patients with heart failure, class III-IV and ejection fraction $\leq 35\%$ (47 ± 11 years; 14/18 non ischemic etiology), and seven control individuals (38 ± 9 years) were studied. Circulating levels of TNF- α , TNF- α soluble receptors I and II, interleukin 6 and interleukin 2 soluble receptor were measured by ELISA in the serum from a peripheral site and from the coronary sinus.

Results – Levels of TNF- α and TNF- α soluble receptors I and II from the peripheral site were higher in patients compared to controls (3.9 ± 2.7 vs. 0.6 ± 1.9 pg/ml, $p = 0.009$; 1477 ± 489 pg/ml vs. 965 ± 214 pg/ml, $p = 0.01$; 3149 ± 983 pg/ml vs. 1700 ± 526 pg/ml, $p = 0.001$; respectively). In patients with heart failure, TNF- α and interleukin 6 levels were higher in serum from the peripheral site compared to serum from the coronary sinus (3.9 ± 2.7 vs 2.7 ± 2.1 pg/ml, $p = 0.007$ and 4.5 ± 2.8 vs 3.6 ± 2.3 pg/ml, $p = 0.01$, respectively). Furthermore, TNF- α and TNF- α soluble receptors I and II in the serum from a peripheral site showed significant negative associations with ejection fraction ($r = - 0.5$, $p = 0.01$; $r = - 0.46$, $p = 0.02$ and $r = - 0.59$, $p = 0.001$; respectively), as well as

TNF- α soluble receptor I and II coronary sinus levels ($r = -0.46$, $p = 0.02$ and $r = -0.58$, $p = 0.002$; respectively).

Conclusion – The observation of increased concentrations of TNF- α and interleukin 6 in the serum from a peripheral site compared to the coronary sinus in heart failure patients suggests that these markers could be preferentially produced in the periphery. Also, levels of TNF- α and its soluble receptors were inversely correlated with ejection fraction.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes e indivíduos controles.

Tabela 2 - Concentrações séricas no sangue periférico e no seio coronário do TNF- α , dos receptores solúveis do TNF- α e da interleucina 6 nos pacientes com insuficiência cardíaca e no grupo controle.

Figura 1 - Comparação dos gradientes de TNF- α e seus receptores solúveis I e II entre pacientes e controles.

Figura 2 - Correlação da concentração sérica do TNF- α no sangue periférico e fração de ejeção em pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos controles.

Figura 3 - Correlação da concentração sérica do receptor solúvel II do TNF- α no sangue periférico e fração de ejeção em pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos controles.

Figura 4 - Correlação da concentração sérica do receptor solúvel II do TNF- α no sangue do seio coronário e fração de ejeção em pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos controles.

INTRODUÇÃO

1. Epidemiologia

A incidência e prevalência da insuficiência cardíaca continuam aumentando, bem como a sua morbi-mortalidade, apesar dos avanços terapêuticos. Após o início dos sintomas, os pacientes gradualmente deterioram e frequentemente necessitam hospitalização. A insuficiência cardíaca é a causa mais frequente de internações hospitalares por motivos cardiovasculares no Brasil, estimando-se que cerca de 150 milhões de reais sejam gastos anualmente para os cuidados com estes pacientes. No período de abril de 1998 a abril de 1999 ocorreram mais de 400.000 internações por insuficiência cardíaca no Brasil. (Ministério da Saúde- DATASUS). Sendo assim, um aspecto importante no manejo destes pacientes é a prevenção ou retardo da progressão da doença. Uma variedade de mecanismos são propostos na fisiopatogenia da insuficiência cardíaca e um melhor entendimento destes permitiria medidas terapêuticas mais eficazes, com impacto sócio-econômico importante.

2. Etiologia

A insuficiência cardíaca é uma síndrome e, como tal, pode ocorrer em consequência de anormalidades estruturais (congenitas ou adquiridas) que afetem as artérias coronárias, o pericárdio, o miocárdio ou as válvulas cardíacas.

A cardiopatia isquêmica, a hipertensão arterial, o *diabetes mellitus*, o uso excessivo de álcool, a doença de Chagas, as miocardites e as valvulopatias são as causas mais frequentes da insuficiência cardíaca relacionada ao débito cardíaco baixo. A insuficiência cardíaca por alto débito ocorre por outros mecanismos. Doenças sistêmicas que causam alto débito cardíaco, como anemia, hipertireoidismo, fístulas arterio-venosas adquiridas ou congênitas, beriberi ou doença de Paget, quando associadas a uma doença cardíaca subjacente, provocam um desequilíbrio entre a oferta e a necessidade sistêmica de oxigênio. Concomitantemente, existem causas que precipitam a descompensação da insuficiência cardíaca, entre elas arritmias, infecções sistêmicas, doenças associadas, embolia pulmonar ou simplesmente a má aderência ao tratamento proposto (1).

3. Patogênese

No final do século 19 e início do século 20, Virchow e outros pesquisadores identificaram as células como base estrutural dos tecidos e doenças, estimulando o estudo da anatomia patológica, na qual a importância da estrutura tecidual remodelada, mediada pela alteração do comportamento celular, foi reconhecida (2). A hipertrofia e a necrose miocárdica são alterações estruturais observadas em pacientes com insuficiência cardíaca e estão intimamente relacionadas à patogênese da mesma, decorrentes de estímulos externos, ocorrendo reparação e remodelamento de todo o sistema cardiovascular, promovendo alterações estruturais que provocarão a diminuição da performance cardíaca.

O desenvolvimento da hipertrofia ventricular constitui um dos principais mecanismos para a compensação da sobrecarga de volume ou pressão. O miócito hipertrofia-se, ocorre um

aumento da massa miofibrilar e da síntese de fatores de crescimento, bem como um aumento do colágeno, determinando fibrose intersticial e das artérias intramiocárdicas. Após um período inicial, a sobrecarga de volume ou pressão sobrepuja o aumento da massa cardíaca e ocorre a dilatação do coração. Após um período de melhora da função contrátil, ocorre lise das miofibrilas, aumento do número de lisossomas, distorção dos sarcoplasmas e fibrose. Além disso, a densidade de capilares e a reserva coronariana diminuem, provocando isquemia subendocárdica, o que contribui ainda mais para a deterioração da função cardíaca (sistólica e diastólica). Finalmente, a função do miócito se deteriora e a insuficiência cardíaca ocorre (3,4,5).

A necrose dos miócitos é outro componente importante na patogênese da insuficiência cardíaca. A necrose pode ser localizada, como ocorre no infarto do miocárdio, ou difusa, como consequência de miocardiopatia isquêmica, miocardiopatia dilatada idiopática, miocardites ou por agentes tóxicos, como álcool ou adriamicina. Independente da causa, ocorre sobrecarga dos miócitos remanescentes, com hipertrofia e deterioração da função, ocorrendo um ciclo vicioso. Concomitantemente, existe substituição do tecido necrótico por tecido fibroso, com consequente remodelamento ventricular e manutenção da integridade estrutural do ventrículo na ausência de miócitos, às custas de diminuição da performance cardíaca (2,3).

Além disto, ocorre um desarranjo da matriz extracelular do miocárdio, com consequente prejuízo da função ventricular sistólica e diastólica. As fibras de colágeno, que mantêm a estrutura miocárdica, organizando e harmonizando as linhas de força e tensão geradas pela contração cardíaca, sofrem um processo de desorganização, com degradação aumentada,

edema dos espaços intermusculares e maior acúmulo de colágeno tipo 1 em relação ao colágeno tipo 3, provocando deterioração da contratilidade e diminuição da complacência cardíaca (2,6,7). Recentemente, alguns autores sugeriram que uma família de enzimas colagenolíticas tornam-se ativadas quando há falência ventricular, denominadas metaloproteinases. Estas metaloproteinases são responsáveis pela degradação da matriz extracelular e sua ativação pode se dar, em parte, por ação de $\text{TNF-}\alpha$ e outras citocinas. Estas enzimas são controladas por um grupo de glicoproteínas que inibem sua ação, e em certas situações, facilitam a sua atividade. Todos estes fatores contribuem para o o remodelamento da matriz extracelular, processo complexo e ainda pouco conhecido, que finalmente está associado à progressão da doença e deterioração da síndrome clínica da insuficiência cardíaca (8,9,10).

4. Fisiopatologia

Nos últimos anos, vários autores procuraram encontrar uma explicação lógica e racional para integrar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na insuficiência cardíaca. Inicialmente, a observação de que pacientes com insuficiência cardíaca apresentavam maior retenção de sal e água decorrentes do fluxo renal anormal originou o modelo “cardiorenal” como explicação fisiopatológica para esta síndrome. Concomitantemente, a realização de medidas hemodinâmicas mais precisas evidenciou uma diminuição do débito cardíaco e aumento da resistência vascular periférica, determinando um modelo hemodinâmico para a insuficiência cardíaca. Embora estes dois modelos expliquem a apresentação clínica dos pacientes com insuficiência cardíaca, nenhum deles esclarece a progressão e deterioração gradual dos mesmos. Sendo assim, surgiu o interesse e a necessidade de buscar outros

mecanismos fisiopatológicos para um melhor entendimento destes aspectos. A partir de evidências já descritas na literatura, foi sugerido um modelo fisiopatológico neurohumoral e imunoinflamatório para a insuficiência cardíaca, no qual a expressão aumentada de diversas moléculas biologicamente ativas resulta na progressão da doença (8,11,12,13,14). A interação destes fatores fisiopatológicos determina a progressão mais ou menos agressiva da doença, com consequente piora da classe funcional.

A partir do evento índice, que marca a agressão inicial ao miocárdio, uma série de eventos fisiopatológicos ocorre, fazendo com que, clinicamente, a insuficiência cardíaca possa manifestar-se de várias formas. O paciente pode permanecer assintomático por vários anos, bem como apresentar limitação funcional grave, com incapacidade de realizar as tarefas mais simples. A classificação funcional criada pela *New York Heart Association* serve para diferenciar o estado funcional de cada paciente com insuficiência cardíaca, variando da classe I até a IV, de acordo com o comprometimento para a realização de tarefas que exigem mais ou menos esforço físico, determinando a terapêutica e o prognóstico dos pacientes. A classe I define os pacientes com doença cardíaca sem limitação funcional, a classe II com limitação leve, a classe III com limitação moderada e a classe IV com limitação para as atividades que exigem esforço mínimo ou mesmo em repouso (15).

4.1 Modulação neuro-humoral e simpática

A síntese de diversos neuro-hormônios está aumentada nos pacientes com insuficiência cardíaca em resposta às alterações hemodinâmicas que ocorrem nesta síndrome, com o objetivo de melhorar a perfusão de órgãos-alvo. Dentre esta, destaca-se o sistema renina-

angiotensina-aldosterona, que inicialmente exerce um efeito que visa a manutenção da homeostase circulatória devido à vasoconstrição periférica. A longo prazo este mecanismo torna-se deletério, já que induz a produção de angiotensina II inclusive no próprio miocárdio, promovendo fibrose, hipertrofia e remodelamento ventricular (16,17).

