

Vera Lopes Nunes

**O papel do acúmulo do colágeno miocárdico intersticial na sobrevida dos
pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e chagásica**

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires

SÃO PAULO

2004

“Dos dois filhos de um emir egípcio, um estudava a ciência enquanto o outro juntava riquezas. O primeiro tornou-se o homem mais sábio da época, e o outro, rei do Egito. O rei, considerando o sábio com desdém, disse: “Cheguei à soberania e tu continuas na pobreza”. O outro respondeu: “ó meu irmão, agradeço a Deus por ter merecido o conhecimento, que é herança do Profeta, enquanto tu obtiveste o reino do Egito, a herança do faraó”

Saddi de Shiraz

Ao paciente

Aos meus avós, pais e irmãos pelo exemplo, carinho e apoio indispensáveis
Ao Eduardo, com todo meu amor

Agradecimentos

Agradeço as valorosas colaborações:

Dr. Clovis de Carvalho Frimm

Sr. Wallace Fernandes e toda a sua equipe
da Unidade de Informações Médicas e Hospitalares

Dr. Luiz Alberto Benvenuti

Dr. Edmundo Arteaga-Fernández

Lucia Maria de Oliveira

Ao Prof. Dr. Charles Mady, agradeço pela receptividade e oportunidade de realizar esta tese

Deixo especial agradecimento ao Dr. Felix José Alvarez Ramires, pelas contribuições constantes e fundamentais, orientação, apoio, dedicação; além do carinho e amizade – muito obrigada .

Sumário

<i>Listas</i>	<i>i</i>
<i>Abreviações</i>	<i>i</i>
<i>Tabelas</i>	<i>ii</i>
<i>Gráficos</i>	<i>ii</i>
<i>Figura</i>	<i>ii</i>
<i>Resumo</i>	<i>iii</i>
<i>Summary</i>	<i>v</i>
<i>Introdução</i>	<i>1</i>
<i>Objetivos</i>	<i>14</i>
<i>Casuística e Métodos</i>	<i>16</i>
A) <i>Casuística</i>	<i>17</i>
1. <i>Seleção de pacientes</i>	<i>17</i>
2. <i>Grupo Controle</i>	<i>19</i>
B) <i>Métodos</i>	<i>20</i>
1. <i>Dados ecocardiográficos</i>	<i>20</i>
2. <i>Biópsia endomiocárdica do ventrículo direito</i>	<i>20</i>
3. <i>Morfometria do colágeno</i>	<i>21</i>
4. <i>Análise estatística</i>	<i>21</i>
<i>Resultados</i>	<i>23</i>
A) <i>Aspectos demográficos</i>	<i>24</i>
B) <i>Aspectos ecocardiográficos</i>	<i>24</i>
C) <i>Análise de sobrevida</i>	<i>26</i>
D) <i>Morfometria do colágeno</i>	<i>30</i>
E) <i>Correlações com a FVCI</i>	<i>31</i>
<i>Discussão</i>	<i>37</i>
<i>Conclusão</i>	<i>49</i>
<i>Limitações do estudo</i>	<i>51</i>
<i>Referências bibliográficas</i>	<i>53</i>

LISTAS

Abreviações

IC -	insuficiência cardíaca
MCDI -	miocardiopatia dilatada idiopática
MCDC -	miocardiopatia dilatada chagásica
VO ₂ max -	consumo de oxigênio durante o pico do exercício
FEVE -	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
DDVE -	diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
FVCI -	fração de volume do colágeno intersticial
pg/ml –	picograma por mililitro
OMS/SIFC –	Organização Mundial de Saúde / Sociedade Internacional e Federação de Cardiologia
mmHg –	milímetro de mercúrio
g –	grama
mg/dl –	millgrama por decilitro
HC-FMUSP -	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
µm –	micrômetro
mm -	milímetro
TNF -	fator de necrose tumoral

Tabelas

Tabela 1 -	Características demográficas das miocardiopatias idiopáticas, chagásicas e do grupo controle e tempo de sobrevida.....	24
Tabela 2 -	Médias e respectivos desvios padrão de DDVE segundo a etiologia das miocardiopatias e do grupo controle	25
Tabela 3 -	Médias e respectivos desvios padrão da FEVE segundo a etiologia das miocardiopatias e do grupo controle	26
Tabela 4 –	Médias e respectivos desvios padrão da FVCI segundo os diferentes grupos estudados	30

Gráficos

Gráfico 1 –	Médias e respectivos intervalos de confiança de 95% do DDVE segundo as etiologias das miocardiopatias e do grupo controle	25
Gráfico 2 –	Curvas de sobrevida segundo as etiologias das miocardiopatias.....	26
Gráfico 3 –	Curvas de sobrevida segundo a DDVE nos pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica	27
Gráfico 4 –	Curvas de sobrevida segundo a DDVE nos pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática	28
Gráfico 5 –	Curvas de sobrevida segundo a FEVE nos pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica	29
Gráfico 6 –	Curvas de sobrevida segundo a FEVE nos pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática	29
Gráfico 7 –	Médias e respectivos intervalos de confiança de 95% da FVCI segundo as etiologias das miocardiopatias e do grupo controle	31
Gráfico 8 –	Curvas de sobrevida em relação à mediana da FVCI em pacientes com miocardiopatias dilatada	32
Gráfico 9 –	Curvas de sobrevida em relação à mediana da FVCI em pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática	33
Gráfico 10 –	Curvas de sobrevida em relação à mediana da FVCI em pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica	34
Gráfico 11 –	Diagrama de dispersão da FVCI e da FEVE em pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica	35
Gráfico 12 –	Diagrama de dispersão da FVCI e da FEVE em pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática	36

Figura

Figura 1 -	Fotomicrografia do miocárdio de paciente do grupo controle, grupo com miocardiopatia chagásica e do grupo com miocardiopatia dilatada idiopática. Coloração com <i>picrosirius red</i>	30
------------	--	----

Resumo

NUNES, V.L. **O papel do acúmulo do colágeno miocárdico intersticial na sobrevida dos pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e chagásica.** São Paulo, 2004.
Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

As miocardiopatias dilatadas representam 87% das miocardiopatias e apresentam evolução adversa com grande morbi-mortalidade. Vários marcadores de prognóstico são bem definidos, entretanto, um marcador estrutural se faz necessário. Estudamos através da realização da biópsia endomiocárdica e exame ecocardiográfico, 9 indivíduos sem doença estrutural miocárdica (controle) e 45 pacientes com miocardiopatia dilatada grave de etiologia idiopática (MCDI) e chagásica (MCDC). Observamos se havia relação entre a quantidade de colágeno miocárdico intersticial (FVCI) e a sobrevida destes pacientes, se a FVCI diferia entre as etiologias, e se a fibrose interferia na função e geometria do miocárdio. Observamos que a FVCI foi 15x maior nos miocardiopatas em relação ao grupo controle, mas não diferiu em relação às MCDI e MCDC (FVCI % MCDC = $6,83 \pm 5,47$; MCDI = $5,75 \pm 4,45$; controle = $0,42 \pm 0,14^*$; $p < 0,001$). Não houve relação da FVCI com a sobrevida dos pacientes com miocardiopatias (MCDI-FVCI $\leq 5,53$ (20,0%) ou $> 5,53$ (0,0%) ($p = 0,249$), e na MCDC-FVCI $\leq 5,53$ (0,0%) ou $> 5,53$ (7,7%) ($p = 0,587$) e apenas na MCDI a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) teve relação com a FVCI. O diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo não se correlacionou com a FVCI nas duas etiologias. Conclusão: a fibrose miocárdica não diferiu entre as duas etiologias, não se correlacionou com o prognóstico das MCDC e MCDI e apenas na MCDI ela se correlacionou com a FEVE.

Summary

NUNES, V.L. The role of myocardial interstitial collagen in the survival rate of patients with idiopathic and chagasic cardiomyopathy. São Paulo, 2004. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Dilated cardiomyopathies represent 87% of all cardiomyopathies and they have adverse prognosis with high morbidity and mortality. There are several prognostic markers, however, a structural one has not been described yet. Seems to be very important to find out whether morphological changes upon myocardial structure would affect the prognosis. We studied, using endomyocardial biopsy and 2D-echocardiogram, 9 patients with no structural myocardial changes (control) and 45 patients with severe dilated cardiomyopathies. They were divided according the etiology of cardiomyopathy into idiopathic group (IDCM) or Chagas group (CDCM). We analyzed the correlation between interstitial myocardial collagen (ICVF) and survival rates. We also evaluated the difference of ICVF between these groups and whether it correlates with geometric and functional changes of the heart. We observed that ICVF was 15 times higher in cardiomyopathies patients than in control group, but it did not differ between CDCM and IDCM (ICVF% CDCM = 6.83 ± 5.47 ; IDCM = 5.75 ± 4.45 ; control = $0.42 \pm 0.14^*$; $p < 0.001$). The ICVF did not correlate to survival rate in cardiomyopathies patients (IDCM-ICVF ≤ 5.53 (20.0%) or > 5.53 (0.0%) ($p = 0.249$), and CDCM-ICVF ≤ 5.53 (0.0%) or > 5.53 (7.7%) ($p = 0.587$). We observed a significant correlation between ICVF and left ventricular ejection fraction (LVEF) only on DMC, the ICVF did not correlate to left ventricular diastolic diameter in either etiology. Conclusion: the myocardial fibrosis did not differ between these two etiologies, it did not correlate to prognosis either in the IDCM or CDCM and only in the IDCM the ICVF correlated to the LVEF.

Introdução

A miocardiopatia dilatada é uma doença primária ou secundária do miocárdio, caracterizada por dilatação do ventrículo esquerdo ou biventricular e perda da contratilidade miocárdica. Ela representa aproximadamente 87% das miocardiopatias. Esta definição segue os critérios da Organização Mundial de Saúde, da Sociedade Internacional e Federação de Cardiologia (OMS/SIFC) ¹. A apresentação clínica é geralmente de uma síndrome de insuficiência cardíaca (IC) progressiva, além de arritmias, tromboembolismos e morte súbita, que podem ocorrer em qualquer estágio da doença. Após a manifestação de IC, 50% dos pacientes sobrevivem cinco anos e 25% deles estarão vivos em dez anos. Nos estágios mais avançados a sobrevida é de 50% em dois anos ². Os achados histológicos do miocárdio são geralmente inespecíficos e podem variar com a etiologia, representados por: hipertrofia dos cardiomiócitos, perda das miofibrilas, infiltrado intersticial inflamatório difuso e fibroses intersticial e perivascular com distribuição heterogênea ³. As miocardiopatias dilatadas têm várias etiologias, e foram enfocadas neste estudo apenas a idiopática e a chagásica.

A miocardiopatia dilatada idiopática (MCDI) é aquela de origem desconhecida, excluídas as causas secundárias: hipertensão arterial, doenças coronarianas, valvares, congênitas, miocardite, hipertensão pulmonar e dilatação do ventrículo direito isolada. A primeira descrição de miocardiopatia dilatada primária foi feita em 1901, por Josserand e Gallavardin, que também notaram a sua má evolução ⁴. Nos EUA, sua incidência é de cinco a oito/100.000 habitantes na população geral, o que representa um quarto das miocardiopatias dilatadas, com prevalência ajustada à idade de 36/100.000 na população geral, sobrevida em cinco anos de 25% a 65%, conforme o estágio evolutivo, e mortalidade anual de 10.000 casos ^{3, 5-7}. A patogenia pode estar associada a fatores familiares e genéticos, alterações imunológicas, participação de agentes virais e de outros insultos

citotóxicos. O quadro histológico das MCDI é inespecífico, com alterações estruturais e geométricas do coração.

