

PERFIL IMUNOINFLAMATÓRIO NO CONTINUUM DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

IMMUNOINFLAMMATORY PROFILE IN THE CONTINUUM OF HEART FAILURE

Nadine Clausell

RESUMO

O conceito de que o processo inflamatório poderia ser importante na patogênese de doenças cardiovasculares ganhou maior impulso com a hipótese da lesão vascular de Russel Ross para o desenvolvimento da aterosclerose. A partir deste conceito, o conhecimento e a pesquisa na área de aterosclerose coronária pós-transplante cardíaco também foram impulsionados, além de servirem como modelo pertinente para o estudo de aspectos inflamatórios relacionados à parede vascular. Uma vez caracterizado que a vasculatura poderia ser alvo e até fonte de estímulo inflamatório, o coração também passou a ser visto como tal a partir da detecção de mediadores inflamatórios na circulação em pacientes com insuficiência cardíaca. Esta revisão aborda evidências de investigação básica e clínica relacionadas aos aspectos imunoinflamatórios na aterosclerose e em situações de disfunção ventricular. Os resultados da linha de trabalhos experimentais apontam uma relação de causa e efeito entre ativação imunoinflamatória na parede vascular e acúmulo de fibronectina, o que contribui para a formação neo-intimal em coronárias de suínos submetidos a transplante cardíaco. Achados similares foram observados em fragmentos de lesões ateroscleróticas coronárias obtidas por aterectomia de pacientes submetidos a transplante cardíaco. Também em lesões coronárias por reestenose, foram identificados marcadores inflamatórios e acúmulo de matriz extracelular, indicando um padrão imunoinflamatório nesta condição, o que foi semelhante ao padrão observado em lesões de macrovasculopatia diabética, situação em que há um agressivo processo aterosclerótico. Além disto, marcadores inflamatórios foram também observados em situações de risco cardiovascular aumentado sem evidência de vasculopatia anatomicamente significativa: diabetes melito associado à dislipidemia e pacientes com dor torácica, porém, sem lesões coronárias angiograficamente definidas. Finalmente, um gradiente imunoinflamatório foi identificado em pacientes com insuficiência cardíaca, e marcadores inflamatórios foram associados a mau prognóstico no choque séptico e a aparecimento de disfunção ventricular pós-cirurgia de revascularização miocárdica. Em conclusão, este conjunto de dados reforça o envolvimento do sistema cardiovascular no processo de ativação imunoinflamatória, o que parece contribuir para a progressão de pelos menos duas condições patológicas importantes: a doença aterosclerótica e o desenvolvimento de disfunção ventricular e insuficiência cardíaca.

Unitermos: Aterosclerose, inflamação, matriz extracelular, disfunção ventricular.

ABSTRACT

The concept that the inflammatory process could be important in the pathogenesis of cardiovascular diseases has been put forward by Russell Ross' hypothesis of vascular response to injury for the development of atherosclerosis. Based on this concept, the knowledge and research into the pathogenesis of post-cardiac transplant arteriopathy have also been incremented and served as a pertinent model to study inflammatory mechanisms related to the vessel wall. Once characterized that the vasculature could be a target and even a source of inflammatory stimulus, the heart has also been considered part of this activation, since the identification of inflammatory

Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS. Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.
Correspondência: Nadine Clausell, Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-007, Porto Alegre, RS. Fone: (51) 2101-8344. Fax: (51) 2101-8657. E-mail: clausell@portoweb.com.br.