Diversos estudos *in vivo* sugerem que a angiotensina II provoca uma resposta trófica, tanto nos vasos sanguíneos como no coração, independente do seu efeito hemodinâmico. A hipertrofia cardíaca é frequentemente acompanhada por diferentes graus de fibrose. Em um estudo realizado em ratos, a infusão de baixas doses de angiotensina II induziu fibrose miocárdica, mesmo apenas dois dias após o início da administração. Neste estudo, foi sugerido que a fibrose ocorreria como consequência de necrose dos miócitos. Outros estudos demonstraram influência da angiotensina na musculatura lisa e fibroblastos de células vasculares (18). Mais especificamente, Crawford e colaboradores demonstraram a indução da expressão de fibronectina no coração de ratos após administração de angiotensina II, bem como atenuação da expressão após o uso de inibidor da enzima de conversão da angiotensina (18). Pfeffer e Pfeffer demonstraram que a administração de captopril em ratos, após a indução de infarto do miocárdio, atenuava o processo de remodelamento ventricular (19), o que provocou um maior interesse no estudo de inibidores da enzima de conversão após o infarto do miocárdio. A seguir, a partir de ensaios publicados na década de 80, foi demonstrado que agentes capazes de inibir a enzima de conversão da angiotensina diminuem a morbi-mortalidade de pacientes com insuficiência cardíaca (20,21,22). Mais recentemente, o bloqueio específico do receptor da angiotensina II com losartan, bloqueador do receptor AT1 da angiotensina, resultou em menor mortalidade quando comparado com enalapril (23), resultado não confirmado pelo ELITE

II, que envolveu aproximadamente 3000 pacientes e não demonstrou diferença entre losartan e enalapril (24). Todos estes estudos demonstram a importância da ação da angiotensina II em pacientes que apresentam infarto do miocárdio ou insuficiência cardíaca. A sua ação, provocando hipertrofia e fibrose miocárdica, induz o remodelamento ventricular, comprometendo a performance cardíaca. Além disto, recentemente o ensaio clínico RALES foi interrompido precocemente pois demonstrou que a associação de espironolactona, um bloqueador da ação da aldosterona, ao tratamento convencional com inibidores da enzima de conversão, diuréticos e digital, diminuiu a morbimortalidade de maneira importante em pacientes com insuficiência cardíaca. A hipótese mecanística é de que a angiotensina II não seja bloqueada completamente com o uso crônico de inibidores da enzima de conversão, e o benefício da espironolactona ocorreria por bloquear a aldosterona e inibir, de uma forma mais completa, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (25).

Outro mecanismo neurohumoral bem conhecido na insuficiência cardíaca é a ativação excessiva do sistema simpático, inicialmente com o objetivo de preservar a contratilidade ventricular, mas que a longo prazo promove o remodelamento ventricular por induzir necrose tecidual e apoptose. Além disso, pacientes com níveis elevados de noradrenalina apresentam pior prognóstico (26,27). No entanto, não está claro se estes níveis elevados são consequência da gravidade da doença ou se contribuem para a progressão da mesma, já que foi observado *in vitro* que a noradrenalina deprime a função contrátil e induz necrose. Quando foram analisados ventrículos de pacientes com miocardiopatia dilatada, evidenciou-se uma diminuição da densidade dos receptores beta e uma dessensibilização dos mesmos. O aumento das catecolaminas circulantes parece estar relacionado a esta

redução de receptores e diminuição de sensibilidade, existindo uma relação direta entre a gravidade da insuficiência cardíaca e as modificações dos receptores beta. Em pacientes com miocardiopatia dilatada, ocorre uma diminuição principalmente de receptores beta tipo 1 em relação aos receptores beta tipo 2. Embora não ocorra uma diminuição na densidade de receptores tipo 2, estes apresentam-se dessensibilizados, acarretando um efeito final semelhante (28,29).

Contrariando a idéia de que betabloqueadores poderiam ser deletérios em pacientes com insuficiência cardíaca pela ação inotrópica negativa, há mais de duas décadas foi proposto que a modulação desta atividade simpática com esta classe de fármacos poderia trazer benefícios em pacientes com insuficiência cardíaca. De fato, nos últimos anos vários estudos demonstraram melhora dos sintomas, da fração de ejeção e diminuição dos diâmetros cardíacos com o uso de betabloqueadores. Em 1993, Waagstein e colaboradores demonstraram que em pacientes com insuficiência cardíaca classe II e III, a administração de metoprolol diminuiu a necessidade de hospitalizações e indicações de transplante cardíaco, porém sem evidenciar diminuição da mortalidade (30). O ensaio clínico CIBIS, que avaliou o uso de bucindolol em pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV, demonstrou melhora da classe funcional e diminuição das descompensações clínicas, além de evidenciar redução da mortalidade em pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática (31). Já mais recentemente, em um ensaio utilizando carvedilol, betabloqueador não seletivo e vasodilatador com propriedades antioxidantes, foi demonstrada melhora da morbimortalidade, em níveis ainda não observados com nenhuma outra droga do arsenal terapêutico da insuficiência cardíaca (redução da mortalidade de 67% comparada ao grupo placebo) (32). Finalmente, um ensaio clínico envolvendo 3991 pacientes demonstrou

melhora da sobrevida com o uso de metoprolol em pacientes com insuficiência cardíaca classe II a IV (mortalidade em 1 ano de 7,2% vs 11% com o uso de placebo) (33). O conjunto destes estudos sugere a capacidade dos betabloqueadores em proteger o miocárdio dos efeitos deletérios da estimulação simpática excessiva, provavelmente por restaurar a densidade dos receptores beta e a resposta contrátil ao estímulo adrenérgico. (34).

4.2 Modulação imunoinflamatória

A modulação imunoinflamatória também tem sido relacionada à fisiopatologia da insuficiência cardíaca. Diversos estudos demonstraram atividade celular ou humoral em diversas formas de insuficiência cardíaca, bem como aumento na concentração sérica de diversos marcadores inflamatórios.

As citocinas são mediadores biológicos de origem inflamatória e têm sido encontrados em concentrações séricas elevadas em pacientes com insuficiência cardíaca. São moléculas proteicas de baixo peso molecular (15 a 30 kilodalton) sintetizadas por diferentes células, secundariamente à diversos estímulos (35). Agentes vasodepressores e inotrópicos negativos como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 apresentam concentrações elevadas em pacientes com insuficiência cardíaca, bem como os receptores solúveis do TNF- α e da interleucina 2. Estes mediadores indiretamente aumentam a expressão da enzima óxido nítrico sintetase induzível, aumentando a concentração de óxido nítrico, reduzindo a contratilidade cardíaca e promovendo efeitos tóxicos secundários à indução de apoptose. O aumento na formação de radicais livres secundário à disfunção

cardíaca causada por diferentes etiologias (estresse oxidativo) também induz a produção de óxido nítrico sintetase induzível, com consequente efeito inotrópico negativo. Estes eventos contribuem para o remodelamento ventricular, a deterioração da função contrátil, fibrose e hipertrofia do ventrículo esquerdo.

A origem da síntese destes mediadores inflamatórios ainda não é conhecida. Mann e Young propuseram que a expressão destas citocinas proinflamatórias seja secundária à mecanismos compensatórios na insuficiência cardíaca, como o aumento de catecolaminas circulantes ou de angiotensina II. Estes neurohormônios, quando produzidos em níveis elevados, produziram injúria tecidual e mionecrose, resultando na ativação de células mononucleares e aumento na produção destas citocinas pelos miócitos (35). Outros estudos demonstraram expressão de TNF- α no miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca que não apresentavam infiltrado inflamatório, sugerindo que o coração também possa produzir primariamente estes mediadores inflamatórios (36,37,38,39).

A produção periférica de citocinas em decorrência da ativação imunoinflamatória e disfunção endotelial é outra hipótese para explicar o aumento da concentração destes marcadores na insuficiência cardíaca. As evidências neste sentido estão crescendo, já que os níveis das citocinas parecem se correlacionar melhor com os sintomas subjetivos dos pacientes do que com a função ventricular esquerda (40).

Recentemente, um estudo de Niebauer e colaboradores sugeriu que a endotoxemia resultante do edema da mucosa intestinal nos pacientes com insuficiência cardíaca e consequente translocação bacteriana possa ser o gatilho da ativação imunoinflamatória

(41). Portanto, a ativação imunoinflamatória na insuficiência cardíaca parece ser multifatorial, não havendo consenso para definir a origem deste fenômeno.

4.2.1 Fator de necrose tumoral

Dentre os marcadores biológicos inflamatórios envolvidos na insuficiência cardíaca, o TNF- α tem sido a citocina mais estudada na busca de uma correlação entre a modulação imunoinflamatória e a fisiopatologia da insuficiência cardíaca. De maneira geral, a maior fonte celular de TNF- α é o macrófago ativado, embora uma variedade de diferentes tipos de células possam produzir esta citocina. Em condições basais, é produzida primariamente pelo timo, podendo também ter origem no rim, pâncreas, útero, tubas ovarianas e coração. O principal efeito deletério desta citocina no sistema cardiovascular em condições anormais é a depressão da função ventricular em consequência do aumento de produção de óxido nítrico induzido pela mesma (35,42). Em um estudo realizado por Bozkurt e colaboradores, a infusão crônica de TNF- α em ratos provocou depressão da função ventricular esquerda e dilatação do ventrículo esquerdo, efeitos revertidos parcialmente com a interrupção da infusão ou a administração de um antagonista desta citocina (43).

Levine e colaboradores foram os primeiros pesquisadores a demonstrar níveis elevados de TNF- α em pacientes com insuficiência cardíaca, correlacionando níveis desta citocina com a gravidade dos sintomas. Foram estudados 33 pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV, e foi evidenciado que em pacientes com níveis elevados desta citocina havia uma maior atividade de renina, menor concentração de sódio e caquexia mais intensa

(44). Outros estudos apresentaram resultados semelhantes, sendo que em uma população envolvendo pacientes do ensaio SOLVD e pacientes aguardando transplante cardíaco, foi demonstrada correlação da classe funcional e mortalidade com níveis elevados do TNF- α (45). Lommi e colaboradores avaliaram 44 pacientes com insuficiência cardíaca e demonstraram correlação dos níveis de TNF- α com gravidade dos sintomas e baixa capacidade funcional (46). Testa e colaboradores também demonstraram que os níveis de TNF- α se correlacionam com classe funcional da insuficiência cardíaca (47). Em um estudo envolvendo 38 pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática ou secundário à cardiopatia isquêmica, Aukrust e colaboradores demonstraram níveis elevados desta citocina quando comparados ao grupo controle, particularmente nos pacientes em classe funcional IV (48). Recentemente, Satoh e colaboradores demonstraram a presença de uma enzima conversora do TNF- α no miocárdio de pacientes com miocardiopatia dilatada. Esta enzima resulta na produção de uma enzima funcional que transforma o precursor desta citocina na sua forma ativa. Neste estudo, identificou-se uma correlação entre os níveis desta enzima e a expressão do TNF- α , bem como com a gravidade da doença (49).