A miocardiopatia dilatada chagásica (MCDC) é considerada uma doença inflamatória secundária à infecção de um parasita, o *Trypanosoma cruzi*. Dados da Organização Mundial de Saúde revelam que cerca de 90 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, sendo a incidência em 1995, de 120 mil novos casos de infecção pelo parasita ⁸. Na América Latina, há 16 a 18 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* e, no Brasil, estes valores chegam a quatro milhões de indivíduos ⁹. A MCDC é responsável por aproximadamente 15% dos casos de pacientes com IC atendidos em hospitais do estado de São Paulo e é a indicação mais freqüente de implante de marca-passo em nosso país. Através da utilização das técnicas de imunoperoxidase e da reação de cadeia de polimerase (PCR) , alguns trabalhos têm referido a alta freqüência do parasita nas formas crônicas da doença de Chagas, o que sugere a possibilidade da ação direta do parasita na inflamação miocárdica da MCDC ¹⁰. Por outro lado, a participação auto-imune ainda não é totalmente esclarecida, mas fundamenta-se: 1) no intervalo de 5 a 30 anos entre a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e a manifestação da doença cardíaca; 2) na transferência passiva das lesões cardíacas pelos linfócitos T (CD4) de ratos infectados pelo parasita a ratos não infectados; 3) na presença de infiltrado inflamatório difuso rico em linfócitos T. A teoria imunológica implica que este infiltrado de linfócitos T seja o agente efetor da lesão tecidual, funcionando através do mecanismo de “mimetismo antigênico”, havendo reação cruzada dos linfócitos T com uma proteína do *Trypanosoma cruzi* altamente antigênica, com estrutura semelhante à de um componente específico do miocárdio – a cadeia pesada da miosina – a qual representa a proteína mais abundante no miocárdio ^{11, 12}. Assim, os linfócitos T, reagindo de forma cruzada com a cadeia pesada da

miosina cardíaca, produziram citocinas inflamatórias (IFN-gama/TNF-alfa) capazes de estabelecer uma inflamação do tipo hipersensibilidade tardia, representada pela miocardite crônica. A principal característica do tecido cardíaco na MCDC é uma miocardite difusa, na qual há destruição dos cardiomiócitos com substituição por fibras de colágeno que formarão a fibrose, associada a um infiltrado inflamatório difuso, composto principalmente por macrófagos e linfócitos T ¹³.

Como a IC é a principal manifestação das miocardiopatias dilatadas, muitas das informações referentes a essa doença estão inseridas na IC. Segundo os dados americanos, no ano de 2003, a prevalência da IC foi de 4.900.000 pessoas acometidas, com incidência de 500.000 casos novos/ano, mortalidade de 300.000 indivíduos, 999.000 hospitalizações por IC com custo anual de US\$ 24.3 bilhões. Não existem dados exatos sobre a doença em nosso país. Entretanto, segundo o DATASUS de 1997, a IC é a principal causa de hospitalização por doenças cardíacas, com custo de tratamento de 150 milhões de reais ao Governo, o equivalente a 4,6% do total das despesas com hospitalizações ¹⁴. Assim, podemos considerá-la uma doença grave, freqüente e de alto custo sócio - econômico. Além desse impacto social e econômico, a IC representa uma entidade clínica com prognóstico reservado, com aumento de até 18 vezes o risco de morte comparado com indivíduos da mesma idade e sexo. De 1979 a 2000, houve um aumento de 148% na mortalidade e 165% na hospitalização por IC nos EUA ^{2, 15}, possivelmente devido ao envelhecimento da população e à melhora no tratamento de doenças como a hipertensão arterial e doenças coronarianas.

Os dados epidemiológicos das miocardiopatias e os de sua principal manifestação - a IC -- mostram que os marcadores de prognóstico são fundamentais e necessários para definir grupos de alto risco que necessitem de tratamento específico – procedimentos cirúrgicos como o transplante cardíaco, a cardiomioplastia, a reconstrução do ventrículo

esquerdo e troca valvar --; ou até para contra-indicar tais realizações^{16, 17}. São descritos na literatura inúmeros marcadores de prognóstico, importantes para otimizar o tratamento daqueles com pior evolução.

Fatores clínicos como preditores de prognóstico são bem descritos. Os dados do *Framingham Heart Study* e outros estudos epidemiológicos revelaram que a hipertensão arterial, independentemente dos seus níveis pressóricos, é o fator etiológico mais importante associado ao surgimento dos sintomas de IC, e que a hipertrofia do ventrículo esquerdo é o maior preditor para fatalidades cardiovasculares, aumentando o risco de desenvolver IC em duas a cinco vezes¹⁸⁻²². Também em relação à etiologia, diversos estudos mostraram que a miocardiopatia isquêmica apresenta pior evolução, com sobrevida de 54% em um ano comparada com 77% nas não isquêmicas²³, e com menor resposta terapêutica à amiodarona, digoxina, amilodipina e bisoprolol em relação às não isquêmicas²⁴. A miocardiopatia isquêmica foi considerada como fator independente de prognóstico. Por outro lado, Bocchi observou, em pacientes com IC grave, que a etiologia chagásica apresentava maior mortalidade em relação à idiopática e isquêmica¹⁷. Felker *et al.* realizaram intensa investigação etiológica, incluindo biópsia endomiocárdica, em pacientes com miocardiopatia dilatada de causa não determinada e evidenciaram que diferentes etiologias poderiam justificar diferentes evoluções²⁵. Ainda, o *Framingham Heart Study* e outros estudos mostraram que a mortalidade da IC aumenta com a idade e que o sexo masculino tem pior evolução, com sobrevida média de 1,7 anos comparada a 3,2 anos em mulheres, mas nos pacientes idosos não há diferença entre os sexos^{26, 27}. O estudo *Flofan International Randomized Survival Trial* (FIRST) mostra a relação entre sexo e etiologia em IC grave, evidenciando que mulheres tinham melhor evolução apenas nas etiologias não isquêmicas²⁸.

Os fatores relacionados à capacidade funcional também são importantes sinalizadores de prognóstico. A avaliação subjetiva da classe funcional pelos critérios da *New York Heart Association* é muito utilizada, tanto na prática clínica como em estudos clínicos e está relacionada ao prognóstico das miocardiopatias de forma não independente. O teste de 6 minutos é mais objetivo para avaliação clínica funcional, mas a medida do consumo de oxigênio durante o pico do exercício (VO₂max) é uma medida objetiva, quantitativa e um fator independente no prognóstico dos pacientes com miocardiopatia dilatada e IC ¹⁶. Assim, muitos estudos já demonstraram que o VO₂max é uma variável independente em prever a evolução desses pacientes, considerado um dos critérios para a indicação de transplante cardíaco nesta doença ^{16, 30}. Mady *et al.* avaliaram o valor preditivo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), VO₂max e capacidade funcional na evolução de pacientes com MCDC de gravidade variável. Através de análise multivariada, a FEVE e a VO₂max mostraram-se independentes, sendo a VO₂max um forte preditor e a FEVE, preditiva apenas quando muito rebaixada (FEVE <30%) ³¹.

Fatores que definem a função miocárdica no coração como bomba também são marcadores da evolução de indivíduos com miocardiopatia dilatada e IC. A FEVE é uma medida quantitativa da função sistólica dessa câmara e há muito considerada um fator de prognóstico importante e bastante utilizado ^{16, 27, 30-34}.

Marcadores bioquímicos também têm importância como fatores de prognóstico. Desde 1984, com os trabalhos de Cohn *et al.* ³⁵, os níveis séricos de noradrenalina estão relacionados ao prognóstico dos pacientes com IC, independente da sua etiologia, o que mostra este marcador ser mais sensível que os índices hemodinâmicos, havendo pouca relação com a FEVE. Outro trabalho de Cohn *et al.*, em pacientes com IC grave, mostrou que

naqueles com noradrenalina plasmática menor que 600 pg/ml a sobrevida em um ano foi de 76%, e naqueles com valores maiores que 600 pg/ml esta foi de 40% ³⁰. Além da estimulação simpática com aumento da noradrenalina, outros fatores neuro-hormonais também vêm sendo utilizados no seguimento da IC, como: a endotelina, a angiotensina, a aldosterona, mediadores inflamatórios, citocinas, fatores de crescimento, peptídeos natriuréticos e outros. Esses fatores neuro-hormonais são de fundamental importância na progressão das miocardiopatias dilatadas, provocando alteração na estrutura molecular, celular, geométrica e funcional do coração, agindo por diferentes mecanismos e com diferentes intensidades de acordo com a etiologia. Um ponto em comum da ação desses mediadores é a perda de miócitos, proliferação de células não miocíticas e acúmulo não adequado de colágeno no interstício do miocárdio, que caracteriza o remodelamento cardíaco. Este é responsável pela progressão das doenças cardíacas e surgimento da IC e se manifesta pela dilatação da câmara cardíaca, afinamento e aumento do estresse de suas paredes.

O miocárdio é composto por fibras musculares (cardiomiócitos) ocupando 75% do seu espaço, enquanto dois terços de todas suas células são não miocíticas, e formam o interstício, que é constituído por um material amorfo onde são encontrados: fibras de colágeno e elastina, fibroblastos, macrófagos, células musculares lisas e as células endoteliais dos vasos intramiocárdicos. Os fibroblastos e miofibroblastos são células cardíacas que contêm a expressão gênica para a síntese e degradação de colágeno. A maior proteína estrutural da matriz extracelular é a fibra de colágeno, predominando no miocárdio os colágenos tipos I e III. O colágeno tipo I, representado por fibras grossas, é o responsável pela tensão de estiramento do miocárdio e constitui 85% dessas fibras ³⁶, e sua concentração determina o endurecimento e a formação do esqueleto do miocárdio ^{21, 37}. O colágeno tipo III

representa uma fina rede e é mais distensível que o colágeno tipo I. A relação de colágeno tipo I:III encontrada no miocárdio de primatas não humanos normais é 7:4 e em ratos 3,5:1 ²¹. Essas fibras formam os folhetos e anéis das valvas cardíacas, cordoalhas tendíneas e se estendem através do miocárdio e ao redor dos vasos intramiocárdicos, organizando a arquitetura do coração. Elas formam uma estrutura bem definida e são segregadas em três compartimentos: 1) o epimísio, composto por fibras de colágeno encontradas ao longo da superfície endocárdica e epicárdica, logo abaixo das células endoteliais da lâmina basal e protegem as fibras miocárdicas e os sarcômeros do excesso de dilatação do miocárdio (*overstretched*); 2) o perimísio, que surge a partir do epimísio e das cordoalhas tendíneas, estende-se pelos espaços intermusculares, circundando grupos de miócitos, e conectam miócitos vizinhos prevenindo bandas musculares de ficarem mal alinhadas, enquanto facilitam a transmissão das forças de contração para toda a câmara cardíaca; 3) o endomísio, que forma uma camada de tecido conjuntivo ao redor do miócito individualmente, enquanto conecta miócitos uns aos outros e a capilares sanguíneos e linfáticos vizinhos, mantendo as fibras musculares cardíacas alinhadas. Assim, estas fibras de colágeno desempenham múltiplas funções: servindo para manter o alinhamento dos miócitos a cada ciclo cardíaco, interconectam miócitos entre si para facilitar a transmissão de forças geradas para toda a câmara cardíaca, estocam energia durante a contração miocárdica para o seu relaxamento e o realinhamento dos miócitos e dão sustentação aos vasos coronarianos dentro do interstício cardíaco ³⁸.

Na hipertrofia ventricular, ocorre crescimento dos cardiomiócitos com aumento não proporcional da quantidade de fibras de colágeno, chamada de hipertrofia ventricular patológica. Esta difere da hipertrofia fisiológica, na qual ocorre crescimento proporcional das fibras de colágeno, encontrada em: atletas, pacientes com anemia, hipertireoidismo e fístulas

artério-venosas. O estímulo para a hipertrofia dos cardiomiócitos depende de fatores hemodinâmicos, ocorrendo precocemente e é auto-limitado; já o crescimento da matriz extracelular, preferencialmente das fibras de colágeno, independe de fatores hemodinâmicos e é secundário a fatores hormonais, inicia-se mais tardiamente e é um evento progressivo ³⁹. Desde que a fibrose foi vista em ambos os ventrículos, apesar de suas diferenças de sobrecargas hemodinâmicas, os fatores de crescimento circulantes ou hormonais foram responsabilizados pelo aumento de colágeno dentro do miocárdio. No miocárdio, há dois tipos de fibrose: a reativa e a reparativa. A fibrose reparativa é aquela secundária à perda do miócito, e a reativa é estimulada pelo aumento dos níveis de mediadores do estímulo da síntese e redução na degradação de colágeno ⁴⁰. O acúmulo de colágeno no perimísio e no endomísio torna as fibras de colágeno intersticiais cada vez mais densas, o que leva ao encarceramento das fibras musculares, dificulta o seu estiramento, reduz a formação da força de contração, e propicia o aparecimento da atrofia e necrose das fibras miocárdicas, acarretando disfunção diastólica e sistólica. Weber *et al.* ^{21, 38, 41} demonstraram, em estudos experimentais, a história natural do remodelamento cardíaco. Na hipertrofia do ventrículo esquerdo secundária à hipertensão arterial renovascular em modelos de ratos, há estímulo do sistema renina-angiotensina-aldosterona, inicialmente com maior permeabilidade dos vasos coronarianos, levando ao edema intersticial. A partir de quatro semanas, há resolução deste edema, desaparecimento das fibras de colágeno intersticiais finas e aumento das fibras de colágeno na adventícia das artérias e arteríolas coronarianas intramiocárdicas. Desta localização, fibras de colágeno começam a radiar para os espaços intermusculares vizinhos e, após oito semanas, já existe fibrose intersticial difusa, tornando o perimísio mais denso, circundando grupos de miócitos, dando um aspecto lobulado ao miocárdio.