mediators in the circulation of patients with heart failure. This review article summarizes basic and clinical research data related to immunoinflammatory aspects in atherosclerosis and in left ventricular dysfunction. Results from experimental works indicate a mechanistic association between immunoinflammatory activity in the vascular wall and accumulation of fibronectin, both contributing to neointimal formation in post-cardiac transplant atherosclerosis in piglets. Similar findings were observed in coronary atherosclerotic lesions retrieved by atherectomy from cardiac transplant patients. Moreover, in restenotic coronary lesions and in diabetic macrovasculopathy, both situations of aggressive atherosclerotic process, markers of inflammatory activation and accumulation of extracellular matrix were identified, which indicates an immunoinflammatory process. Markers of inflammatory activation were also observed prior to the development of evident atherosclerosis but in the presence of cardiovascular risk factors such as: diabetes mellitus and dyslipidemia and in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. Finally, an immunoinflammatory gradient was identified in heart failure patients, and inflammatory features were associated to worse outcome in patients with septic shock and to the ventricular dysfunction associated to post-coronary artery bypass grafting. In conclusion, taken together, these data reinforce the involvement of the cardiovascular system in processes of immunoinflammatory activity, contributing at least for the progression of two important cardiovascular pathological conditions: the atherosclerotic disease and the development of ventricular dysfunction and heart failure.

Key words: Atherosclerosis, inflammation, extracellular matrix, ventricular dysfunction.

INTRODUÇÃO

O envolvimento de aspectos imunoinflamatórios tem se tornado alvo de crescente interesse em cardiologia. A partir da evolução do conhecimento sobre a doença aterosclerótica, em que o conceito vigente é de que esta seja uma forma de processo inflamatório, foram impulsionados estudos em situações semelhantes, como a aterosclerose pós-transplante cardíaco e a reestenose coronária pós-angioplastia. Também a ativação inflamatória parece ser um evento precoce em situações de disfunção endotelial, sinalizando talvez risco cardiovascular maior. Finalmente, doenças que envolvem o coração também têm sido vistas como parte de um processo envolvendo ativação inflamatória, especialmente a insuficiência cardíaca e a disfunção ventricular pós-cirurgia de revascularização miocárdica. Esta revisão apresenta um conjunto de dados que aborda situações acima mencionadas e sugere a importância da modulação inflamatória na patogênese de doenças cardiovasculares.

ATEROSCLEROSE PÓS-TRANSPLANTE CARDÍACO - ESTUDOS EM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

A aterosclerose comum é hoje considerada como uma resposta inflamatória a lesões provocadas na superfície endotelial (1). Estas lesões são decorrentes

de fatores de risco, como dislipidemias, tabagismo ou hipertensão arterial sistêmica. Ao longo dos anos, estas progridem na parede vascular por mecanismos de reparo cicatricial, com depósito de detritos celulares, colesterol, acúmulo de proteínas da matriz extracelular, presença de células inflamatórias e expressão de diversos mediadores inflamatórios. A aterosclerose pós-transplante cardíaco configura uma situação em que estes mecanismos poderiam ser amplificados, uma vez que o espaço de tempo com que estas lesões costumam ocorrer é muito mais reduzido: meses, ao invés de décadas, como na aterosclerose comum. Neste sentido, alguns aspectos específicos das características das lesões coronárias pós-transplante cardíaco ainda mereciam ser melhor examinados. Em 1992, desenvolvemos um estudo em que artérias coronárias de coração de suínos transplantados e não-transplantados foram analisadas com relação à expressão de marcadores inflamatórios expressos na parede vascular, assim como o padrão de apresentação de uma proteína da matriz extracelular – fibronectina – nas lesões coronárias. Foi possível demonstrar que, em relação a coronárias de corações não-transplantados, houve acúmulo de interleucina-1 β , maior expressão endotelial de antígeno MHC II e maior acúmulo de fibronectina nas coronárias provenientes de corações transplantados. Estes dados sugeriram que, mesmo após curto espaço após o transplante cardíaco – 1 semana –, já havia evidências de ativação imunoinflamatória clara associada a achados de proliferação intimal (2). A questão seguinte a ser investigada era se havia uma relação de causa e efeito