O estudo realizado por Lommi e colaboradores, citado anteriormente, teve como objetivo correlacionar variáveis hemodinâmicas, neuroendócrinas e metabólicas com níveis de citocinas circulantes em 44 pacientes com insuficiência cardíaca moderada ou grave. Não foi encontrada correlação entre TNF- α e variáveis hemodinâmicas ou concentração de noradrenalina (46). Koller-Strametz e colaboradores demonstraram correlação modesta entre as concentrações desta citocina e níveis de noradrenalina e endotelina em 65 pacientes com insuficiência cardíaca classe II a IV (40). Esta correlação não foi

demonstrada no grupo estudado no ensaio SOLVD. Novamente, nestes estudos, a provável origem da síntese destas moléculas não foi investigada.

Como foi citado anteriormente, Niebauer e colaboradores sugeriram que a endotoxemia resultante do edema intestinal e translocação bacteriana em pacientes com insuficiência cardíaca possa ser o gatilho para a produção aumentada de citocinas (41). No entanto, a produção periférica de TNF- α , embasada pelo fato desta citocina correlacionar-se com sintomas e quadro clínico de insuficiência cardíaca mais grave e perfusão periférica diminuída, torna-se uma hipótese tentadora (40). A produção de TNF- α diretamente pelo miocárdio é outra hipótese que não pode ser descartada, pois o excesso de catecolaminas circulantes pode provocar injúria direta dos miócitos, induzindo a síntese desta citocina primariamente pelo músculo cardíaco (35). Vários estudos demonstraram expressão aumentada de TNF- α e TNF- α mRNA em corações com disfunção ventricular. Satoh e colaboradores analisaram biópsias endomiocárdicas de 30 pacientes com miocardiopatia dilatada e evidenciaram, através de análise por imunohistoquímica e pela reação da polimerase em cadeia, expressão de TNF- α no miocárdio de pacientes. Este estudo não demonstrou apenas uma maior expressão desta citocina no miocárdio de pacientes com miocardiopatia dilatada, mas também no subgrupo com menor fração de ejeção (abaixo de 40%) e diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo maior ou igual a 45 mm (49). Finalmente, Wagner e colaboradores avaliaram amostras do miocárdio de 7 pacientes com insuficiência cardíaca em fase final que seriam submetidos a transplante cardíaco ou suporte mecânico de ventrículo esquerdo e evidenciaram, por imunohistoquímica, a expressão de TNF- α no músculo cardíaco (50).

A análise da concentração de TNF- α no seio coronário de pacientes com insuficiência cardíaca e a sua comparação com a concentração periférica pode ser outra maneira para sugerir a origem da produção desta citocina. Até o momento, apenas um estudo comparou concentrações desta citocina no seio coronário e sangue periférico de pacientes com insuficiência cardíaca. Munger e colaboradores avaliaram as concentrações séricas arteriais e no seio coronário de diversas citocinas, entre as quais o TNF- α . Foram analisados 78 pacientes com insuficiência cardíaca classe II a IV e não foi constatada diferença significativa na concentração arterial ou do seio coronário destas citocinas (51). Não há relato na literatura de outro estudo que compare a concentração periférica ou no seio coronário de citocinas em pacientes com insuficiência cardíaca. Vários estudos demonstraram maior concentração de citocinas no seio coronário em relação ao sangue periférico, porém, em outros contextos clínicos, como infarto do miocárdio, pós-cirurgia cardíaca ou transplante cardíaco (52,53,54,55). Apesar da tentativa de vários estudos em correlacionar níveis elevados de TNF- α com a ativação neuro-humoral, ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona ou de demonstrar o local principal de produção desta citocina, nenhum estudo demonstrou de forma irrefutável, até o presente momento, a origem da síntese desta citocina na cascata imunoinflamatória evidenciada nos pacientes com insuficiência cardíaca e a sua correlação, de maneira inequívoca, com outras variáveis.

4.2.2 Receptores solúveis do fator de necrose tumoral

O estudo sobre a biologia do TNF- α evoluiu muito nos últimos anos. Foi demonstrada a presença de dois receptores do TNF- α na superfície de várias linhagens celulares, inclusive miócitos. Estes receptores, de 55 e 75 kilodalton, foram denominados receptores solúveis I e II do TNF- α , respectivamente. Seus fragmentos se desprendem da superfície das células após a ação do TNF- α e podem ser detectados como forma solúvel no sangue e urina. Estas proteínas solúveis regulam a bioatividade do TNF- α , exercendo um papel inibitório aos efeitos deletérios desta citocina sobre o músculo cardíaco. *In vitro*, foi demonstrado que os receptores solúveis podem bloquear e até mesmo reverter os efeitos inotrópico-negativos do TNF- α . Entretanto, também especula-se que estes receptores estabilizem o TNF- α , aumentando a sua biodisponibilidade e conseqüentemente seus efeitos cardiovasculares (56).

Independente da metodologia utilizada, existe uma grande variação dos valores séricos de TNF- α intra e interpacientes. Como estes receptores solúveis provavelmente regulem a bioatividade do TNF- α , a medida dos mesmos pode demonstrar de maneira mais completa o papel desta citocina na insuficiência cardíaca (56). Ferrari e colaboradores evidenciaram o aumento destes receptores solúveis em pacientes com insuficiência cardíaca grave, sendo que o receptor solúvel II correlacionou-se com pior prognóstico nestes pacientes (56). Aukrust e colaboradores também demonstraram elevação dos níveis séricos dos receptores solúveis do TNF- α em pacientes com insuficiência cardíaca, particularmente nos pacientes mais graves. Neste estudo, foi evidenciada uma correlação negativa do receptor solúvel tipo

I do TNF- α e fração de ejeção, bem como correlação negativa dos dois receptores com o índice cardíaco (48). Outro estudo realizado por Torre-Amione e colaboradores (57) demonstrou, através da técnica de imunohistoquímica, a presença destes dois receptores solúveis em amostras de miocárdio normal. Neste mesmo estudo, foi demonstrado, em miócitos de gatos, que o efeito inotrópico negativo do TNF- α é mediado pelo receptor solúvel I, já que a ligação desta citocina com o receptor solúvel II não provocou alteração da motilidade celular. Portanto, existem evidências consistentes na literatura do aumento dos níveis séricos destes receptores nos pacientes com insuficiência cardíaca, bem como sua expressão no miocárdio. No entanto, ainda não está claro o mecanismo de ação destes receptores na cascata imunoinflamatória na insuficiência cardíaca. Finalmente, permanece desconhecida a origem tecidual desses receptores na insuficiência cardíaca.

4.2.3 Interleucina 6

Níveis elevados de interleucina 6 também foram demonstrados em pacientes com insuficiência cardíaca. Esta citocina medeia a resposta imunológica e inflamatória no organismo, sendo produzida por uma variedade de diferentes células, incluindo macrófagos, células T ativadas, células endoteliais e fibroblastos. A sua produção parece ser mediada em resposta ao TNF- α . O seu efeito principal em condições anormais é a depressão da função ventricular esquerda, já que esta citocina induz a expressão da enzima óxido nítrico sintetase induzível, aumentando a concentração de óxido nítrico (58). Existem evidências de que a interleucina 6 também exerça influência negativa na vasodilatação dependente do endotélio e esteja envolvida na deterioração muscular

periférica. Além disto, foi demonstrado *in vitro* que a secreção endotelial de interleucina 6 é aumentada pelo TNF- α e endotelina 1, um potente vasoconstritor, sugerindo que a produção local de interleucina 6 regule a resistência e permeabilidade vascular (59).

Testa e colaboradores avaliaram 80 pacientes com insuficiência cardíaca secundária à cardiopatia isquêmica ou hipertensão arterial sistêmica e demonstraram níveis elevados de interleucina 6 apenas em pacientes com insuficiência cardíaca classe IV (47). Lommi e colaboradores também demonstraram níveis elevados de interleucina 6 em pacientes com insuficiência cardíaca classe II a IV, havendo uma correlação com classe funcional, fração de ejeção, pressão capilar pulmonar e pressão do átrio direito. As anormalidades hemodinâmicas, particularmente a congestão venosa sistêmica, parecem ser importantes no controle da produção e liberação de interleucina 6 (46). Roig e colaboradores avaliaram 40 pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e demonstraram associação entre níveis mais elevados desta citocina e menor fração de ejeção, pior capacidade funcional e pior prognóstico. Neste trabalho foi demonstrada associação dos níveis de interleucina 6 e atividade da renina plasmática e do fator natriurético atrial (58). Recentemente, Aukrust e colaboradores também demonstraram níveis elevados de interleucina 6 em pacientes com insuficiência cardíaca quando comparados ao grupo controle, com um aumento progressivo da sua concentração diretamente relacionado à classe funcional dos pacientes. Neste mesmo estudo foi evidenciada uma correlação negativa entre a bioatividade desta citocina e a fração de ejeção dos pacientes (48). Tsutamoto e colaboradores avaliaram 100 pacientes com insuficiência cardíaca e evidenciaram um aumento da concentração desta citocina associada à gravidade da doença. Após análise multivariada, foi demonstrado que um nível elevado de interleucina 6 é um fator de mau prognóstico, independente da etiologia da

insuficiência cardíaca (59). Um aspecto interessante neste estudo foi a demonstração de uma diferença na concentração desta citocina entre o sangue arterial coletado da artéria femoral e o sangue venoso obtido da veia femoral dos pacientes, evidenciando-se uma maior concentração venosa de interleucina 6, o que sugere uma produção predominantemente periférica da mesma. Porém, apesar de diversos estudos demonstrarem níveis elevados de interleucina 6 em pacientes com insuficiência cardíaca, não existem evidências claras da origem da produção aumentada de interleucina 6 nos pacientes com insuficiência cardíaca.

4.2.4 Receptor solúvel da interleucina 2

O receptor solúvel da interleucina-2 é uma glicoproteína utilizada como índice da ativação das células T. Foram demonstrados níveis elevados desta glicoproteína em várias doenças autoimunes, evidenciando-se correlação com a gravidade do processo inflamatório.

Limas e colaboradores avaliaram 50 pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática, 30 pacientes com cardiopatia isquêmica e 22 indivíduos controles, e evidenciaram elevação do nível sérico do receptor solúvel da interleucina 2 em 38% dos pacientes com miocardiopatia dilatada e apenas em 6% dos pacientes com cardiopatia isquêmica, sugerindo que um mecanismo de ativação de células T pode contribuir para a progressão da doença. Cabe ressaltar que os dois grupos apresentavam as mesmas características hemodinâmicas (fração de ejeção abaixo de 30% e pressão capilar pulmonar acima de 20 mm Hg) e que o grupo com miocardiopatia dilatada que apresentava níveis elevados do

receptor solúvel apresentava doença mais avançada (60). Katz e colaboradores também demonstraram níveis séricos aumentados de interleucina 2 em 17 pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática (61). Por outro lado, pacientes com insuficiência cardíaca secundária a hipertensão arterial sistêmica ou cardiopatia isquêmica não apresentaram níveis elevados de interleucina 2 ou de seu receptor solúvel, indicando que a ativação de células T não parece desempenhar papel importante quando a insuficiência cardíaca é causada por cardiopatia isquêmica ou hipertensão arterial sistêmica (47) .