As miocardiopatias dilatadas formam um grupo heterogêneo de doenças de etiologia multifatorial. O miocárdio é uma estrutura simples e, até o momento, conhece-se uma limitada resposta a grandes variedades de insultos, representada principalmente por fibrose intersticial e perivascular e hipertrofia dos cardiomiócitos. Assim, o estágio final das lesões observadas nos tecidos obtidos de necrópsias pode fornecer pouca informação sobre as mudanças estruturais que ocorrem nos estágios mais precoces ou sobre a etiologia da doença. Por essa razão, a realização da biópsia endomiocárdica nas fases mais precoces dessas miocardiopatias oferece uma oportunidade única para o estudo de sua patogenia. Em 1958, Weinberg *et al.*⁴² e, em 1964, Sutton *et al.*⁴³ realizaram as primeiras biópsias endomiocárdicas através da toracotomia. Já na década de 60, Sutton e Sutton⁴⁴ concomitante a Bercu *et al.*⁴⁵ e, em 1972, Shirey *et al.*⁴⁶ desenvolveram várias formas de acesso percutâneo ao miocárdio, mas todas associadas a altos índices de complicações. As biópsias endomiocárdicas intracardiacas no septo interventricular, reportadas por Bulloch *et al.*⁴⁷, em 1965, apresentavam poucas complicações e forneciam material suficiente para as análises histológicas. Em 1962, Sakakibara e Konno⁴⁸ desenvolveram um biótomo endomiocárdico, sendo possível obter, com segurança, amostras teciduais de todas as regiões das câmaras cardíacas. Em 1974, Richardson⁴⁹ desenvolveu o biótomo King, mais flexível e de menor tamanho, utilizado ainda hoje. Atualmente, as indicações para a realização da biópsia endomiocárdica são: monitorizar a rejeição de transplante cardíaco e confirmar cardiotoxicidade a drogas como a antraciclina e doxarrubicina. Indicações possíveis ainda são detectar e monitorizar miocardite, diagnosticar doenças infiltrativas e diferenciar doenças cardíacas restritivas das constrictivas.

Diversos estudos têm proposto o uso da biópsia endomiocárdica como parte da investigação das miocardiopatias de origem não explicável. De 1982 a 1991, no serviço de

cardiomiopatias do *The Johns Hopkins Hospital*, pacientes não selecionados com miocardiopatia dilatada foram submetidos a intensa investigação clínica e histológica, e a biópsia endomiocárdica contribuiu para o diagnóstico em 17% dos casos⁵⁰, o mesmo sendo observado por outros estudos^{25, 51,52}. Unverferth *et al.*⁵³ analisaram biópsias endomiocárdicas de pacientes com miocardiopatia dilatada de diferentes etiologias, e encontraram correlação entre o aumento da quantidade de fibrose no miocárdio e o tamanho dos cardiomiócitos ($p < 0,005$) e entre a quantidade de colágeno e o tamanho dos cardiomiócitos com a FEVE ($p < 0,05$). Nenhum dos dados histológicos mostrou correlação com a duração dos sintomas. Assim, a fibrose miocárdica e a hipertrofia dos cardiomiócitos foram maiores na IC mais grave. Pelliccia *et al.*⁵⁴, em pacientes com MCDI na fila de transplante cardíaco que realizaram biópsia endomiocárdica, observaram que a redução da fração de volume da miofibrila e o aumento da área nuclear foram variáveis independentes associadas a pior prognóstico. Da mesma forma, Figulla *et al.*⁵⁵ observaram, em MCDI, relação entre menor fração de volume da miofibrila e pior evolução clínica. Assim como esses, outros trabalhos mostraram a mesma associação^{56,57}. Schwarz *et al.*⁵⁹, em 1982, estudando biópsias endomiocárdicas de pacientes com MCDI, encontraram relação inversa entre FEVE e a fibrose miocárdica, sugerindo que a fibrose determina disfunção contrátil na MCDI. Novamente, Unverferth *et al.*⁶⁰, estudando pacientes com miocardiopatia não isquêmica, observaram que aqueles com maior fibrose miocárdica tinham maior índice de mortalidade, mas sem valor significativo.

Considerando que a disfunção sistólica e diastólica do miocárdio pode estar relacionada com alterações estruturais afetando os cardiomiócitos e a matriz extracelular, parece relevante identificar variáveis morfológicas nos tecidos cardíacos, capazes de expressar a perda funcional do miocárdio. A correlação entre os achados histológicos e

alterações clínicas e hemodinâmicas têm sido avaliadas por muitos trabalhos. Mattos *et al.*⁶¹ estudaram pacientes com MCDI, e não encontraram correlação dos dados histológicos (hipertrofia dos cardiomiocitos e fibrose intersticial) com a FEVE, pico de velocidade da onda E, relação E/A e tempo de desaceleração da onda E. Também Grimm *et al.*⁶² em pacientes com MCDI, não observaram associação entre os achados morfométricos das biópsias endomiocárdicas com eventos arrítmicos de grande complexidade e a sobrevida desses pacientes. Por outro lado, Mady *et al.*⁶³ encontraram fibrose significativa no miocárdio de pacientes com MCDC, e houve correlação entre a fibrose intersticial com as variáveis de disfunção diastólica e sistólica, propondo que, com o remodelamento miocárdico, há diminuição da eficácia e geração da força de contração miocárdica, devido à distorção geométrica e à nova organização do miocárdio. Assim, o desempenho cardíaco seria negativamente associado com fibrose intersticial na MCDC, e a magnitude desta disfunção relacionada à quantidade de fibrose miocárdica. Barretto *et al.*⁶⁴, estudando pacientes com doença de Chagas, observaram que a quantidade de fibrose miocárdica foi menor nas formas indeterminadas comparadas às formas de miocardiopatia dilatada, sugerindo que as lesões miocárdicas nesta patologia representam um processo contínuo com destruição de fibras cardíacas e substituição por fibrose, levando a disfunção miocárdica.

Portanto, faz-se importante avaliar o papel do colágeno miocárdico intersticial como marcador prognóstico nestas duas etiologias, uma inflamatória — a miocardiopatia dilatada chagásica, e a outra de causa desconhecida — a miocardiopatia dilatada idiopática.

Dessa forma, a partir dos dados descritos, nossa hipótese é que a quantidade de colágeno miocárdico intersticial teria papel relevante na sobrevida dos pacientes com miocardiopatia dessas duas etiologias, e que a quantidade de colágeno miocárdico intersticial

seria ainda maior na miocardiopatia dilatada chagásica, visto que o seu prognóstico relaciona com pior ¹⁷.

Objetivos

Avaliar, como objetivo primário, se há correlação entre a quantidade de colágeno miocárdico intersticial e a sobrevida dos pacientes com miocardiopatia dilatada grave idiopática e chagásica.

Como objetivos secundários:

- 1) verificar se a quantidade de colágeno intersticial do miocárdio difere quanto à etiologia chagásica e idiopática;
- 2) correlacionar a quantidade de colágeno miocárdico intersticial com a fração de ejeção e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Casuística e Métodos

A) Casuística

3. Seleção de pacientes

Este é um estudo de coorte, retrospectivo, realizado na Unidade Clínica de Miocardiopatias do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Foram revistos, através do registro de biópsia endomiocárdica e do levantamento de prontuário hospitalar, os diagnósticos de pacientes que realizaram biópsia endomiocárdica no período de 1981 a 1998, totalizando 1406 casos, excluídos aqueles de seguimento de transplante cardíaco. Desses, foram selecionados aqueles com diagnóstico de miocardiopatia dilatada de etiologia idiopática (n = 116) e chagásica (n = 126). As indicações de biópsia endomiocárdica na época foram variadas, desde a confirmação diagnóstica e detecção de miocardite, até protocolos de pesquisa no referido período. Aplicados os critérios de inclusão e de exclusão foram incluídos no estudo 19 pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e 26 com miocardiopatia chagásica. Desse grupo, foram coletados do prontuário os parâmetros de FEVE e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) até dois meses da realização da biópsia endomiocárdica.

Para o diagnóstico das miocardiopatias, foram seguidos os critérios da OMS/SIFC¹. As miocardiopatias dilatadas idiopáticas são aquelas de causa desconhecida, sendo excluídas as causas secundárias, como: hipertensão arterial, doenças coronarianas, valvares, congênitas, miocardite, hipertensão pulmonar e dilatação de ventrículo direito isolado. A miocardiopatia dilatada chagásica é definida como doença inflamatória do miocárdio associada a disfunção miocárdica, secundária à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* diagnosticada através da sorologia positiva (imunofluorescência e reação de fixação do complemento). Informações sobre as mortes foram obtidas dos registros hospitalares,

atestados de óbito, contato telefônico com familiares e de prontuário hospitalar, quando ocorrido em nossa instituição.

1.1. Critérios de inclusão

Os pacientes foram submetidos aos seguintes critérios de inclusão:

- uso de fármacos inibidores da enzima de conversão da angiotensina, no mínimo quatro meses antes da realização da biópsia endomiocárdica e durante todo o seu seguimento;
- cinecoronariografia normal no grupo idiopático e naqueles com mais de dois fatores de risco para doença coronariana no grupo chagásico;
- sorologia para doença de Chagas (imunofluorescência e reação de fixação do complemento) positiva, ou negativa no grupo idiopático;
- laudo do ecocardiograma com até dois meses da realização da biópsia endomiocárdica, com FEVE menor ou igual a 0,40 pelo método Teichholz.

1.2. Critérios de exclusão

- miocardiopatia isquêmica, afastada pela cinecoronariografia com redução do diâmetro da artéria coronariana epicárdica maior ou igual a 25%, história de infarto do miocárdio ou submetidos a revascularização miocárdica;
- doenças cardíacas: congênita, miocardiopatia hipertrófica, de depósito, endomiocardiofibrose, valvopatia primária, excluídas pelos dados clínicos e ecocardiográficos;
- início de IC durante a gestação e até seis meses após o parto;

- hipertensão arterial sistêmica, pela medida da pressão arterial maior ou igual 140/90 mmHg aferida em mais de duas ocasiões;
- doença sistêmica envolvendo o miocárdio;
- exposição prévia a substâncias cardiotoxícas como doxorubicina e álcool (definida como ingestão de mais de 80g de álcool ao dia por mais de 10 anos ⁶⁵;
- miocardite, exceto a secundária pela doença de Chagas, afastada pela história clínica, sorologia para doença de Chagas negativa e ausência dos critérios de Dallas ⁶⁶ nos achados da biópsia endomiocárdica;
- insuficiência renal, definida como nível de creatinina sérica >2,0 mg/dl;
- pacientes submetidos a transplante cardíaco e/ou a cardiomioplastia;
- pacientes que perderam seguimento ambulatorial.

O estudo iniciou no momento da realização da biópsia endomiocárdica do paciente e terminou com o evento morte ou o seguimento do paciente até julho de 2003.

4. Grupo Controle

Para comparação dos resultados da quantidade de colágeno intersticial no miocárdio e dos dados ecocardiográficos de DDVE e FEVE, foi constituído um grupo controle de nove pacientes que tinham indicação cirúrgica de revascularização miocárdica em oito e exérese de mixoma de átrio esquerdo em um paciente. Foram considerados critérios de exclusão: infarto do miocárdio prévio, definido pela história clínica e ausência de hipocontratilidade segmentar do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma, disfunção

ventricular, valvopatia primária e medida da pressão arterial maior ou igual a 140/90 mmHg aferida em mais de duas ocasiões.