na associação de citocinas e acúmulo de fibronectina nas lesões coronárias pós-transplante cardíaco. Para testar esta hipótese, trabalhamos com cultura de células da musculatura lisa de coronárias de coração transplantado de suínos e estudamos se havia maior produção *in vitro* de interleucina-1 β e fibronectina, comparativamente a células de artérias coronárias de coração não-transplantado. De fato, foi demonstrada uma maior produção destas moléculas naquelas células. Ainda no mesmo estudo, a seguir, testamos a possibilidade de que o aumento de fibronectina fosse secundário ao aumento de interleucina-1 β . Para tanto, utilizamos um bloqueador do receptor da interleucina-1 β nas culturas de células e observamos que houve redução significativa tanto da síntese protéica da fibronectina como da expressão do seu RNA mensageiro, caracterizando, portanto, uma modulação em nível transcripcional da produção de fibronectina por interleucina-1 β (3). O passo seguinte nesta linha de investigação foi estudar se estes achados demonstrados *in vitro* tinham expressão *in vivo*. Para tanto, trabalhamos com um modelo experimental de transplante em coelhos da Nova Zelândia, pois sendo este um animal de menor porte, seria possível utilizar bloqueadores de citocinas e estudar o comportamento destas variáveis biológicas nas artérias retiradas do coração transplantado. Assim, utilizamos o receptor solúvel do TNF- α injetado subcutaneamente em coelhos submetidos a transplante cardíaco, e, após 7 a 10 dias, os animais eram mortos, e estudados aspectos inflamatórios e acúmulo de fibronectina nas lesões coronárias. Foi possível demonstrar, com esta abordagem, uma quase completa abolição do aparecimento das lesões coronárias dos corações transplantados nos animais que receberam o receptor solúvel do TNF- α , comparativamente aos animais que receberam solução salina. Além disto, através de imuno-histoquímica, observou-se redução também muito evidente da expressão de marcadores inflamatórios e da expressão de fibronectina nos vasos (4). Assim, este conjunto de estudos estabeleceu uma linha de pesquisa com conotação mecanística, no que diz respeito à interação de modulação inflamatória e acúmulo de matriz extracelular na patogênese da aterosclerose pós-transplante cardíaco experimental.

ATEROSCLEROSE EM HUMANOS - PÓS-TRANSPLANTE CARDÍACO, REESTENOSE CORONÁRIA E DIABETES MELITO

Uma vez caracterizados os modelos experimentais descritos acima, era oportuno testar estas hipóteses na

aterosclerose pós-transplante cardíaco em pacientes submetidos a este procedimento. Sabe-se que a ocorrência desta complicação se dá em até 50% dos casos, 5 anos após o procedimento, e sua incidência, de fato, aumenta ao longo do tempo. Do ponto de vista clínico, é uma entidade de difícil diagnóstico, uma vez que o sintoma de angina muitas vezes não ocorre devido à desnervação do coração transplantado. No entanto, em alguns casos, o diagnóstico de isquemia é factível, e atitudes terapêuticas podem ser tomadas. Neste estudo, casos que foram selecionados para serem submetidos a aterectomia coronária foram estudados. Os fragmentos de placa obtidos foram analisados através de imuno-histoquímica, e detectou-se, à semelhança das observações experimentais, que havia expressão evidente de fibronectina e alguns achados compatíveis com ativação inflamatória leve nas lesões presentes nas artérias coronárias de pacientes submetidos a transplante cardíaco, embora depósitos de cálcio, cristais de colesterol e células espumosas também tenham sido identificados (5). Desta forma, observações realizadas em nível experimental parecem apresentar correlatos na pesquisa clínica aplicada. Ainda perseguindo esta linha de pesquisa, procuramos definir se havia correlação entre estes achados nas lesões coronárias pós-transplante cardíaco e função endotelial. Sabe-se que a disfunção endotelial é um achado precoce na doença aterosclerótica, indicando já algum grau de lesão funcional da célula endotelial. Para tanto, estudamos, através de histologia e imuno-histoquímica, vasos intramiocárdicos presentes em biópsias endomiocárdicas de pacientes transplantados cardíacos e a função endotelial de vasos epicárdicos por ultra-som intracoronário, quando estimulados por acetilcolina intracoronária. Nos vasos intramiocárdicos, observou-se correlação entre achados histológicos de espessamento intimal e expressão de TNF- α e fibronectina, porém, observou-se dissociação entre achados histológicos e função endotelial e espessamento intimal por ultra-som intracoronário. Estes dados indicam que marcadores inflamatórios parecem ser importantes em pequenos vasos, não havendo correlação com a progressão da doença em vasos epicárdicos (6).