5. Modulação imunoinflamatória - evidências clínicas

O primeiro estudo que apresentou evidências que o controle da modulação imunoinflamatória diminuiu a morbimortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca foi publicado em 1993. Neste estudo, o uso de vesnarinona, droga inotrópica positiva que inibe a produção de TNF- α , diminuiu a mortalidade ou risco de piora da classe funcional em 50% nos pacientes com insuficiência cardíaca quando comparados ao grupo placebo (62,63). Ensaios subsequentes não confirmaram estes resultados e demonstraram efeitos deletérios desta droga (12).

Nos últimos anos, há uma tendência em dividir, do ponto de vista etiopatogênico, a miocardiopatia em isquêmica e não-isquêmica. Isto ocorre por haver evidências na literatura que sugerem que a miocardiopatia dilatada de origem isquêmica apresente fisiopatogenia e resposta terapêutica diferente da miocardiopatia dilatada não-isquêmica. Foi observada uma diferença no comportamento dos receptores beta 1 e 2 nestas duas diferentes formas de miocardiopatia dilatada, com possíveis implicações clínicas

importantes (64). Recentes estudos realizados por Matsumori e colaboradores determinaram maior concentração de TNF- α em pacientes com miocardiopatia não isquêmica quando comparados a pacientes com miocardiopatia isquêmica (65). Da mesma forma, três ensaios clínicos demonstraram diferente resposta terapêutica quando comparou-se pacientes com miocardiopatia dilatada isquêmica ou não isquêmica. O ensaio clínico PRAISE, que comparou amlodipina com placebo, não demonstrou aumento significativo da sobrevida de pacientes com miocardiopatia isquêmica, apresentando efeito protetor em pacientes com miocardiopatia não isquêmica. Mohler III e colaboradores mediram os níveis séricos de interleucina 6 em 62 pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV deste ensaio, antes e após 26 semanas da instituição do tratamento com amlodipina, e demonstraram diminuição dos níveis de interleucina 6 nestes pacientes, sugerindo um possível mecanismo protetor da amlodipina decorrente da redução desta citocina (66). O ensaio clínico argentino GESICA mostrou um efeito favorável da amiodarona quando comparado com placebo na sobrevida de pacientes com insuficiência cardíaca, ao contrário do CHF-STAT, que não demonstrou diferença significativa da sobrevida. A diferença fundamental é que no ensaio argentino havia um predomínio de pacientes com miocardiopatia dilatada não isquêmica, ao contrário do estudo americano, em que predominavam pacientes com cardiopatia isquêmica (67,68). Interessantemente, Matsumori e colaboradores demonstraram a capacidade da amiodarona em inibir a produção de TNF- α e interleucina 6 em células mononucleares periféricas de indivíduos saudáveis, estimuladas pela presença de lipossacarídeo (69). Este efeito imunomodulatório da amiodarona também poderia contribuir para seus efeitos benéficos em pacientes com insuficiência cardíaca.

Sliwa e colaboradores realizaram um estudo comparando 28 pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática recebendo pentoxifilina, um derivado das xantinas que inibe *in vitro* e *in vivo* a produção de TNF- α , ou placebo. Após 6 meses de tratamento, a proporção de pacientes com classe funcional I ou II era maior no grupo que recebeu pentoxifilina e a fração de ejeção era mais alta quando comparada ao grupo que recebeu placebo (38,7% vs 26,8%, respectivamente). Neste mesmo período, a concentração plasmática de TNF- α foi significativamente menor no grupo que recebeu pentoxifilina (70).

Recentemente, Deswal e colaboradores demonstraram a segurança e eficácia do uso de um bloqueador da atividade do TNF- α em pacientes com insuficiência cardíaca grave. Dezoito pacientes com insuficiência cardíaca classe III foram randomizados para receber etarnecept, um antagonista específico do TNF- α , ou placebo. O uso deste antagonista resultou na diminuição dos níveis de TNF- α , numa melhor qualidade de vida e maior fração de ejeção no grupo que recebeu etarnecept (71,72).

Portanto, estes achados sugerem que uma melhor compreensão e controle dos aspectos imunoinflamatórios otimizará e individualizará o tratamento dos pacientes com insuficiência cardíaca, além de criar alternativas terapêuticas, podendo refletir na evolução da doença.

Finalmente cabe salientar que a gravidade da insuficiência cardíaca não se correlaciona apenas com fração de ejeção, mas também com sintomas e classe funcional do paciente,

decorrentes do aumento da permeabilidade vascular e hipoperfusão tecidual periférica. Como vários estudos demonstraram níveis mais elevados de citocinas em pacientes com insuficiência cardíaca mais grave, deve-se considerar que a ação e talvez síntese predominantemente periférica das citocinas seja fundamental na deterioração progressiva e gradual dos pacientes com insuficiência cardíaca. Apesar de diversos estudos terem apontado que uma modulação imunoinflamatória possa desempenhar papel importante na fisiopatologia da insuficiência cardíaca, o sítio da produção aumentada destas moléculas ainda não está claro.

HIPÓTESE

Principal

A concentração periférica sérica do TNF- α , dos seus receptores solúveis I e II, do receptor solúvel da interleucina 2 e da interleucina 6 em pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV é maior do que a concentração no seio coronário dos mesmos.

Secundária

As concentrações séricas periféricas e do seio coronário destes marcadores imunoinflamatórios correlacionam-se de forma diferenciada com a fração de ejeção.

OBJETIVOS

Principal

Comparar a concentração sérica periférica do TNF- α , dos seus receptores solúveis I e II, do receptor solúvel da interleucina 2 e da interleucina 6 com a concentração sérica do seio coronário em pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV.

Secundária

Correlacionar os níveis séricos periféricos e coronarianos do TNF- α , dos seus receptores solúveis I e II, do receptor solúvel da interleucina 2 e da interleucina 6 com fração de ejeção em pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV e controles.

MATERIAL E MÉTODOS

1. População em estudo

Foram estudados 18 pacientes com insuficiência cardíaca oriundos do Ambulatório de Insuficiência Cardíaca do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre ou das unidades de internação clínica deste hospital e 7 indivíduos controles no período de janeiro de 1996 a setembro de 1998.

2. Delineamento - Estudo transversal

3. Seleção da amostra

3.1 Critérios de inclusão

Foram selecionados pacientes com insuficiência cardíaca de qualquer etiologia, classe III ou IV da New York Heart Association, com fração de ejeção abaixo de 35% estimada por estudo ecocardiográfico ou ventriculografia radioisotópica.

3.2 Critérios de exclusão

Excluíram-se os pacientes com síndrome coronariana aguda (infarto agudo do miocárdio, infarto não Q ou angina instável) nos últimos 6 meses ou que apresentassem doença infecciosa, neoplásica, inflamatória crônica, insuficiência renal ou hepática, síndrome de imunodeficiência ou uso de corticoterapia crônica .

3.3 Grupo controle

Constituiu-se de indivíduos submetidos a estudo eletrofisiológico para diagnóstico ou tratamento de taquiarritmias e de portadores de estenose mitral com indicação cirúrgica que não apresentassem hipertensão pulmonar.

4. Procedimentos realizados

4.1 Cateterização do seio coronário

Os pacientes com insuficiência cardíaca foram submetidos a cateterismo cardíaco direito após punção de veia jugular interna. O cateter foi introduzido até o seio coronário, realizando-se a coleta de 30 ml de sangue. A coleta de 30 ml de sangue de veia periférica foi realizada após o término do cateterismo direito.

4.2 Procedimentos no grupo controle

Os pacientes com indicação de estudo eletrofisiológico para diagnóstico ou tratamento de taquiarritmias foram submetidos ao procedimento conforme a técnica convencional, realizando-se a coleta das amostras conforme descrito acima. Os pacientes que realizaram cirurgia cardíaca foram submetidos à punção direta com coleta de sangue do átrio direito e coleta de sangue de veia periférica.

5. Análise das citoquinas

5.1 Coleta das amostras

A coleta de sangue para dosagem de citoquinas seguiu as seguintes normas:

Amostras de sangue do seio coronário e de veia periférica foram coletadas em frascos sem conservante para a dosagem do TNF- α , receptores solúveis I e II do TNF- α , interleucina 6 e receptor solúvel da interleucina 2. Imediatamente após a coleta, as amostras foram levadas ao Laboratório de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para centrifugação durante 20 minutos a uma velocidade de 2000 rotações por minuto. O soro obtido foi armazenado à -70°C para posterior análise conjunta.

5.2 Método de dosagem sérica dos marcadores biológicos

A dosagem sérica das citocinas foi realizada por ensaio enzimático imunoabsorvente quantitativo (ELISA) em conjuntos comercializados para uso em pesquisa (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA). Os valores esperados em indivíduos aparentemente saudáveis fornecidos pelo fabricante dos conjuntos de dosagem utilizados neste estudo são:

- TNF- α de não detectável até 3,62 pg/ml.
- Receptor solúvel I do TNF- α - 749 até 1966 pg/ml.
- Receptor solúvel II do TNF- α - 829 até 2262 pg/ml
- Interleucina 6 - 0,378 até 10,1 pg/ml
- Receptor solúvel da interleucina 2 - 676 até 2132 pg/ml

O método de ELISA consiste de uma reação imunoenzimática que envolve uma reação simultânea entre uma substância ou mediador presente na amostra ou solução padrão com anticorpos específicos pré-colocados na superfície das valetas das placas, formando uma ligação entre as duas substâncias (conjugado). O material que não se liga na reação é retirado por aspiração e lavagem. A quantidade de substância ligada em cada valeta é detectada através de uma reação com substrato específico por uma enzima, produzindo coloração proporcional à quantidade de conjugado da amostra ou solução padrão. O produto que adquire cor é quantificado por fotometria. A concentração presente em cada amostra é obtida pela interpolação dos resultados da densidade óptica da amostra em uma equação polinomial, gerada a partir da curva padrão, realizada com diferentes concentrações conhecidas da substância de interesse. A curva padrão e as análises das amostras foram executadas em duplicata para diminuir a variabilidade do método. A execução dos ensaios de ELISA para TNF- α , receptores solúveis I e II do TNF- α , interleucina 6 e receptor solúvel da interleucina 2 foi realizada no Laboratório de Pesquisa

do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo autor, com a supervisão técnica do Dr. Jarbas Oliveira, sob mascaramento, ou seja, sem conhecimento da identidade das amostras ou de sua origem.