B) Métodos

1. Dados ecocardiográficos

O exame de ecocardiograma com a utilização dos modos M (unidimensional), bidimensional e da técnica de Doppler foi realizado em todos pacientes com até dois meses do procedimento da biópsia endomiocárdica. Esses exames foram feitos na rotina do serviço de Ecocardiografia do Instituto do Coração HC-FMUSP, com os aparelhos disponíveis na Instituição. Conforme as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia, a medida do DDVE (em milímetros) foi obtida no final da diástole e o cálculo de função ventricular foi avaliado pela FEVE, sendo obtido pelo método Teichholz, rotina na Instituição para avaliar esta variável nas miocardiopatias dilatadas.

2. Biópsia endomiocárdica do ventrículo direito

Os pacientes foram submetidos à biópsia endomiocárdica do ventrículo direito, segundo as técnicas descritas por Mason ⁶⁷, com retirada de dois a quatro fragmentos do septo interventricular. Os fragmentos do grupo controle foram obtidos durante a cirurgia cardíaca, aproximadamente nas mesmas regiões do septo interventricular em que a biópsia é obtida por via percutânea.

3. Morfometria do colágeno

Os fragmentos foram colocados em formol a 10% para fixação e posterior inclusão em parafina. A partir dos blocos de parafina novos cortes de 5 μ m foram montados em lâminas e coradas pelo *picrosirius-red* para detecção e quantificação do colágeno intersticial.

As frações dos volumes de colágeno intersticial (FVCI) foram quantificadas por videomorfometria, utilizando-se um sistema de análise de imagens (*Quantimet 520 Image Analysis System-Cambridge Instruments, Cambridge, UK*). A quantificação da FVCI foi calculada pela razão entre a soma de todas as áreas coradas positivamente para colágeno e a área total do miocárdio. A fibrose perivascular e o endocárdio foram excluídos desta análise. As medidas foram feitas utilizando a microscopia óptica, com a objetiva de 10x. A morfometria foi realizada por dois observadores que não tinham conhecimento do quadro clínico dos pacientes. Cada parâmetro representa o valor médio de todas as medidas obtidas de cada tecido da biópsia. O número de campos analisados por tecido foi de 5 a 24, com média de doze campos, variando de acordo com o tamanho do tecido da biópsia.

4. Análise estatística

A análise de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e para comparação das curvas foi empregado o teste de *log-rank*. Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson (r) para avaliar a existência da correlação linear entre a quantidade de colágeno intersticial do miocárdio (FVCI) e a FEVE e com o DDVE. Para a comparação das médias da FVCI, FEVE e DDVE, segundo as duas etiologias de miocardiopatias, foram utilizados a análise de variância (ANOVA) e o teste Kruskal-Wallis (quando as variâncias não eram homogêneas). O teste de Tukey-HSD foi empregado para as múltiplas comparações.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ e os valores foram expressos como média e desvio padrão.

Resultados

A) Aspectos demográficos

Foram estudados 19 pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática (16 do sexo masculino; idade de 19 a 63 anos), 26 pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica (23 do sexo masculino; idade de 21 a 61 anos) e nove pacientes constituíram o grupo controle (seis do sexo masculino; idade de 50 a 73 anos). A tabela 1 mostra as características demográficas dos pacientes e dos indivíduos do grupo controle e tempo de sobrevida dos pacientes (avaliado pelo número de dias), observando-se predomínio de pacientes do sexo masculino nos três grupos. O grupo controle foi constituído por indivíduos mais velhos, mas os pacientes miocardiopatas tinham a média de idade semelhante (MCDI 43 ± 3 e MCDC 42 ± 2 anos). Não foi analisada a sobrevida dos pacientes do grupo controle, pois estes apresentavam patologias diferentes. A sobrevida dos pacientes miocardiopatas foi maior no grupo idiopático variando entre 5 e 2281 dias (761 ± 165), e nos chagásicos entre 6 e 2166 dias (422 ± 109), porém sem significado estatístico ($p=0,145$) (tabela 1).

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DAS MIOCARDIOPATIAS IDIOPÁTICAS, CHAGÁSICAS E DO GRUPO CONTROLE E TEMPO DE SOBREVIDA

	MCDI (n=19)	MCDC (n= 26)	CONTROLE (n= 9)	p
Sexo masculino	16 (84%)	23 (89%)	6 (67%)	0,73
Idade (anos)	43 ± 3	42 ± 2	$64 \pm 3^*$	0,001
Tempo de sobrevida (dias)	761 ± 165	422 ± 109	-	0,145

B) Aspectos ecocardiográficos

Foram analisados os parâmetros de DDVE e da FEVE. Os valores das médias do DDVE encontrados nos grupos dos pacientes miocardiopatas foram maiores do que aqueles do grupo controle ($p < 0,001$), sendo maior nos pacientes com MCDI que o grupo com MCDC ($p=0,005$) (tabela 2 e gráfico 1). Em relação aos valores da FEVE, estes foram menores nos

grupos com miocardiopatia do que o grupo controle ($p < 0,001$) como mostra a tabela 3. Chama atenção a severidade do acometimento da função sistólica nos miocardiopatas, mostrando valores equivalentes entre as etiologias idiopática e chagásica (tabela 3).

TABELA 2 - MÉDIAS E RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO DE DDVE SEGUNDO A ETIOLOGIA DAS MIOCARDIOPATIAS E DO GRUPO CONTROLE

VARIÁVEL	ETIOLOGIA			p
	Chagásica	Idiopática	Controles	
DDVE	70,5 ± 6,6	78,3 ± 7,2	52,9 ± 12,5	<0,001

- Chagásica ≠ Controles ($p < 0,001$)
- Chagásica ≠ Idiopática ($p = 0,005$)
- Idiopática ≠ Controles ($p < 0,001$)

GRÁFICO 1 – MÉDIAS E RESPECTIVOS INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95% DO DDVE SEGUNDO AS ETIOLOGIAS DAS MIOCARDIOPATIAS E DO GRUPO CONTROLE

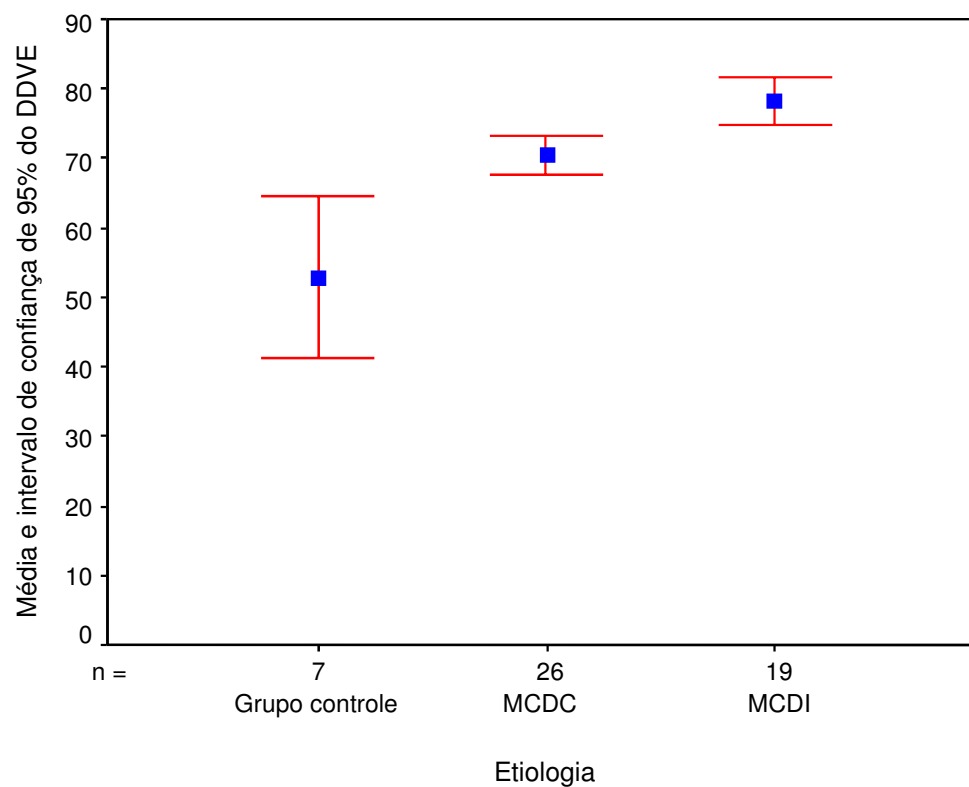


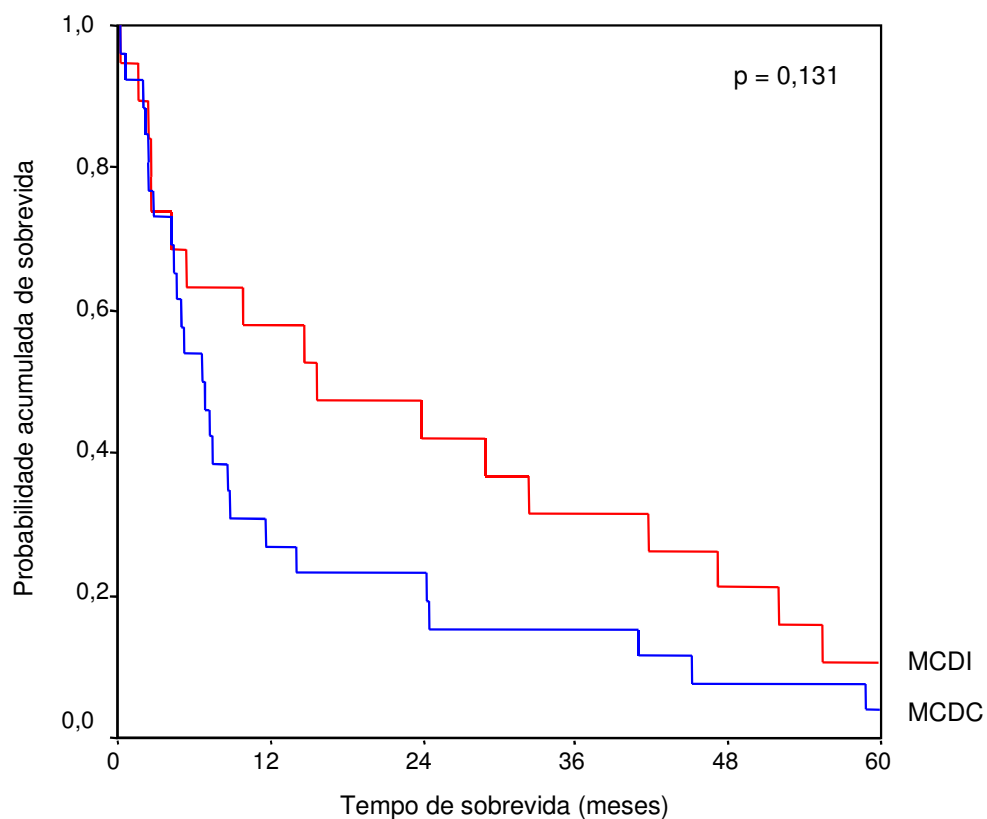
TABELA 3 - MÉDIAS E RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO DA FEVE SEGUNDO A ETIOLOGIA DAS MIOCARDIOPATIAS E DO GRUPO CONTROLE

VARIÁVEL	ETIOLOGIA			p
	Chagásica	Idiopática	Controles	
FEVE	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,69 ± 0,01*	0,001

C) Análise de sobrevida

Em relação à etiologia das miocardiopatias, não houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevida global em cinco anos nos pacientes com miocardiopatia chagásica (3,8%) em relação aos com miocardiopatia idiopática (10,5%) ($p=0,131$) (gráfico 2).