Aplicando ainda o conceito de que ativação inflamatória e acúmulo de fibronectina estão associados a processos de reparação tecidual vascular, procuramos estudar estes aspectos em uma outra forma de dano vascular: a reestenose coronária. Esta é uma complicação que ocorre em até 40% dos casos após a realização de angioplastia coronária. Considerando que o que ocorre durante a angioplastia é um trauma vascular mecânico, é possível supor que mecanismos de reparo cicatricial participem no processo e possam

causar crescimento exagerado tecidual, levando à reestenose. Neste estudo, obtivemos material de aterectomia de pacientes submetidos previamente à angioplastia coronária que desenvolveram reestenose e de pacientes submetidos à aterectomia por lesão primária coronariana. Observou-se que, nos pacientes com lesão por reestenose, houve maior acúmulo de células inflamatórias, TNF- α e fibronectina (7), reproduzindo o modelo experimental já descrito. Estes dados sugerem que, em modelos agressivos de lesão coronária, aspectos inflamatórios participem de forma mais evidente que nas lesões de aterosclerose comum, nas quais longos períodos de tempo são necessários para que as lesões se tornem significativas. No entanto, em um trabalho subsequente, em que foram analisados níveis circulantes de citocinas em pacientes portadores de reestenose coronária, comparativamente a pacientes com lesões primárias, não foram demonstradas diferenças significativas, indicando, talvez, que fenômenos intraplaca, como descrito acima, não sejam traduzidos em níveis circulantes sistêmicos (8).

Outra situação em que a evolução de lesões ateroscleróticas é agressiva e rápida é o diabetes melito. A doença macrovascular é a maior causa de morte em pacientes diabéticos e parece ser desproporcional à magnitude dos fatores de risco usualmente presentes nesta condição. Procuramos, então, investigar aspectos imunoinflamatórios nas lesões ateroscleróticas de artérias de membros inferiores de pacientes submetidos à amputação. Neste estudo, demonstramos que, nas lesões de pacientes diabéticos, havia maior acúmulo de TNF- α , comparativamente a lesões de pacientes amputados não-diabéticos (9). Assim, novamente aspectos inflamatórios parecem ser importantes na gênese de lesões vasculares de cunho mais agressivo.

MARCADORES INFLAMATÓRIOS, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES

Considerando que o endotélio pode ser visto como o órgão de choque do sistema cardiovascular, com uma capacidade de ativação intensa, a disfunção endotelial pode identificar, previamente ao aparecimento de lesões ateroscleróticas hemodinamicamente significativas, situações de risco cardiovascular aumentado. Nos estudos seguintes, procuramos investigar, de forma não invasiva, o desenvolvimento de disfunção endotelial frente a diferentes situações clínicas.

Em um primeiro estudo, analisamos a concentração plasmática da molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) em pacientes com quadro de

angina instável, angina estável e com dor torácica, porém, sem lesões coronárias significativas à cineangiocoronariografia, todos com um ou mais fatores de risco cardiovascular. Demonstrou-se então que, em pacientes com dor torácica, porém, sem lesões coronárias significativas, houve concentração maior de VCAM-1, comparativamente a pacientes com angina estável e equivalente à concentração em pacientes com angina instável. Estes achados indicam que, mesmo na ausência de lesões coronárias importantes, na presença de fatores de risco, a disfunção endotelial pode estar presente e participar como um componente inflamatório na apresentação clínica de síndromes coronarianas (10).