6. Análise estatística

Os dados foram tabulados no programa EPI-INFO e analisados no Excel 4.0. As variáveis contínuas com distribuição normal são apresentadas como médias e desvio-padrão. Foi estabelecido como gradiente a diferença na concentração sérica de citocinas entre o sangue periférico e sangue do seio coronário (sp-sc). O teste *t* de Student foi utilizado para comparar as variáveis contínuas com distribuição normal e o teste de Wilcoxon para comparar as variáveis contínuas que não apresentaram distribuição normal. O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar as variáveis categóricas. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para correlacionar as variáveis com distribuição normal. Para todos os testes utilizados considerou-se estatisticamente significativo um $p < 0,05$.

7. Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os pacientes foram informados da finalidade do estudo e seus riscos, e após concordância verbal, assinaram termo de consentimento (ANEXO I).

RESULTADOS

1. Características clínicas da amostra

No período de janeiro de 1996 a setembro de 1998 foram selecionados 18 pacientes com insuficiência cardíaca e 7 indivíduos controles (5 pacientes submetidos a estudo eletrofisiológico para investigar ou tratar taquiarritmias e 2 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca devido a estenose mitral). Não houve exclusão de pacientes ou controles durante a seleção. Não foram observadas intercorrências na realização dos procedimentos nos 2 grupos. No momento da realização do estudo, 4 pacientes estavam hospitalizados e 8 apresentavam hipertensão arterial sistêmica em tratamento. A maioria dos pacientes apresentava etiologia não isquêmica para a insuficiência cardíaca (8 pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática, 3 com miocardiopatia alcoólica, 1 com miocardiopatia chagásica, 1 com miocardiopatia pós-parto e 1 paciente com miocardiopatia dilatada de etiologia valvular). As características clínicas dos 2 grupos são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes e indivíduos controles

	Pacientes	controles
n	18	7
idade (anos) *	47 ± 11	38 ± 9,5
sexo masculino (%)	57	83
fração de ejeção (%) †	21 ± 4	62 ± 11
etiologia da IC		
isq/não isq	4/14	-
classe funcional	3,47 ± 0,51	-
Drogas (n)		
Digoxina	18	
IECA	16	
Diuréticos	17	
Hidralazina	5	
Amiodarona	2	
Nitratos	8	

* p = 0,08; † < 0,001

IC= insuficiência cardíaca; isq= isquêmica; não isq= não isquêmica
 IECA= inibidores da enzima de conversão

2. Concentração sérica das citocinas

A concentração sérica de TNF- α no sangue periférico e seio coronário apresentou distribuição normal, tendo sido demonstrada uma maior concentração periférica desta citocina nos pacientes em relação ao grupo controle, não sendo demonstradas diferenças de concentração no seio coronário entre os dois grupos. As concentrações séricas dos receptores solúveis I e II do TNF- α no sangue periférico e seio coronário também apresentaram distribuição normal, tendo sido demonstrada uma maior concentração tanto periférica quanto no seio coronário destes marcadores nos pacientes em relação ao grupo controle.

A concentração periférica e no seio coronário de interleucina 6 apresentou distribuição normal, porém não houve diferença significativa entre pacientes e o grupo controle. Os níveis séricos do receptor solúvel da interleucina 2 não apresentaram distribuição normal e não foi demonstrada diferença significativa entre os pacientes e o grupo controle.

Quando avaliamos o gradiente (sangue periférico – seio coronário) destas citocinas nos pacientes com insuficiência cardíaca, foi demonstrada uma diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de interleucina 6 e TNF- α no sangue periférico em relação ao seio coronário.

Por outro lado, na comparação dos gradientes entre pacientes e controles, identifica-se diferença significativa apenas para os níveis de TNF- α (mediana de 0,86 para pacientes vs. -0,31 para controles, $p = 0,007$) (Figura 1), não sendo evidenciada significância estatística

na comparação entre gradientes de pacientes e grupo controle dos receptores solúveis do TNF- α , da interleucina 6 e do receptor solúvel da interleucina 2.

Os resultados descritos acima estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações séricas no sangue periférico e no seio coronário do TNF- α , dos receptores solúveis do TNF- α e da interleucina 6 nos pacientes com insuficiência cardíaca e no grupo controle.

Citoquinas	Pacientes	Controles	P
TNF- α			
sp	3,9 \pm 2,7	0,6 \pm 1,9	0,009
sc	2,7 \pm 2,1	1,2 \pm 2,4	0,14
gradiente	1,2 \pm 2,2 *	-0,6 \pm 0,9	0,007
TNF- α rs I			
sp	1477 \pm 489	965 \pm 214	0,014
sc	1486 \pm 492	959 \pm 127	<0,001
gradiente	-8,6 \pm 173	6,37 \pm 189	0,85
TNF- α rs II			
sp	3149 \pm 983	1700 \pm 526	0,001
sc	3234 \pm 982	1773 \pm 359	<0,001
gradiente	-85 \pm 349	-73 \pm 463	0,94
Interleucina 6			
sp	4,5 \pm 2,8	3,5 \pm 2,9	0,45
sc	3,6 \pm 2,3	3,3 \pm 3,0	0,84
Gradiente	1,0 \pm 1,4 †	0,5 \pm 0,9	0,47

sp = sangue periférico; sc = seio coronário; gradiente (sp-sc);

TNF- α rs I = receptor solúvel I; TNF- α rs II = receptor solúvel II;

* p = 0,007 para a comparação ente sp versus sc.

† p = 0,01 para a comparação ente sp versus sc.

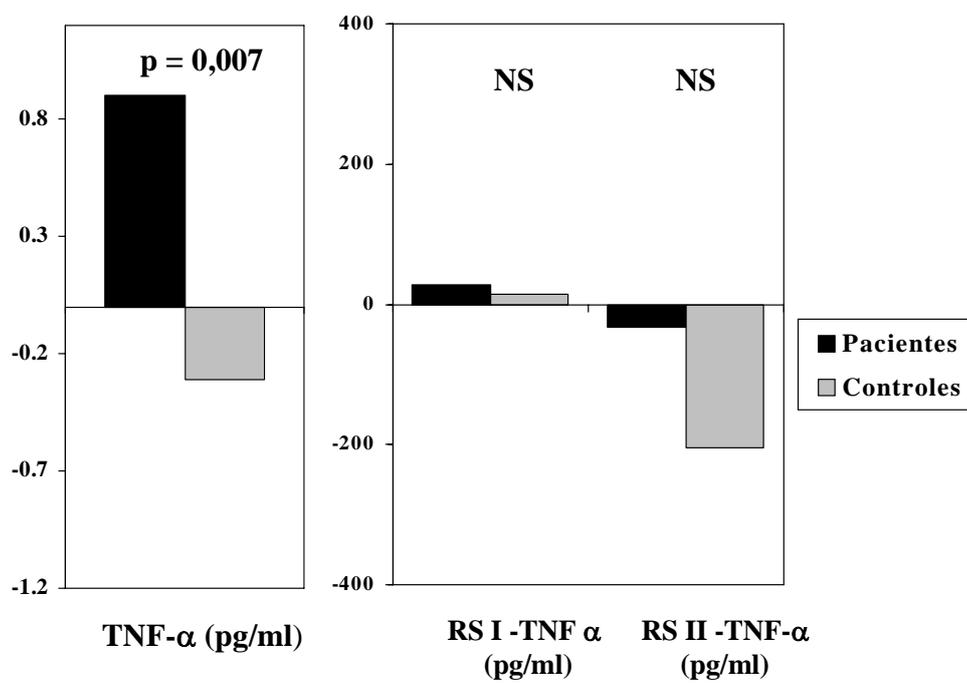


Figura 1 - Comparação dos gradientes de TNF- α e seus receptores solúveis I e II entre pacientes e controles. RS – receptor solúvel.

3. Correlação com fração de ejeção

Foi observada uma boa correlação inversa entre a concentração periférica de TNF- α e seus receptores solúveis I e II e a fração de ejeção dos pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos controles ($r = -0,5$, $-0,46$ e $-0,59$, respectivamente; todos $p \leq 0,02$). Já a concentração de TNF- α no seio coronário não demonstrou correlação estatisticamente significativa com fração de ejeção ($r = -0,36$; $p = 0,08$). No entanto, as concentrações no seio coronário dos receptores solúveis I e II do TNF- α apresentaram melhor correlação inversa com a fração de ejeção ($r = -0,46$, $p = 0,02$ e $r = -0,58$, $p = 0,002$, respectivamente). Não foram observadas correlações significativas entre interleucina 6 e receptor solúvel da interleucina 2 e fração de ejeção. Estes resultados estão apresentados nas figuras 2, 3 e 4.

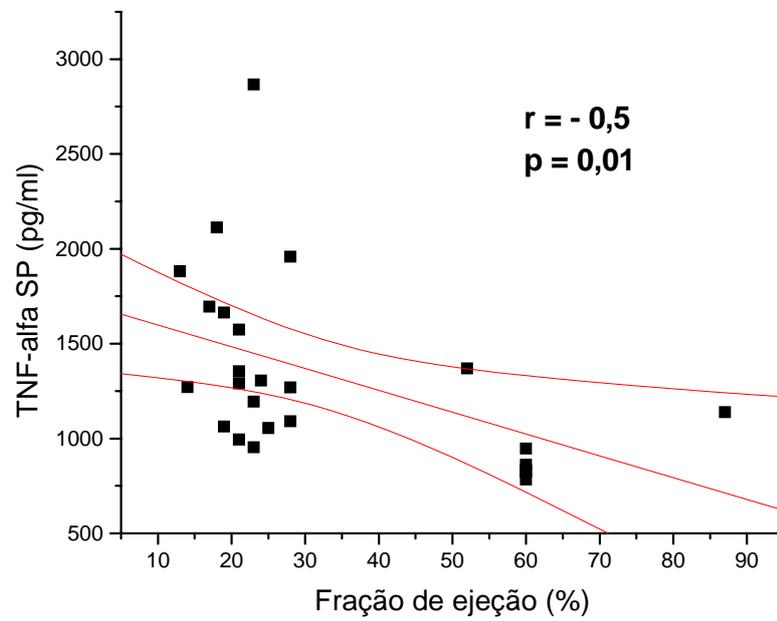


Figura 2 - Correlação da concentração sérica do TNF- α no sangue periférico e fração de ejeção em pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos controles. SP – sangue periférico

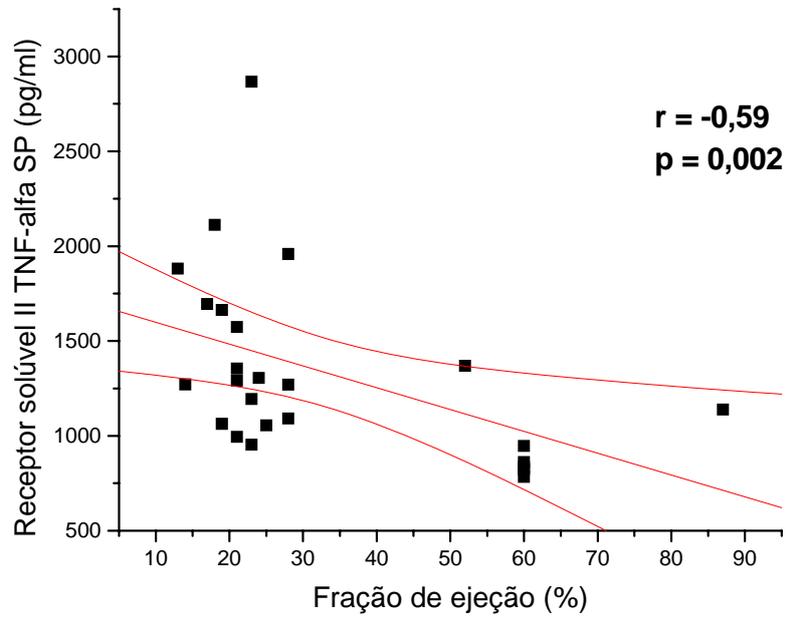


Figura 3 - Correlação da concentração sérica do receptor solúvel II do TNF- α no sangue periférico e fração de ejeção em pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos controles. SP – sangue periférico.