GRÁFICO 2 – CURVAS DE SOBREVIDA SEGUNDO AS ETIOLOGIAS DAS MIOCARDIOPATIAS



O diâmetro diastólico (DDVE) foi avaliado através da sua mediana (73mm). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevida global em cinco anos nos pacientes portadores de miocardiopatia chagásica com $DDVE \leq 73$ (5,3%) ou > 73 (0,0%) ($p=0,246$) (Gráfico 3). Também não houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevida global em cinco anos nos pacientes portadores de cardiomiopatia idiopática com $DDVE \leq 73$ (0,0%) ou > 73 (16,7%) ($p=0,269$) (Gráfico 4).

GRÁFICO 3 – CURVAS DE SOBREVIDA SEGUNDO A DDVE NOS PACIENTES COM MIOCARDIOPATIA DILATADA CHAGÁSICA

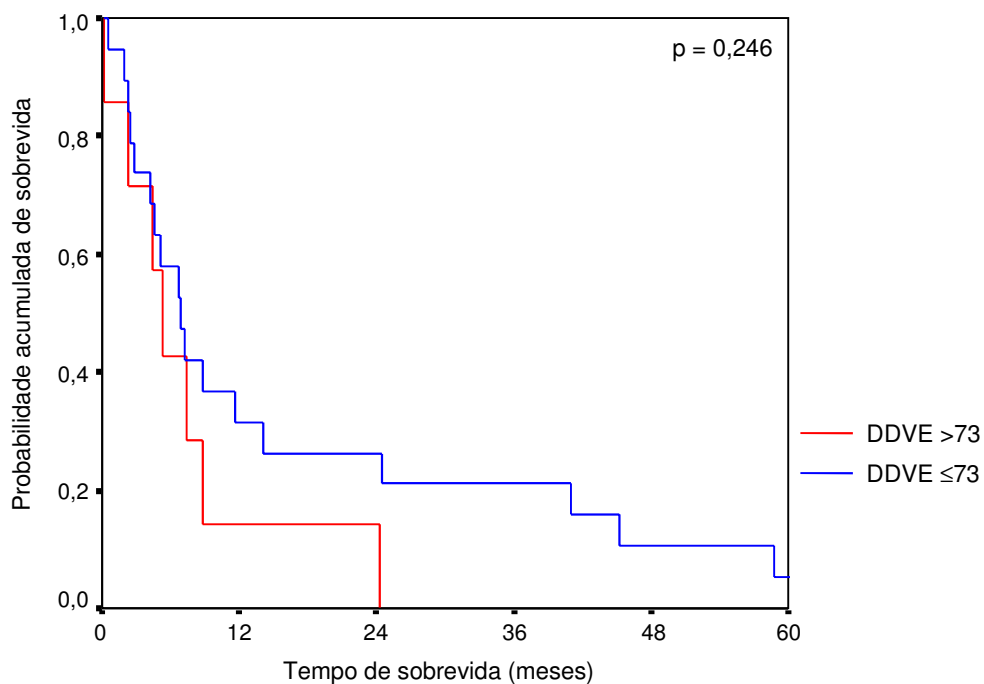
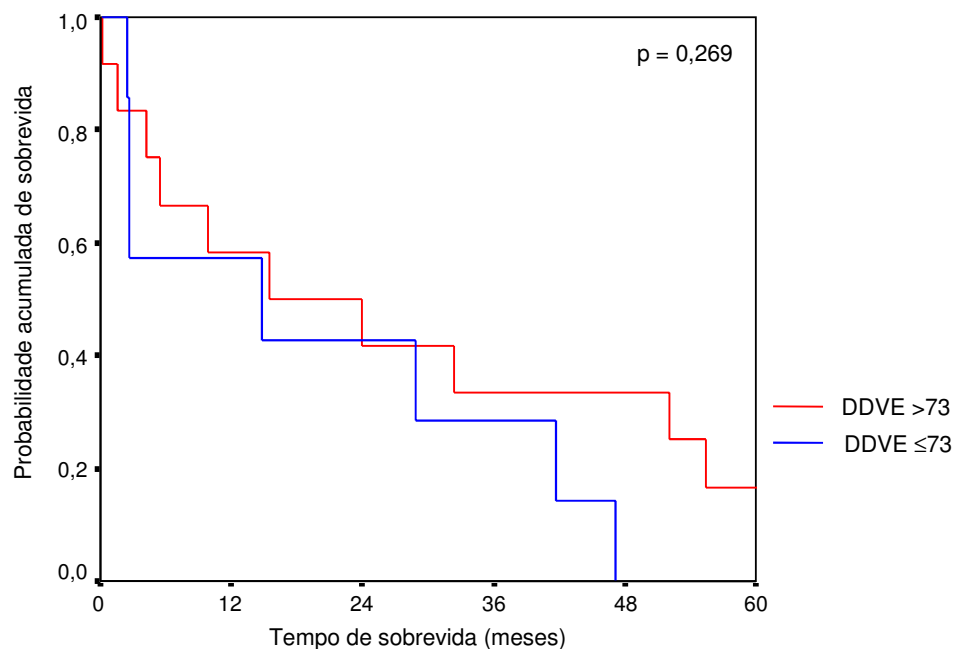


GRÁFICO 4 – CURVAS DE SOBREVIDA SEGUNDO A DDVE NOS PACIENTES COM MIOCARDIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA



Em relação à fração de ejeção (FEVE), não houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevivida global em cinco anos nos pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica com FEVE $\leq 0,30$ (0,0%) ou $> 0,30$ (7,7%) ($p=0,391$) (gráfico 5). Entretanto, no grupo com miocardiopatia dilatada idiopática, esta relação pode ser observada com menor sobrevivida nos pacientes com FEVE menor (FEVE $\leq 0,30$; 0,0%) ou $> 0,30$ (20,0%) ($p=0,031$) (gráfico 6).

GRÁFICO 5 – CURVAS DE SOBREVIDA SEGUNDO A FEVE NOS PACIENTES COM MIOCARDIOPATIA DILATADA CHAGÁSICA

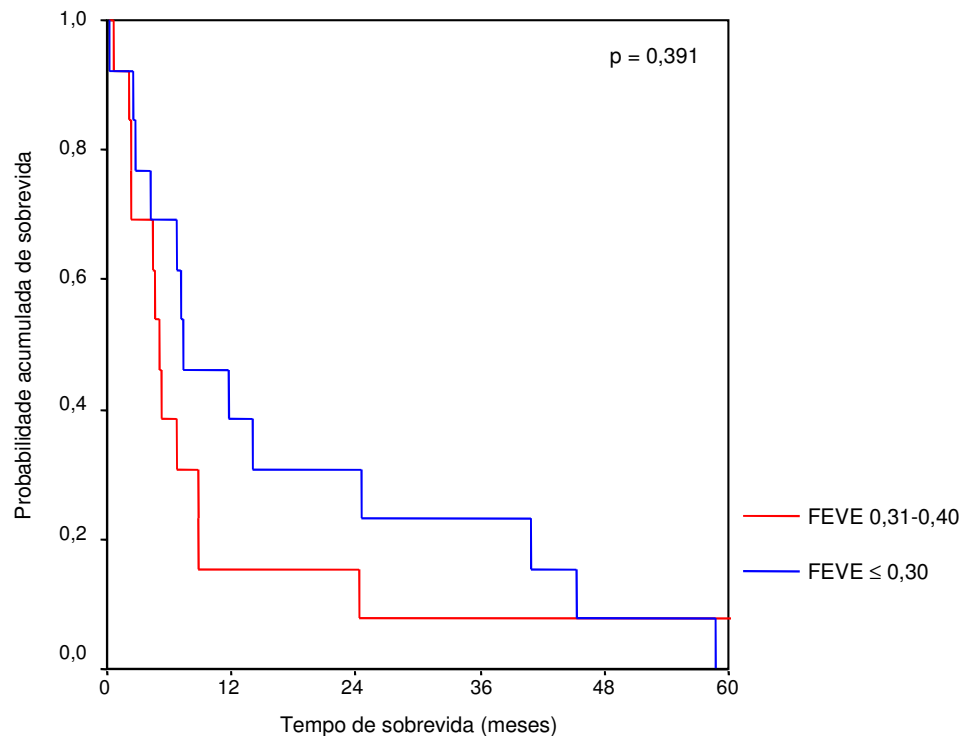
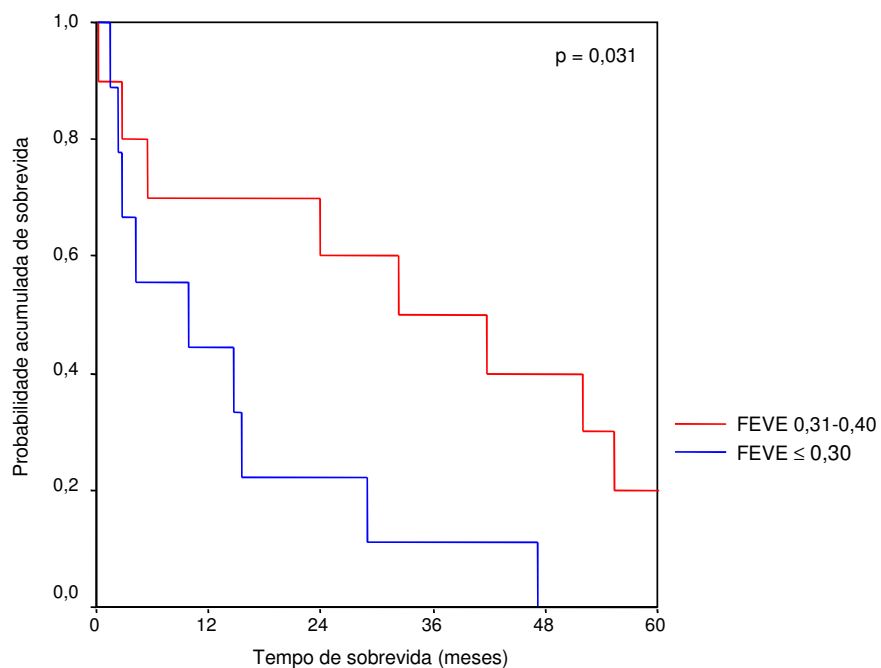


GRÁFICO 6 – CURVAS DE SOBREVIDA SEGUNDO A FEVE NOS PACIENTES COM MIOCARDIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA



D) Morfometria do colágeno

Analisando os tecidos provenientes de biópsia endomiocárdica por morfometria, observou-se aumento da quantidade de colágeno miocárdio intersticial nos grupos constituídos por miocardiopatas em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), mas esta diferença não foi significativa entre as duas etiologias ($p = 0,724$) (figura 1, tabela 4 e gráfico 7).