No segundo estudo, testamos a hipótese de que, em pacientes diabéticos do tipo 2 e portadores de dislipidemia, havia maior comprometimento da função endotelial quando avaliada por endotelina-1 e fator de von Willebrand, comparativamente a pacientes dislipidêmicos sem diabetes e controles normais. Neste estudo, a disfunção endotelial causada pela concomitância de fatores de risco importantes (diabetes melito e dislipidemia) foi mais evidente do que quando comparada à dislipidemia apenas. Estes dados reforçam o conceito de que, uma vez agredido, o endotélio é capaz de ativar-se, produzindo moléculas que farão parte da progressão da doença aterosclerótica (11).

ASPECTOS INFLAMATÓRIOS E COMPROMETIMENTO DA FUNÇÃO VENTRICULAR

Há alguns anos, tem sido demonstrado que pacientes portadores de insuficiência cardíaca apresentam níveis circulantes elevados de marcadores inflamatórios, como TNF- α e interleucinas. Estes achados correlacionam-se com a gravidade da doença e são indicadores de mau prognóstico. Nos próximos estudos, procuramos ampliar a investigação de mecanismos inflamatórios na doença cardiovascular em três aspectos principais: 1. determinar o valor prognóstico de níveis de TNF- α e seus receptores solúveis e endotelina-1 em pacientes com choque séptico; 2. determinar a origem dos marcadores inflamatórios elevados no sangue em pacientes com insuficiência cardíaca avançada; e 3. examinar a associação de disfunção ventricular após cirurgia de revascularização com uso de circulação extracorpórea, com marcadores inflamatórios e de injúria miocárdica.

No primeiro estudo, analisamos sequencialmente, utilizando o método de ELISA, a concentração plasmática de TNF- α , seus receptores I e II e endotelina-1 em pacientes com choque séptico e procuramos identificar valor prognóstico para mortalidade. Demonstrou-se que

a combinação de níveis elevados precoces, em 6 horas do diagnóstico de choque, de TNF- α e endotelina-1 apresenta alto valor preditivo positivo para mortalidade. Estes dados podem sugerir que o potente efeito inotrópico negativo do TNF- α , associado à disfunção endotelial representada por níveis de endotelina-1, confere um risco maior de depressão cardiovascular (12). No segundo estudo, em pacientes com insuficiência cardíaca avançada (classes III ou IV da *New York Association*), procurou-se identificar a origem da produção aumentada de TNF- α e seus receptores, comparando as concentrações presentes em sangue periférico àquelas presentes em sangue do seio coronário. Demonstrou-se que, para o TNF- α , as concentrações obtidas no sangue periférico são maiores do que no sangue do seio coronário; já para os receptores do TNF- α , não houve diferença entre os sítios de coleta. Estes dados indicam que a principal fonte produtora de TNF- α na insuficiência cardíaca parece localizar-se em nível periférico, talvez partindo especificamente da célula endotelial. Já os receptores do TNF- α parecem ser produzidos de forma equivalente tanto no miocárdio quanto em sítio periférico (13). Em um terceiro estudo, ainda na linha inflamatória e função ventricular, procuramos investigar a associação de mediadores inflamatórios e de lesão cardíaca (troponina I) no desenvolvimento da disfunção ventricular pós-cirurgia de revascularização miocárdica com uso de circulação extracorpórea. Sabe-se que, em pacientes submetidos à circulação extracorpórea, há um certo grau de disfunção ventricular no pós-operatório. Neste estudo, demonstrou-se que há aumento de citocinas seqüencialmente após o início da circulação extracorpórea, porém, exceto pelo perfil do receptor I do TNF- α na terceira hora após início da circulação extracorpórea, não houve maiores associações com disfunção ventricular identificada em 24 horas de pós-operatório. Já os níveis de troponina I apresentaram correlação mais consistente com o grau de disfunção ventricular, assim como com o tempo de circulação extracorpórea e de clampeamento aórtico. Estes dados sugerem que, para o desenvolvimento da disfunção ventricular pós-cirurgia de revascularização, a associação de atividade inflamatória parece atuar conjuntamente a um certo grau de lesão miocárdica (14).