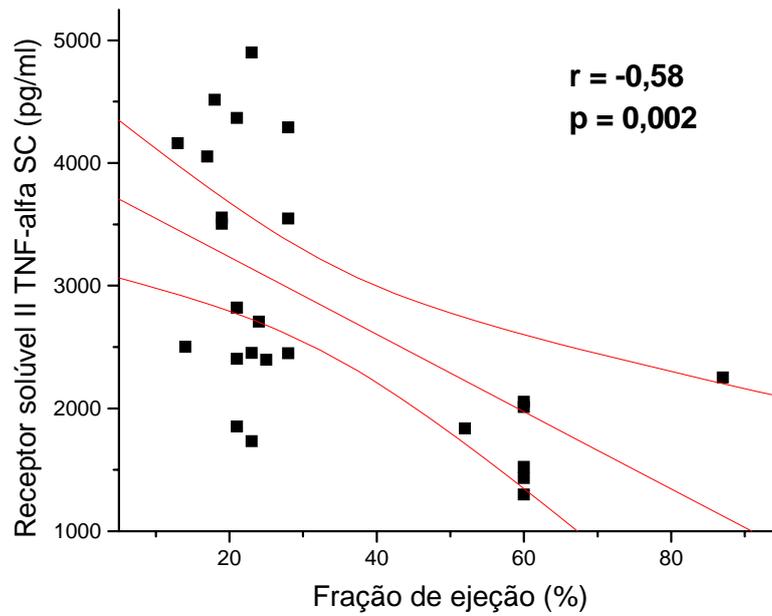


Figura 4 - Correlação da concentração sérica do receptor solúvel II do TNF- α no sangue do seio coronário e fração de ejeção em pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos controles. SC – seio coronário.

DISCUSSÃO

Apesar de clinicamente bem caracterizada, vários aspectos na fisiopatologia da insuficiência cardíaca ainda não são conhecidos. Nos últimos anos, a importância da modulação imunoinflamatória na doença cardíaca, e em especial na síndrome da insuficiência cardíaca foi reconhecida, o que proporcionou um grande avanço no conhecimento dos mecanismos biológicos básicos pelos quais mediadores imunoinflamatórios contribuem para a fisiopatologia desta síndrome. O maior interesse em entender o papel das citocinas em pacientes com insuficiência cardíaca está na observação de que vários aspectos desta síndrome podem ser explicados pelos efeitos biológicos destas moléculas e que as mesmas encontram-se em concentrações elevadas nestes pacientes (37,40,44,46,47,48,56,58,59,60,61).

Sendo assim, foi buscado neste estudo um melhor entendimento do perfil das citocinas na insuficiência cardíaca, e mais especificamente, o principal local de síntese das mesmas. Até o presente momento, não existem evidências inequívocas da principal fonte produtora destas moléculas no contexto da insuficiência cardíaca. A síntese direta pelo miocárdio como resposta à injúria tecidual (36,37,38,39), a produção periférica por hipoperfusão dos tecidos (40) ou a ativação do sistema imune secundária à translocação bacteriana pelo edema da mucosa intestinal (41) têm sido apontados na literatura como mecanismos prováveis para a ativação imunoinflamatória na insuficiência cardíaca.

Com o objetivo de determinar a origem da síntese destas citocinas na insuficiência cardíaca, neste estudo foram analisadas a concentração de TNF- α , seus receptores solúveis I e II, da interleucina 6 e do receptor solúvel da interleucina 2 no sangue periférico e no sangue do seio coronário de pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos controles. Apenas um estudo até o presente momento analisou o perfil imunoinflamatório da insuficiência comparando a concentração de citocinas nestes dois sítios (51). Os achados do atual estudo confirmam os dados da literatura, demonstrando uma maior concentração de TNF- α e seus receptores solúveis em pacientes com insuficiência cardíaca em relação a indivíduos controles. Além disto, foi possível demonstrar uma maior concentração de TNF- α e interleucina 6 no sangue periférico de

pacientes com insuficiência cardíaca em relação a concentração destas citocinas no seio coronário. Este gradiente pode sugerir que a principal origem da síntese das citocinas na insuficiência cardíaca seja periférica.

1. Características clínicas da população estudada

Neste estudo foram avaliados 18 pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV, sendo que quatorze destes apresentavam miocardiopatia dilatada de origem não isquêmica. A média da fração de ejeção foi de 21%. As características clínicas destes pacientes assemelham-se parcialmente com estudos envolvendo citocinas e insuficiência cardíaca. Porém, algumas diferenças devem ser consideradas. Estes estudos incluíram uma proporção maior de pacientes com miocardiopatia dilatada de origem isquêmica (44,47,48,56,59,60) e em classe funcional II (46,47,48,56,59). Com exceção do estudo realizado por Levine e colaboradores, a maior parte dos autores tem estudado pacientes com uma média de fração de ejeção maior do que 21%, variando de 26 a 39%. Portanto, diferentemente de vários outros estudos, no presente trabalho houve maioria de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia não-isquêmica, com classe funcional mais avançada e com menor fração de ejeção, indicando talvez uma população mais grave, o que pode influenciar de forma importante nos resultados. O uso de amiodarona, fármaco que pode modular a produção de TNF- α (69), apenas ocorreu em 2 pacientes, o que dificilmente pode ter interferido nos achados do presente estudo.

O grupo controle do presente estudo foi constituído de 5 pacientes submetidos a estudo eletrofisiológico para investigação de taquiarritmias e 2 pacientes que realizaram cirurgia por estenose mitral. A maioria dos estudos citados anteriormente compararam os resultados obtidos nos pacientes com insuficiência cardíaca com um grupo de indivíduos hígidos voluntários. No entanto, a coleta de sangue do seio coronário no presente estudo inviabilizou a seleção de indivíduos hígidos, já que a necessidade da realização de cateterismo cardíaco direito acrescenta um risco que contraindica, do ponto de vista ético, este procedimento. Optou-se então pela seleção de indivíduos que necessitassem cateterismo cardíaco direito ou cirurgia cardíaca e que não apresentassem sinais ou sintomas de insuficiência cardíaca e não preenchessem os critérios de exclusão. De toda forma, do ponto de vista conceitual, o grupo controle não pode ser considerado hígido, embora as

patologias envolvidas não devam apresentar, pelo menos em tese, ativação neuro-humoral ou imunoinflamatória.

2. Análise das citocinas

2.1 Fator de necrose tumoral

No presente estudo foi observada uma maior concentração de TNF- α no sangue periférico de pacientes com insuficiência cardíaca quando comparados com o grupo controle. Este achado confirma os resultados já descritos na literatura. Em 1990, Levine e colaboradores foram os primeiros a demonstrar uma maior concentração de TNF- α no sangue de pacientes com insuficiência cardíaca III ou IV (44). Nos anos subsequentes, diversos estudos demonstraram os mesmos resultados, inclusive, correlacionando concentrações desta citocina com variáveis clínicas, neurohumorais e mortalidade (40,44,45,46,47,48).

Se atualmente o aumento de citocinas é um fato bem descrito na insuficiência cardíaca, os locais de sua síntese permanecem pouco esclarecidos. Diversos estudos têm sido realizados no intuito de sugerir a principal fonte desta citocina na insuficiência cardíaca. Satoh e colaboradores demonstraram, por imunohistoquímica, uma maior expressão desta citocina no miocárdio de pacientes com miocardiopatia dilatada (49). Wagner e colaboradores também evidenciaram, através de imunohistoquímica, a expressão de TNF- α no músculo cardíaco de pacientes com insuficiência cardíaca em fase final (50). Estes resultados, sugerem que o miocárdio possa ser uma ou a fonte produtora desta citocina em pacientes com insuficiência cardíaca.

Por outro lado, Niebauer e colaboradores sugeriram um mecanismo alternativo para explicar a maior síntese desta citocina em pacientes com insuficiência cardíaca (41). O edema intestinal resultante da congestão venosa que ocorre na insuficiência cardíaca facilitaria a translocação bacteriana, acarretando uma

endotoxemia que estimularia a produção de TNF- α . Porém, esta hipótese não explica os níveis elevados desta citocina em pacientes com insuficiência cardíaca menos grave.

A produção periférica de TNF- α é outra hipótese que deve ser considerada. Koller e colaboradores correlacionaram as concentrações desta citocina com sintomas e quadro clínico de insuficiência cardíaca mais grave (40). Sendo assim, os tecidos hipoperfundidos como consequência do baixo débito cardíaco elaborariam o TNF- α , justificando a maior concentração desta citocina em pacientes mais graves. No entanto, nenhum estudo demonstrou a existência de uma diferença na concentração desta citocina no sangue periférico e do seio coronário de pacientes com insuficiência cardíaca. A importância da dosagem do TNF- α no seio coronário está no fato de que 85% da drenagem venosa do coração, incluindo a drenagem do septo interventricular, o ventrículo esquerdo, os dois átrios e parte do ventrículo direito é realizada por um sistema venoso que termina no seio coronário para posteriormente ser drenado no átrio direito (73). No presente estudo, foi demonstrada a existência de um gradiente de concentração do TNF- α entre o sangue periférico e seio coronário, ou seja, uma maior concentração desta citocina no sangue periférico do que no sangue do seio coronário, o que pode sugerir a hipótese de uma origem predominantemente periférica para a síntese desta citocina.

2.2 Receptores solúveis do fator de necrose tumoral

A bioatividade do TNF- α é regulada por 2 receptores solúveis, que exercem um papel inibidor sobre os efeitos deletérios desta citocina, bloqueando a sua ação, mas que paradoxalmente podem estabilizar a mesma, aumentando a sua atividade e os seus efeitos cardiovasculares (56). Torre-Amione e colaboradores demonstraram, em 1995, a expressão destes receptores em corações de adultos hígidos. Concomitantemente, demonstraram em

miócitos de felinos que a ação inotrópica negativa era mediada pelo receptor solúvel tipo I (57).