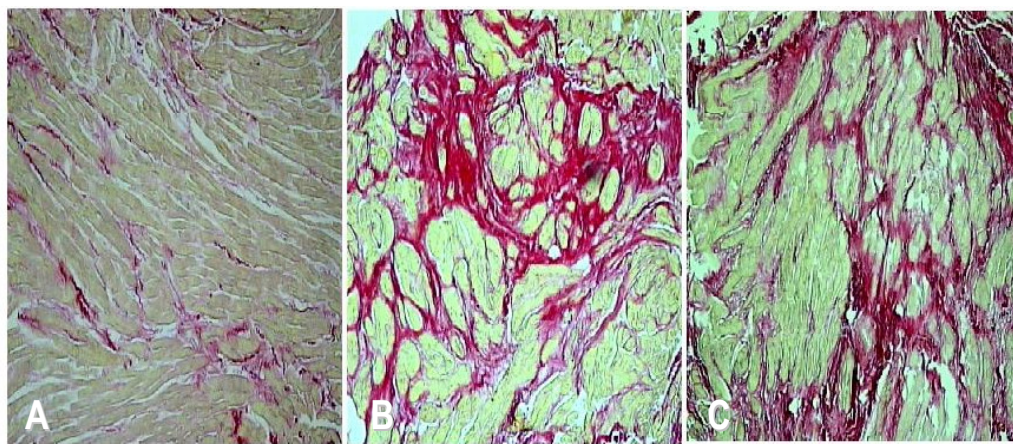
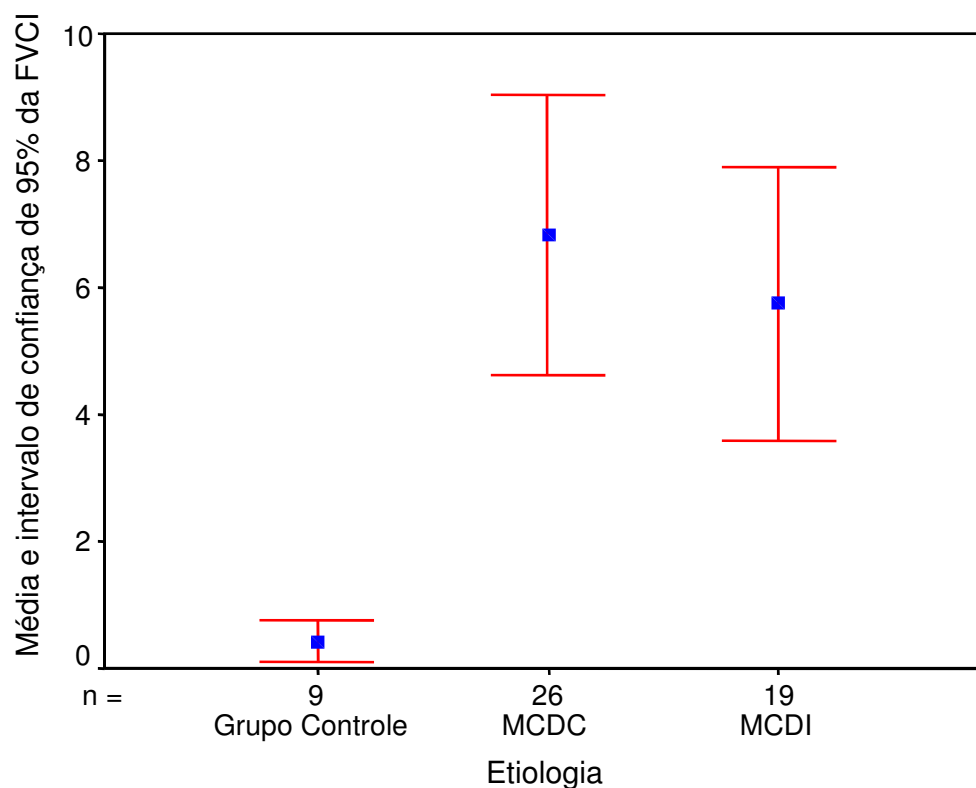


FIGURA 1 - Fotomicrografia do miocárdio de paciente do grupo controle (A), grupo com miocardiopatia chagásica (B) e do grupo com miocardiopatia dilatada idiopática (C). Coloração com *picrosirius red* - nota-se em vermelho o acúmulo de colágeno.

TABELA 4 – MÉDIAS E RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO DA FVCI SEGUNDO OS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS

VARIÁVEL	ETIOLOGIA			p
	Chagásica	Idiopática	Controles	
FVCI (%)	6,83 ± 5,47	5,75 ± 4,45	0,42 ± 0,14*	<0,001

GRÁFICO 7 – MÉDIAS E RESPECTIVOS INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95% DA FVCI SEGUNDO AS ETIOLOGIAS DAS MIOCARDIOPATIAS E DO GRUPO CONTROLE



E) Correlações com a FVCI

Avaliando a relação entre a quantidade de colágeno intersticial do miocárdio (FVCI) e a taxa de sobrevivência global em cinco anos dos pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e chagásica, não houve diferença estatisticamente significativa. Analisamos esta dissociação em relação à mediana da FVCI $\leq 5,53$ (8,7%) ou $> 5,53$ (4,5%) ($p=0,749$) (gráfico 8). Quando separamos os pacientes com miocardiopatia segundo as etiologias e comparamos a quantidade de colágeno miocárdico (mediana da FVCI) com a sobrevivência, também não encontramos diferença estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevivência global em cinco anos nos pacientes com FVCI $\leq 5,53$ (20,0%) ou $> 5,53$ (0,0%) ($p=0,249$) tanto

no grupo idiopático (gráfico 9), quanto no grupo chagásico com FVCI $\leq 5,53$ (0,0%) ou $>5,53$ (7,7%) ($p=0,587$) (gráfico 10).

GRÁFICO 8 – CURVAS DE SOBREVIDA EM RELAÇÃO À MEDIANA DA FVCI EM PACIENTES COM MIOCARDIOPATIAS DILATADA

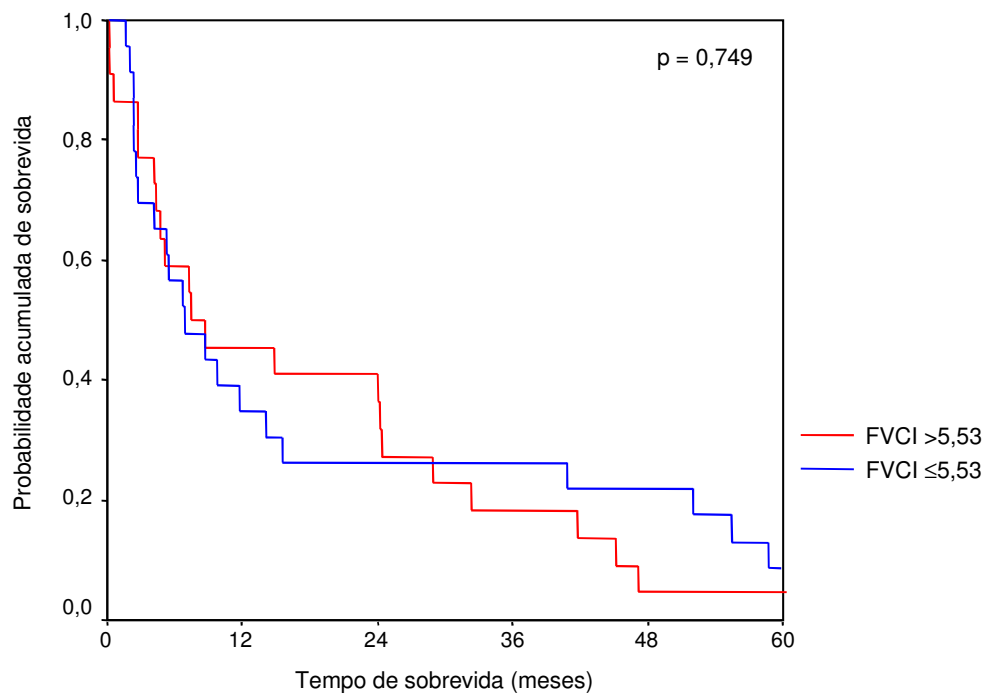


GRÁFICO 9 – CURVAS DE SOBREVIDA EM RELAÇÃO À MEDIANA DA FVCI EM PACIENTES COM MIOCARDIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA

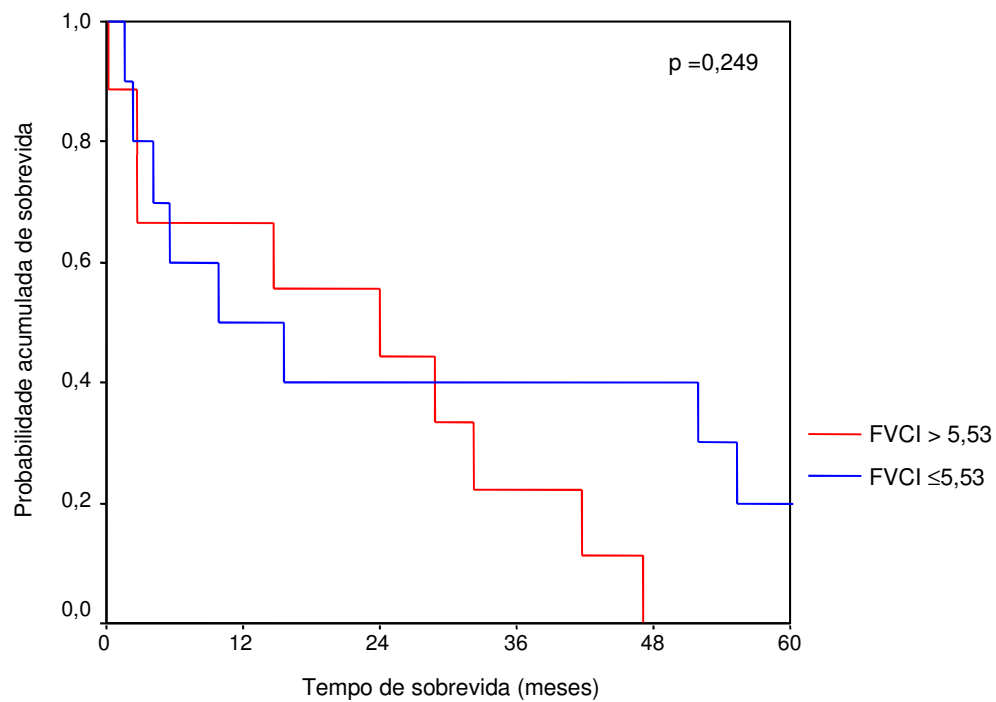
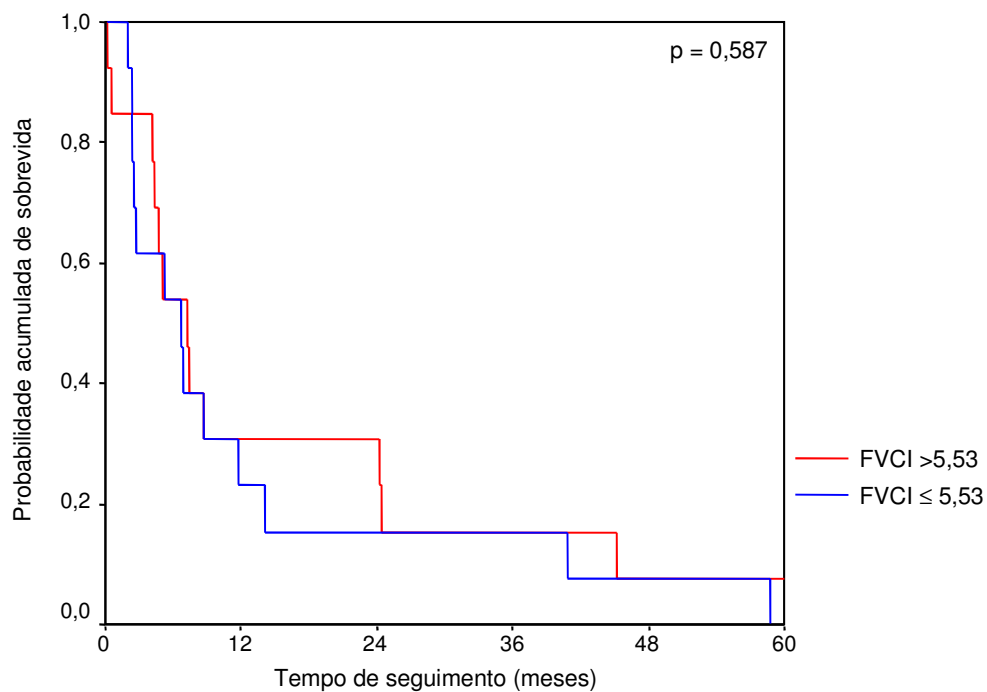


GRÁFICO 10 – CURVAS DE SOBREVIDA EM RELAÇÃO À MEDIANA DA FVCI EM PACIENTES COM MIOCARDIOPATIA DILATADA CHAGÁSICA



Quando analisamos a FVCI com a FEVE, não observamos correlação no grupo MCDC ($r = 0,10$; $p = 0,61$) (gráfico 11), mas houve correlação linear positiva nos pacientes com MCDI ($r = 0,50$; $p = 0,02$) (gráfico 12). Não houve correlação entre a FVCI e o DDVE nas duas etiologias.