CONCLUSÕES

Este conjunto de estudos contribui para o estabelecimento do conceito de que o sistema cardiovascular, tanto a vasculatura como o miocárdio, é alvo e também fonte de atividade inflamatória, mecanismo que parece desempenhar papel importante na progressão de pelo menos duas condições clínicas

prevalentes: a doença aterosclerótica e a disfunção ventricular, com suas subseqüentes implicações. É possível que indicativos inflamatórios sejam elementos precoces na progressão destas doenças, permitindo, talvez, diagnósticos iniciais em situações de risco maior, levando a intervenções sobre fatores de risco de forma mais agressiva. Ainda permanece a ser esclarecido se um crescente conhecimento nesta área poderá, no futuro, indicar caminhos terapêuticos, tendo como alvo a modulação inflamatória.

REFERÊNCIAS

1. Ross R. Mechanism of disease: atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
2. Clausell N, Molossi S, Rabinovitch M. Increased interleukin-1 β and fibronectin synthesis are early features of the development of the post-cardiac transplant coronary arteriopathy in piglets. *Am J Pathol* 1993;142:1776-82.
3. Clausell N, Rabinovitch M. Upregulation of fibronectin synthesis by interleukin-1 β in coronary artery smooth muscle cells is associated with the development of the post-cardiac transplant arteriopathy in piglets. *J Clin Invest* 1993;92:1850-8.
4. Clausell N, Molossi S, Sett S, Rabinovitch M. In vivo blockade of tumor necrosis factor-alpha inhibits the development of acute coronary artery neointimal formation in cholesterol-fed rabbits following cardiac transplantation. *Circulation* 1994;89:2768-79.
5. Clausell N, Daly P, Molossi S, et al. Histological and immunohistological characteristics of eccentric coronary artery lesions retrieved by atherectomy from cardiac transplant patients. *Cardiovasc Pathol* 1997;6:23-9.
6. Clausell N, Butany J, Molossi S, et al. Abnormalities in intramyocardial arteries detected in cardiac transplant biopsies and lack of correlation with abnormal intracoronary ultrasound or endothelial dysfunction in large epicardial coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:110-9.
7. Clausell N, Lima VC, Molossi S, et al. Expression of tumor necrosis factor alpha and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy. *Br Heart J* 1995;73:534-9.
8. Quadros AS, Prado K, Oliveira J, Manfroi WC, Ribeiro JP, Clausell N. Níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios na aterosclerose

- coronariana primária e na reestenose coronariana pós-angioplastia. *Arq Bras Cardiol* 2001;76:379-84.
9. Clausell N, Kalil P, Biolo A, Molossi S, Azevedo M. Increased expression of tumor necrosis factor- α in diabetic macrovasculopathy. *Cardiovasc Pathol* 1999;8:145-51.
 10. Clausell N, Prado K, Ribeiro JP. Increased plasma levels of soluble vascular cellular adhesion molecule-1 in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Int J Cardiol* 1999;68:275-80.
 11. Seligman BG, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JL, Clausell N. Increased plasma levels of endothelin-1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2000;23:1395-400.
 12. Brauner JS, Rohde LE, Clausell N. Circulating tumor necrosis factor- α and endothelin-1: early predictors of mortality in patients with septic shock. *Int Care Med* 2000;26:305-13.
 13. Grossman G, Rohde LE, Clausell N. Evidence for increased peripheral production of tumor necrosis factor- α in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2001;88:578-81.
 14. Savaris N, Polanczyk CA, Clausell N. Cytokines and troponin-I in cardiac dysfunction after coronary artery grafting with cardiopulmonary bypass. *Arq Bras Cardiol* 2001;77:114-9.