Neste mesmo ano, Ferrari e colaboradores mensuraram as concentrações destes dois receptores em pacientes com diversos graus de insuficiência cardíaca e evidenciaram um aumento da concentração dos mesmos em pacientes com insuficiência cardíaca classe funcional IV. Além disto, o receptor solúvel II do TNF- α correlacionou-se com um pior prognóstico destes pacientes a curto prazo (56). Testa e colaboradores também demonstraram uma elevação dos níveis plasmáticos dos receptores I e II do TNF- α em pacientes com insuficiência cardíaca classe III e IV, e uma concentração nos limites da normalidade nas classes funcionais I e II (47). Lommi e colaboradores demonstraram associação dos níveis plasmáticos do receptor II do TNF- α e piora da capacidade funcional em pacientes com insuficiência cardíaca (46).

Os níveis elevados dos receptores solúveis I e II do TNF- α evidenciados no atual estudo no sangue periférico dos pacientes com insuficiência cardíaca confirmam os dados descritos na literatura. No entanto, até o presente momento não há dados disponíveis sobre os níveis destes receptores no seio coronário de pacientes com insuficiência cardíaca. No presente estudo, a concentração dos receptores solúveis I e II do TNF- α foi maior no seio coronário de pacientes com insuficiência cardíaca quando comparada ao grupo controle. Além disto, não foi demonstrada diferença significativa entre as concentrações periféricas e no seio coronário destes receptores nos pacientes. Considerando que os receptores do TNF- α , após mediar a ação desta citocina sobre a célula-alvo, desprendem-se da superfície celular (56), os dados do presente estudo sugerem que os efeitos do TNF- α mediados por seus receptores possam ocorrer tanto no miocárdio como na periferia, independente do local onde esta citocina seja predominantemente sintetizada.

2.3 Interleucina 6 e receptor solúvel da interleucina 2

Apesar de diversos estudos na literatura terem demonstrado níveis elevados de interleucina 6 em pacientes com insuficiência cardíaca, não foi evidenciada uma diferença significativa

na concentração desta citocina entre pacientes e o grupo controle no presente estudo. Embora não haja uma explicação inequívoca para este achado, o tamanho da amostra deste estudo pode haver influenciado neste resultado. Testa e colaboradores demonstraram elevação de interleucina 6 em pacientes com insuficiência cardíaca classe IV (47). Esta associação entre os níveis desta citocina e a gravidade da doença foi evidenciada em outros estudos. Em um estudo realizado por Lommi e colaboradores, a concentração de interleucina 6 correlacionou-se com classe funcional, menor fração de ejeção e aumento da pressão capilar pulmonar e pressão do átrio direito (46). Outros estudos também demonstraram que os níveis de interleucina 6 se correlacionaram com pior prognóstico (48,58,59).

No entanto, no presente estudo a análise das concentrações de interleucina 6 demonstrou uma maior concentração desta citocina no sangue periférico em relação ao sangue do seio coronário em pacientes com insuficiência cardíaca. Tsutamoto e colaboradores realizaram um estudo envolvendo 80 pacientes com insuficiência cardíaca e avaliaram as concentrações desta citocina na artéria e veia femorais, demonstrando uma maior concentração venosa de interleucina 6. Como esta citocina não é produzida apenas por leucócitos mas pode ser sintetizada por células endoteliais e musculares lisas, como foi demonstrado *in vitro*, existe a possibilidade que seja produzida predominantemente por tecido vascular em pacientes com insuficiência cardíaca grave, justificando a hipótese de uma produção predominantemente periférica (59).

No presente estudo, não foi demonstrada diferença significativa nas concentrações do receptor solúvel da interleucina 2 entre pacientes e controles, bem como nas suas concentrações periféricas e no seio coronário. Os dados na literatura são escassos e contraditórios em relação a este receptor solúvel em pacientes com insuficiência cardíaca. Em um estudo realizado com 50 pacientes com miocardiopatia dilatada, 30 pacientes com cardiopatia isquêmica e 22 indivíduos hígidos, Limas e colaboradores demonstraram uma maior concentração do receptor solúvel da interleucina 2 nos pacientes com insuficiência cardíaca mais grave (60).

Já Testa e colaboradores não demonstraram elevação dos níveis deste receptor em pacientes com insuficiência cardíaca, independente da classe funcional dos mesmos. No entanto, este estudo envolveu pacientes com insuficiência cardíaca de origem hipertensiva ou isquêmica, e existem dados na literatura que sugerem uma maior ativação de células T em pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática (47). Como o receptor solúvel da interleucina 2 é um marcador da ativação de células T, esta pode ser a explicação para os dados contraditórios da literatura.

3. Correlação entre citocinas e fração de ejeção

Diversos estudos demonstraram a correlação de citocinas ou seus receptores solúveis com capacidade funcional e fração de ejeção de pacientes com insuficiência cardíaca. Ferrari e colaboradores demonstraram correlação das concentrações de TNF- α e seus receptores solúveis com classe funcional e, com exceção do receptor I, com menor fração de ejeção em pacientes com insuficiência cardíaca (56). Aukrust e colaboradores também evidenciaram correlação dos receptores solúveis do TNF- α com um menor índice cardíaco em pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática ou de origem isquêmica (48). Os resultados do presente estudo estão de acordo com as evidências conhecidas na literatura, pois foi demonstrada uma correlação modesta inversa, porém estatisticamente significativa, entre as concentrações do TNF- α e seus receptores solúveis e uma menor fração de ejeção. Embora a fração de ejeção não seja a melhor maneira de caracterizar a capacidade funcional e condição clínica dos pacientes com insuficiência cardíaca, estes resultados sugerem uma correlação das concentrações das moléculas acima descritas com a severidade da doença. Como a população estudada foi relativamente pequena e constituiu-se de pacientes graves, optamos por não testar a correlação destas citocinas com a classe funcional.

Neste estudo não foi evidenciada uma correlação entre as concentrações de interleucina 6 e receptor solúvel da interleucina 2 e a fração de ejeção de pacientes com insuficiência cardíaca. Lommi e colaboradores demonstraram uma correlação da concentração de interleucina 6 com a capacidade funcional e menor fração de ejeção em um grupo heterogêneo de pacientes com insuficiência cardíaca (46). Aukrust e colaboradores e Roig e colaboradores também demonstraram correlação entre os níveis de interleucina 6 e uma menor fração de ejeção em pacientes com miocardiopatia dilatada de etiologia isquêmica ou idiopática (48,58). Portanto, os resultados do presente estudo não se assemelham a resultados de outros estudos realizados e isto pode dever-se, pelo menos em parte, ao tamanho amostral da nossa população.

4. Limitações do estudo

Os resultados obtidos neste estudo devem ser avaliados à luz das limitações do mesmo. Em primeiro lugar, a amostra de pacientes é relativamente pequena. Isto pode haver influenciado os resultados obtidos, particularmente na concentração de interleucina 6 nos pacientes com insuficiência cardíaca, pois existem dados suficientes na literatura que demonstram elevação dos níveis desta citocina na insuficiência cardíaca. No entanto, esta amostra relativamente pequena não influenciou na obtenção de resultados significativos em relação ao TNF- α e seus receptores solúveis.

Em segundo lugar, foi descrita uma variabilidade natural nos níveis de citocinas e receptores solúveis circulantes em pacientes com insuficiência cardíaca. Dibbs e

colaboradores (74) mediram os níveis de TNF- α , seus dois receptores solúveis, interleucina 6 e seu receptor diariamente, semanalmente e mensalmente em 10 pacientes com insuficiência cardíaca classe III e em 10 indivíduos controles. Os autores demonstraram um aumento no coeficiente de variação das concentrações destas duas citocinas ao longo do tempo em pacientes com insuficiência cardíaca, sendo maior para a interleucina 6, e não evidenciaram variação significativa das concentrações dos receptores solúveis, tanto ao longo do tempo quanto na comparação entre os dois grupos. Esta evidência, se confirmada, influencia de maneira significativa os estudos que avaliam as concentrações de citocinas na insuficiência cardíaca, principalmente para os trabalhos desenvolvidos com o objetivo de avaliar as intervenções terapêuticas na insuficiência cardíaca, correlacionando as concentrações destas moléculas e seus receptores com a evolução dos pacientes. Como as concentrações de TNF- α e interleucina 6 podem variar significativamente ao longo do tempo, a ausência de diferença na concentração de interleucina 6 entre pacientes com insuficiência cardíaca e os indivíduos controles em um único momento não indica, necessariamente, que não haja tal diferença.

Finalmente, limitações inerentes ao método ELISA devem ser consideradas. É possível que as diferenças entre o atual estudo e de estudos prévios sejam decorrentes do método empregado, envolvendo sensibilidade, especificidade e variações metodológicas.

5. Síntese

Em suma, a existência de uma maior concentração de TNF- α e interleucina 6 no sangue venoso periférico do que no sangue do seio coronário em pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV sugere que a produção destas citocinas seja predominantemente periférica, embora a sua ação biológica pareça ser sistêmica, já que não foi demonstrada diferença nas concentrações dos receptores solúveis do TNF- α nestes dois locais. Além disto, os dados referentes à correlação inversa entre a concentração de TNF- α e seus receptores solúveis I e II e a fração de ejeção da população estudada confirmam a idéia de que estas moléculas sejam marcadores prognósticos na insuficiência cardíaca.

CONCLUSÕES

1. A concentração do TNF- α e interleucina 6 foi maior no sangue venoso periférico do que no sangue do seio coronário em pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV.
2. A concentração do TNF- α no sangue venoso periférico e dos seus receptores solúveis no sangue venoso periférico e sangue do seio coronário apresentaram correlação significativa inversa com a fração de ejeção na população estudada.

ESTUDOS FUTUROS

As evidências na literatura que demonstram uma ativação neurohumoral na insuficiência cardíaca, com conseqüente aumento das concentrações de diversas citocinas e seus receptores são consistentes e esclarecedoras. No entanto, o local predominante de produção destas citocinas ainda não está definido. A correlação das concentrações das citocinas no sangue do seio coronário e sangue venoso periférico com a expressão das mesmas avaliada por imunohistoquímica e hibridização *in situ* no miocárdio pode ser uma idéia interessante e capaz de acrescentar novas informações nesta questão intrigante.

ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO

V. Sa. está sendo convidado a participar de um estudo que pretende esclarecer causas até agora desconhecidas para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. O coração é um músculo cuja função principal é bombear sangue para o resto do organismo. Insuficiência cardíaca é aquela situação em que o coração enfraquece e a pessoa vai ficando progressivamente mais cansada, com falta de ar e às vezes com inchaço no corpo. Quando o coração enfraquece, o músculo cardíaco se torna atrofiado, mas não se sabe bem o que causa esta mudança no aspecto do músculo cardíaco. Além do mais, este processo é progressivo e pouco se pode fazer para mudar o curso da doença, principalmente se não sabemos muito sobre o problema em si. Para que possamos entender mais sobre esta doença, gostaríamos de obter sua colaboração neste projeto.