GRÁFICO 11 – DIAGRAMA DE DISPERSÃO DA FVCI E DA FEVE EM PACIENTES COM MIOCARDIOPATIA DILATADA CHAGÁSICA

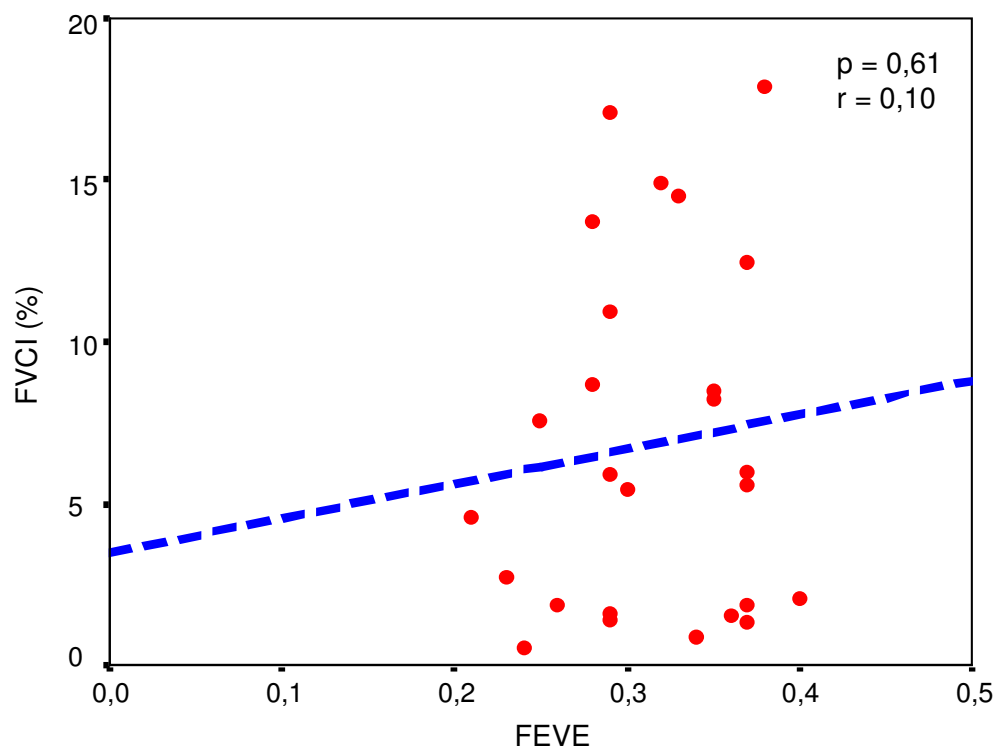
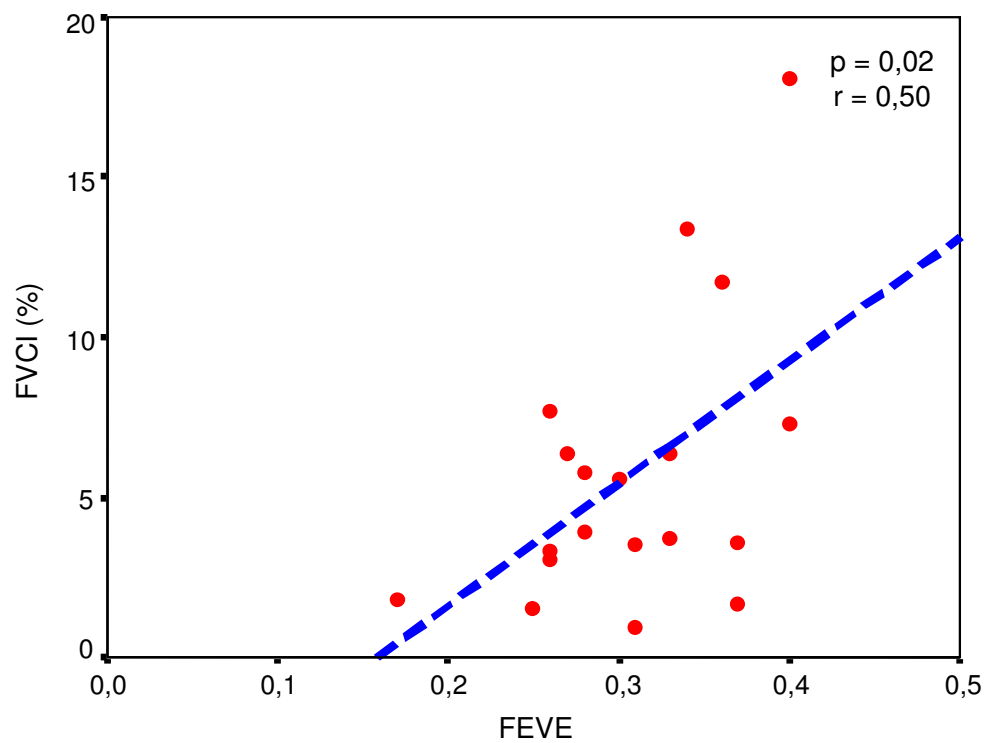


GRÁFICO 12 – DIAGRAMA DE DISPERSÃO DA FVCI E DA FEVE EM PACIENTES COM MIOCARDIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA



Discussão

As miocardiopatias dilatadas representam doenças graves, freqüentes e de alto custo social e econômico. Atualmente, não são consideradas apenas como uma desordem da contratilidade miocárdica, mas como uma seqüência complexa de eventos e mediadores que alteram os componentes celulares e moleculares do miocárdio. Estas repostas são limitadas e caracterizadas, do ponto de vista histológico, por hipertrofia, degeneração, atrofia e necrose dos cardiomiócitos, perda das miofibrilas, infiltrado intersticial inflamatório e fibrose perivascular e intersticial. Talvez a descrição morfológica possa contribuir para estabelecer uma correlação da morfologia com a função cardíaca e prognóstico das doenças do miocárdio. Desde 1907, com Holmgren ⁶⁸ descrevendo pela primeira vez a matriz extracelular e as fibras de colágeno conectadas às fibras musculares esqueléticas e, em 1960, com Hort ⁶⁹ sugerindo que o colágeno previne o excesso de dilatação do miocárdio, estuda-se a associação de mudanças das fibras de colágeno levando a alterações na geometria e função ventricular do miocárdio. Como descrito anteriormente, o aumento da quantidade de colágeno do miocárdio intersticial é progressivo, independente do crescimento dos cardiomiócitos e depende parcialmente da sobrecarga hemodinâmica. Representa inicialmente um mecanismo compensatório, o que facilita a geração da força de contração enquanto aumenta o endurecimento diastólico. Mas como este aumento não é limitado, há mudanças no rearranjo entre as células miocárdicas. Estas modificações ocorrem na proporção de colágeno tipo I e colágeno tipo III, no alinhamento das fibras de colágeno aos cardiomiócitos e no aumento do espessamento do perimísio e endomísio, formando uma (verdadeira) carapaça ao redor das fibras musculares cardíacas, estrangulando e impedindo-as de se contraírem, acarretando a sua atrofia e necrose. Com isso, o número de cardiomiócitos viáveis diminui, o que prejudica a produção da força de contração. Dessa forma, este processo adaptativo se torna patológico, levando à disfunção sistólica e ao aparecimento dos sintomas de IC ^{22, 59, 70-74}.

A realização das biópsias endomiocárdicas, em fases precoces da doença, fornecendo amostras de tecidos, contribui para o esclarecimento da patogenia das miocardiopatias dilatadas e IC. Em 1978, Mackay *et al.* ⁵² e, posteriormente, Fenoglio *et al.* ⁷⁵ demonstraram que as amostras de tecidos obtidas de biópsias endomiocárdicas eram representativas das doenças cardíacas. Noda ⁷⁶, em pacientes com MCDI, verificou que os achados histológicos de tecidos provenientes da realização da biópsia endomiocárdica do ventrículo direito representavam também as alterações do ventrículo esquerdo ($r=0,41$, $p<0,05$), o mesmo observado por Baandrup *et al.* ⁷⁷. Assim, as biópsias endomiocárdicas do ventrículo direito podem ser usadas na determinação das alterações morfológicas e comparadas a biópsias endomiocárdicas de indivíduos sem doença estrutural do coração. Em 1979, Shirey *et al.* ⁷⁸, estudando pacientes com miocardiopatias, constataram que a hipertrofia dos cardiomiócitos e a fibrose miocárdica, ou apenas a fibrose, aumentavam a mortalidade dos pacientes demonstrando, pela primeira vez, relação entre alterações histológicas com a sobrevivência desses pacientes. Kunkel *et al.* ⁷⁹ observaram que o aumento da fibrose miocárdica intersticial é mais proeminente nos estágios avançados das miocardiopatias dilatadas do que em suas fases iniciais. Por outro lado, Figulla *et al.* ⁵⁵, analisando pacientes com MCDI, não demonstraram relação dos dados morfológicos, como hipertrofia dos cardiomiócitos e aumento da quantidade de colágeno intersticial, com informações prognósticas, o mesmo encontrado por outros autores, tanto em relação às miocardiopatias dilatadas de etiologias conhecidas e variadas ⁷⁸ como naquelas de etiologia idiopática ⁸⁰.

Apesar de nossos resultados não definirem que a quantidade de colágeno miocárdico intersticial tem relação com a sobrevivência dos pacientes estudados com miocardiopatia dilatada ($p=0,749$), mesmo após separarmos pelas etiologias chagásica ($p=0,587$) e idiopática ($p=0,249$) (gráficos 8, 9 e 10), podemos observar que aqueles

pacientes com miocardiopatia dilatada com quantidade de colágeno miocárdio intersticial menor tinham sobrevida global em cinco anos de 8,7%, contra 4,5% encontrada naqueles com quantidade de colágeno miocárdico intersticial maior (gráfico 8). Esses resultados corroboram os dados apresentados por Unverferth *et al.*⁶⁰, em pacientes com miocardiopatia dilatada não isquêmica com seguimento de um ano, buscando definir os marcadores de prognóstico da doença. Os autores evidenciaram que a fibrose foi maior nos que não sobreviveram, mas sem importância prognóstica ($p=0,26$). Baandrup *et al.*⁸¹, estudando pacientes com miocardiopatias, não encontraram relação entre as alterações morfológicas e a FEVE, a severidade e o prognóstico dos doentes. Entretanto, esses autores analisaram patologias diferentes (miocardiopatia hipertrófica e dilatada), diferindo das do nosso estudo, no qual selecionamos um grupo homogêneo de pacientes com miocardiopatia dilatada com grave disfunção sistólica. Em nosso estudo, quando comparamos as duas etiologias em relação à sobrevida, também não encontramos resultados significativos, mas observamos que a etiologia chagásica apresentou 3,8% de sobrevida em cinco anos e a etiologia idiopática 10,5% (gráfico 2). Entretanto, Bocchi¹⁷ observou, em pacientes com IC grave, piora significativa na sobrevida daqueles com etiologia chagásica em relação a outras miocardiopatias dilatadas - idiopática e isquêmica. O número de pacientes incluídos em nosso estudo pode ter sido insuficiente para demonstrar diferença estatisticamente significativa na evolução desses dois grupos, apesar da percentagem de sobrevida ser maior nos pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática. Talvez a persistência da atividade da miocardite, através da participação direta do parasita ou por mecanismos imunológicos, e a distribuição difusa das lesões histológicas tenham alguma contribuição para a evolução mais desfavorável da etiologia chagásica.

Assim, é possível que não tenhamos conseguido evidenciar a associação da fibrose miocárdica intersticial com a sobrevida desses pacientes, pois apenas a medida quantitativa do colágeno miocárdico intersticial, isoladamente, não expressa toda a complexidade do remodelamento miocárdico. Possivelmente, apenas o acúmulo de colágeno no miocárdio não seja um fator prognóstico, como demonstrado neste estudo. Talvez, para conseguirmos evidenciar uma associação morfológica com o prognóstico, devêssemos incluir na análise outras alterações que participam da arquitetura miocárdica como: o tipo de distribuição (difusa ou localizada) das fibras de colágeno pelo miocárdio, a alteração da proporção de colágeno tipo I/III, a sua relação com os cardiomiócitos e no alinhamento destes, a formação de agrupamentos de colágeno no miocárdio, funcionando como (verdadeiros) obstáculos na transmissão da força de contração gerada para toda a câmara cardíaca e locais propícios para a formação de arritmias cardíacas, a perda da integridade, propiciando uma contração dessincronizada do miocárdio, levando à diminuição da função sistólica ^{71, 82-84}. Além destes fatores, o remodelamento miocárdico também representa mudanças celulares e moleculares, o que ocasiona hipertrofia e talvez hiperplasia, necrose e apoptose dos cardiomiócitos, contribuindo para a pior evolução das miocardiopatias dilatadas e IC. Como descrito anteriormente, os estudos dos grupos dos pesquisadores Pelliccia ⁵⁴ e Figulla ⁵⁵ em pacientes com MCDI e outros estudos em miocardiopatas, demonstraram que a redução da fração de volume da miofibrila e o aumento da área nuclear foram variáveis independentes associadas a pior prognóstico ⁵⁶⁻⁵⁸. Certamente, o colágeno participa diretamente e de forma importante nesse mecanismo de remodelamento e progressão da disfunção miocárdica, porém não isoladamente.