Se V. Sa. concordar em participar deste projeto, o seguinte ocorrerá:

1) Será introduzido um cateter pela veia femoral, na altura da virilha, sob anestesia local. Após este primeiro passo, coletaremos sangue de dentro do coração direito, colocando o cateter na saída de uma importante veia coronária. Este procedimento pode causar palpitações transitórias.

2) Para a realização deste procedimento é necessário o uso de radiação para enxergarmos a posição do cateter.

3) Sangue periférico será coletado através de um pequeno cateter colocado em uma veia no antebraço.

4) V. Sa. poderá ir para casa quando o médico que fizer o seu cateterismo indicar. Usualmente isso ocorre 6 horas após o procedimento.

Este projeto não traz benefício direto à V. Sa., mas pode levar a um melhor conhecimento de uma doença cardíaca tão importante. A participação neste projeto é inteiramente voluntária, e sua recusa em participar não implica de forma alguma em diferença no seu atendimento médico no Hospital de Clínicas. V. Sa pode também contar com nossa garantia quanto à confidencialidade dos resultados obtidos neste estudo.

Se V. Sa. concordar em participar, por gentileza assine na linha abaixo.

Assinatura do paciente

Data

Assinatura do médico responsável

Data

BIBLIOGRAFIA

1. Braunwald E, Colucci WS, Grossman W. Clinical Aspects of Heart Failure: high-output heart failure; pulmonary edema. In: Braunwald E, ed. Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine. 5th edition 1997. W.B. Saunders Company. p 445-470.
2. Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, et al. Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:3-16.
3. Colucci WS, Braunwald E. Pathophysiology of Heart Failure. In: Braunwald E. Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine. 5th edition 1997. W.B. Saunders Company. p 394-420.
4. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13:1637-1652.
5. Weber KT, Pick R, Silver MA, et al. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 1990; 82:1387-1401.
6. Klappacher G, Franzen P, Haab D, et al. Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol* 1995; 75:913-918.
7. Marijjanowski MM, Teeling P, Mann J, Becker AE. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1263-72.
8. Mann DL. Mechanisms and models in heart failure. A combinatorial approach. *Circulation* 1999; 100:999-1008.
9. Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley JA III, Spinale FG. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circulation* 1998; 97: 1708-1715.
10. Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTiernan CF. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation* 1998; 98: 1728-1734.
11. Packer M. Is tumor necrosis factor an important neurohormonal mechanism in chronic heart failure? *Circulation* 1995;92:1379-1382.

12. Clausell N, Ribeiro JP. Em busca de novos paradigmas para o manejo da insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol* 1998; 71: 563-574.
13. Packer M. How should physicians view heart failure?- The phylosophical and physiological evolution of three conceptual models of the disease. *Am J Cardiol* 1993; 71: C3-C11.
14. Packer M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 248-254.
15. Braunwald E. The history. In: Braunwald E. *Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine*. 5th edition 1997. W.B. Saunders Company. p 1-14.
16. Johnston CI. Tissue angiotensin converting enzyme in cardiac and vascular hypertrophy, repair and remodeling. *Hypertension* 1994; 23: 258-268.
17. Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert PM, Dzau VJ. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res* 1991; 69: 475-82.
18. Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res* 1994;74:727-739.
19. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, et al. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol* 260: H1406, 1991.
20. The SOLVD Investigators - Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325: 293-302.
21. The SOLVD Investigators - Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fraction. *N Engl J Med* 1992; 327: 685-691.
22. The CONSENSUS Trial Study Group-Effects of enalapril on mortality in severe heart failure. *N Engl J Med* 1987; 316: 429-435.
23. Pitt B, Segal R, Martinez FA, et al. Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet* 1997; 349: 747-752).
24. Evaluation of Losartan in the Elderly Study (ELITE II). Comunicação oral, Congresso da American Heart Association, Atlanta, 1999.

25. Pitt B, Zanned F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomised Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341(10): 709-171.
26. Colucci WS, Ribeiro JP, Rocco MB, et al. Impaired chronotropic response to exercise in patients with congestive heart failure. Role of postsynaptic beta-adrenergic desensitization. *Circulation* 1989; 80: 314-323.
27. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984; 311: 819-823.
28. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, et al. Beta 1 and beta 2 adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor downregulation in heart failure. *Circ Res* 59: 297.
29. Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Rasmussen R. Beta 1 and beta 2 adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol* 35: 295.
30. Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, et al. Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1993; 342: 1743-1750.
31. CIBIS Investigators and Committees. A randomized trial of beta-blockade in heart failure: the Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). *Circulation* 1994; 90: 1765-1773.
32. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, et al. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 1996; 334: 1349-1355.
33. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999; 353 (9169): 2000-2007.
34. Bristow MR. Pathophysiologic and pharmacologic rationales for clinical management of chronic heart failure with beta-blocking agents. *Am J Cardiol* 21: 12C.
35. Mann DL, Young JB. Basic mechanisms in congestive heart failure. *Chest* 1994;105:897-904.
36. Torre-Amione G, Bozkurt B, Deswal A, Mann DL. An overview of tumor necrosis factor- α and the failing human heart. *Curr Opin Cardiol* 1999;14:206-210.

37. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, et al. Tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996; 93: 704-711.
38. Habib FM, Springall DR, Davies GJ, Oakley CM, Yacoub MH, Polak JM. Tumor necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1996; 347: 1151-1155.
39. Satoh M, Nakamura M, Tamura G, et al. Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in myocardium in human dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 716-724.
40. Koller-Strametz J, Pacher R, Frey B, Kos T, Woloszczuk W, Stanek B. Circulating tumor necrosis factor- α levels in chronic heart failure : relation to its soluble receptor II, interleukin-6, and neurohumoral variables. *J Heart Lung Transplant* 1998;17:356-362.
41. Niebauer J, Volk H, Kemp M, et al. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: A prospective cohort study. *Lancet* 1999;353:1838-1842.
42. Pagani FD, Baker LS, Hsi C, Knox M, Fink MP, Visner M. Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor- α in conscious dogs. *J Clin Invest* 1992; 90: 389-398.
43. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, et al. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 1998;97:1382-1391.
44. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990;323:236-241.
45. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict CR, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1201-1206.
46. Lommi J, Pulkkinen K, Koskinen P, et al. Haemodynamic, neuroendocrine and metabolic correlates of circulating cytokine concentrations in congestive heart failure. *Eur Heart J* 1997;18:1620-1625.
47. Testa M, Yeh M, Lee P, et al. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:964-971.
48. Aukrust P, Ueland T, Bendtzen K, et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1999; 83: 376-382.

49. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, et al. Tumor necrosis factor- α - converting enzyme and tumor necrosis factor- α in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1999;99:3260-3265.
50. Wagner DR, McTiernan C, Sanders VJ, Feldman AM. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced secretion of tumor necrosis factor- α in the failing human heart. *Circulation* 1998;97:521-524.
51. Munger MA, Johnson B, Amber IJ, Callahan KS, Gilbert EM. Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996 Apr 1; 77(9) : 723-727.
52. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, et al. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995 Aug 15; 92(4):748-755.
53. Holzheimer RG, Molloy RG, Grolach H, Wilkert S, Hehrlein F. IL-6 and TNF alpha release in association with neutrophil activation after cardiopulmonary bypass surgery. *Infection*. 1994; 22(1): 37-42.
54. Wan S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL. Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996; 112(3): 806-811.
55. Fyfe A, Daly P, Galligan L, Pirc L, Feindel C, Cardella C. Coronary sinus sampling of cytokines after heart transplantation: evidence for macrophage activation and interleukin-4 production within the graft. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 21(1): 171-176.
56. Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, et al. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*.1995 Sep; 92: 1479-1486.
57. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* 1995;92:1487-1493.
58. Roig E, Orús J, Paré C, et al. Serum interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Excerpta Medica* 1998; 688-690.
59. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, et al. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:391-398).

60. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Soluble interleukin-2 receptor levels in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1995; 91: 631-634.
61. Katz SD, Rao r, Berman JW, et al. Pathophysiological correlates of increased serum tumor necrosis factor in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1994; 90:12-16.
62. Matsumori A, Shioi T, Yamada T, Matsui S, Sasayama S. Vesnarinone, a new inotropic agent, inhibits cytokine production by stimulated human blood from patients with heart failure. *Circulation*. 1994; 89:955-958.
63. Feldman AM, Bristow MR, Parmley WW, et al. Effects of vesnarinone on morbidity and mortality in patients with heart failure. *N Engl J Med* 1993; 329: 149-55.
64. Bristow MR, Anderson FL, Port JD, et al. Differences in beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*; 84: 1024.1991
65. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J*. 1994; 72: 561-566.
66. Mohler III ER, Sorensen LC, Ghali JK, et al. Role of cytokines in the mechanism of action of amlodipine: The PRAISE heart failure trial. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 35-41.
67. Doval HC, Nul DR, Grancelli HO, Perrone SV, Bortman GR, Curiel R. Randomised trial of low-dose amiodarone in severe congestive heart failure. Grupo de Estudio de la Sobrevida em la Insuficiencia Cardiaca en Argentina. *Lancet* 1994; 344: 493-10.
68. Singh SN, Fletcher RD, Fisher SG et al. Amiodarone in patients with congestive heart failure and asymptomatic ventricular arrhythmia. Survival Trial of Antiarrhythmic Therapy in Congestive Heart Failure. *N Engl J Med* 1995; 333: 77-82.
69. Matsumori A, Ono K, Nishio R, Nose Y, Sasayama S. Amiodarone inhibits production of tumor necrosis factor- α by human mononuclear cells. *Circulation*. 1997; 96: 1386-1389.
70. Sliwa K, Skudicky D, Candy G, Wisenbaugh T, Sareli P. Randomised investigation of effects of pentoxifylline on left ventricular performance in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1998; 351: 1091-1093.
71. Deswal A, Bozkurt B, Seta Y, et al. Safety and efficacy of a soluble P75 tumor necrosis factor receptor (Enbrel, Etarnecept) in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 1999; 99: 3224-3226.

72. Francis GS. TNF- α and heart failure. The difference between proof of principle and hypothesis testing. *Circulation*. 1999; 99: 3213-3214.
73. Waller BF, Schlant RC. Anatomy of the heart. In: Hurst's the heart, arteries and veins. Alexander RW, Schlant RC, Fuster V. 9th ed 1998. Mc Graw-Hill. p 19-79.
74. Dibbs Z, Thornby J, White BG, Mann DL. Natural variability of circulating levels of cytokines and cytokine receptors in patients with heart failure: implications for clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 1935-1942.