Quando analisamos a quantidade de colágeno miocárdico intersticial e a sobrevida dos pacientes com miocardiopatia dilatada em relação às diversas etiologias, encontramos

estudos mostrando que algumas etiologias poderiam induzir diferentes achados histológicos. Unverferth *et al.* ⁵³, compararam várias etiologias de miocardiopatias dilatadas, e observaram que o grupo de pacientes com miocardiopatia induzida pela doxorubicina apresentava mais fibrose do que o da etiologia alcoólica. Felker *et al.* ²⁵, também com metodologia semelhante, reconheceram que o grupo de pacientes miocardiopatas por doxorubicina tinha pior sobrevida que o grupo com MCDI; já nos pacientes com etiologia alcoólica, seu prognóstico não diferiu em relação a esta. Soufen ⁸⁵ constatou, em pacientes com miocardiopatia dilatada de diferentes causas, que a etiologia da disfunção do ventrículo esquerdo caracteriza a fibrose miocárdica, sendo maior na alcoólica e hipertensiva quando comparadas à idiopática contribuindo, assim, para diferentes prognósticos, conforme a etiologia. Então, podemos sugerir que algumas etiologias, através de seus mecanismos patogênicos, determinariam alterações histológicas diferentes e evoluções distintas, mas ainda é incerto se existe uma relação direta entre elas. Em nosso estudo, analisamos duas etiologias de miocardiopatias dilatadas, uma de causa indeterminada e a outra secundária a mecanismos inflamatórios. A MCDC é considerada de etiologia inflamatória, e a injúria tecidual causada por fatores relacionados à presença do parasita e/ou mecanismos imunológicos. Assim, os seus achados histológicos tenderiam a uma distribuição mais difusa pelo miocárdio, e não tão localizada como em outras etiologias, como por exemplo as isquêmicas ⁶³. Dessa forma, com a realização da biópsia endomiocárdica em pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica, esperaríamos obter, mais facilmente, tecidos representativos dessas alterações histológicas, como a fibrose intersticial. Em nosso estudo, os resultados da morfometria na quantificação do colágeno intersticial de tecidos, provenientes de biópsia endomiocárdica do ventrículo direito nos pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica, não diferiram dos resultados obtidos no grupo idiopático, mas foram em média 15 vezes maiores que aqueles encontrados

nos pacientes do grupo controle (tabela 4 e gráfico 7). Apesar da quantidade de colágeno ser semelhante nos grupos de pacientes com miocardiopatias, não observamos uma correlação entre a FVCI e o DDVE, isso também pode ser comprovado, visto que o grupo com MCDI apresentou DDVE significativamente maior que o grupo chagásico, com a menor FVCI. Nesse caso, poderíamos especular que, talvez, o tipo de colágeno, ou a relação do colágeno tipo I e III, possa ser diferente nessa etiologia, o que alteraria o deslizamento dos miócitos e provocaria mais dilatação das cavidades na MCDI. Outra análise com metodologia diferente deveria ser feita para analisar essa hipótese.

Sabe-se que na hipertrofia miocárdica avançada desenvolve-se fibrose intersticial e hipertrofia dos cardiomiócitos. Estas mudanças estruturais do miocárdio podem alterar as propriedades elásticas, interferindo no endurecimento diastólico do miocárdio. Hess *et al.*⁸² constataram que o endurecimento miocárdico está mais relacionado à fibrose intersticial do que ao aumento do tecido muscular. Como descrito anteriormente, o acúmulo da quantidade de colágeno intersticial é um mecanismo dependente de fatores mediadores diversos e considerado um evento progressivo, inicialmente funcionando como um processo adaptativo, depois contribuindo para a deterioração diastólica e, mais tarde, para disfunção sistólica. Assim, a verificação da existência de uma relação entre o aumento da quantidade de colágeno miocárdico intersticial e as alterações na função miocárdica é relevante. Sabe-se que a FEVE é um fator de prognóstico independente das miocardiopatias dilatadas e IC^{16, 20, 30, 32, 34}. Mady *et al.*⁶³, em pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica, Weber *et al.*^{70, 72} e Jalil *et al.*⁸³, em modelos animais de hipertrofia do ventrículo esquerdo, relacionaram o aumento da quantidade de colágeno do miocárdio, geralmente superior a 20% do seu valor normal, com diminuição da eficácia em gerar forças pelo miocárdio. Por sua vez, Nakayama *et al.*⁸⁶ observaram que a fibrose miocárdica intersticial e a hipertrofia dos cardiomiócitos

correlacionavam-se e estavam associados à deterioração da contratilidade miocárdica em pacientes com miocardiopatia dilatada. O mesmo foi encontrado por outros autores, como Unverferth *et al.* ⁶¹ e Kunkel *et al.* ⁷⁹ que, avaliando pacientes com IC, observaram que a hipertrofia dos cardiomiócitos e a fibrose intersticial estavam aumentadas em pacientes com disfunção sistólica grave. Schwarz *et al.* ⁵⁹, em pacientes com MCDI, constataram que o aumento da fibrose intersticial e a diminuição do volume das miofibrilas ocorriam quando a FEVE diminuía, demonstrando que as alterações morfológicas ocorrem quando há disfunção do ventrículo esquerdo e sugerindo uma correlação inversa entre a fibrose e disfunção contrátil ($r = -0,47$; $p < 0,001$). Já Unverferth *et al.* ⁵³, analisando 109 pacientes com IC, mostraram que a fibrose miocárdica teve pouca correlação com a função miocárdica (fração de encurtamento) da população estudada, mas esta relação era maior quando analisada separando as etiologias, principalmente a alcoólica e por doxorubicina ($p < 0,05$). Capasso *et al.* ⁸⁷, em modelos de hipertensão arterial renovascular em ratos, mostraram que 25% do endomiocárdio era ocupado por fibrose e que a necrose dos miócitos e o acúmulo de colágeno resultariam no afinamento da parede e dilatação da câmara cardíaca, sugerindo a participação dessas alterações histológicas na função ventricular. Novamente, Unverferth *et al.* ⁸⁸, em pacientes com miocardiopatia dilatada não isquêmica, procurando relacionar a quantidade de colágeno miocárdico intersticial com outra variável hemodinâmica, não evidenciaram associação entre a fibrose miocárdica e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e nem com a do ventrículo direito. Em nossa análise, quando relacionamos a quantidade de colágeno miocárdico intersticial de pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica com a FEVE; observamos correlação linear positiva entre as duas variáveis, mas sem significância estatística ($r = 0,26$, $p = 0,081$) (gráfico 11). No entanto, quando correlacionamos essas duas variáveis em relação aos pacientes com MCDI, observamos

uma significativa correlação ($r= 0,50$; $p =0,02$) (gráfico 12). Este fato pode estar relacionado com fatores próprios da fisiopatologia da disfunção miocárdica na MDC com maior agressão dos miócitos e com grande atividade de mediadores inflamatórios, não sendo o acúmulo de colágeno a principal causa dessa disfunção. Como um dos nossos critérios de inclusão foi $FEVE \leq 0,40$ e, segundo Mady *et al.* ⁶³, evidenciando valor preditivo da FEVE quando esta era muito rebaixada (menor que 0,30), optamos por separar os pacientes em duas categorias: os que apresentavam valores de FEVE menores ou iguais a 0,30 e aqueles com valores maiores. Em nosso estudo, não encontramos diferenças estatisticamente significativas da FEVE em relação à sobrevida global em cinco anos nos pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica, mas essa relação foi significativa nos pacientes com a etiologia idiopática (gráficos 5 e 6). Isso talvez tenha ocorrido, novamente, pelo envolvimento de outros mecanismos fisiopatológicos na miocardiopatia chagásica, como a liberação de mediadores inflamatórios ou a presença de ativação auto-imune, intensificando a piora da função miocárdica, arritmias complexas, além daquela ocasionada exclusivamente pelo acúmulo de colágeno. Unverferth *et al.* ⁶⁰ observaram que, além da FEVE, o DDVE também é um fator importante no prognóstico das miocardiopatias. Assim, quando avaliamos o DDVE com a quantidade de colágeno miocárdico intersticial, não encontramos correlação nas duas etiologias. Talvez, para observarmos se existe relação da quantidade de colágeno miocárdico intersticial com medidas estruturais e funcionais (diâmetro diastólico e fração de ejeção do ventrículo esquerdo), devêssemos analisar também outras variáveis do remodelamento cardíaco, como a relação da fibrose intersticial com os cardiomiócitos e a hipertrofia, a degeneração e a atrofia dos cardiomiócitos, mas estes não foram objetivos do nosso estudo. Um outro fator foi o uso de apenas um índice funcional representativo da contratilidade miocárdica, como a FEVE, sendo possível que múltiplos eventos participem da regulação da

função cardíaca, dificultando a comparação apenas de um índice com os achados histológicos, para obtermos uma associação mais precisa entre as variáveis hemodinâmicas e morfológicas. Também uma outra questão que pode explicar a não correlação da FEVE e FVCI em nosso estudo é a participação não isolada da fibrose na função miocárdica, desempenhando um papel secundário como mostra Schwarz *et al.* ⁸⁹, em pacientes com doença na valva aórtica e com disfunção importante do ventrículo esquerdo, esses autores observaram que a fibrose poderia ter papel adverso na contração, isolando os cardiomiócitos e propiciando ruptura do sincício funcional do miocárdio, sendo sua participação menos importante para o desempenho cardíaco do que fatores musculares.

Vários são os mecanismos envolvidos na fibrose miocárdica e na progressão da disfunção ventricular. Assim, o grau de fibrose encontrada poderia representar a grande perda de miócitos ou sua incapacidade para desempenhar a contratilidade cardíaca, contribuindo para a limitada possibilidade de melhorar a função cardíaca com o tratamento medicamentoso, que alguns pacientes manifestam. Um dos fatores promotores da fibrose reativa e reparativa é a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Estas, como já foi demonstrado, induzem necrose dos cardiomiócitos, aumento na síntese e diminuição da degradação de colágeno pelos fibroblastos e miofibroblastos ⁷¹. Parece que este mecanismo se inicia com o aumento da permeabilidade da microcirculação coronariana a fatores de crescimento (fator de crescimento derivado das plaquetas), sendo reconhecido o seu papel como mitógenos em fibroblastos da pele. Também o fator transformador de crescimento beta, que normalmente reside na camada adventícia dos vasos intramiocárdicos, pode ser ativado pela angiotensina II e aldosterona, participando da fibrogênese ⁹⁰. Em nosso estudo, um dos critérios de inclusão foi o uso de inibidores da enzima de conversão da angiotensina, considerada uma droga cardioprotetora e cardiorreparadora. Como se sabe, a meia-vida da

fibra de colágeno é de 80 a 120 dias e os pacientes avaliados estavam fazendo uso do fármaco por período superior a quatro meses; então, se o aumento na concentração de angiotensina II e aldosterona fosse o único mecanismo responsável para o estímulo da síntese e diminuição da degradação de colágeno, a fibrose estaria homoganeamente reduzida nos grupos de pacientes miocardiopatas. Nossos resultados mostraram aumento na quantidade de colágeno no miocárdio de pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e chagásica em relação a pacientes sem alteração funcional e estrutural do miocárdio.

Campbell *et al.*⁹¹, em modelos de ratos hipertensos, mostraram que a amilorida, um diurético poupador de potássio, conseguia prevenir apenas a fibrose reparativa, diferindo da espironolactona, que é um diurético poupador de potássio e bloqueador dos receptores da aldosterona, que conseguia prevenir tanto a fibrose reparativa quanto a reativa. Parece que o aumento da excreção de potássio participaria na indução da necrose dos cardiomiócitos, sendo que a suplementação de potássio ou o uso de fármacos poupadores de potássio preveniriam a perda de miócitos. O mesmo foi demonstrado por Sanderson *et al.*⁹² em modelos de ratos com hiperaldosteronismo primário. Por outro lado, as endotelinas são potentes vasoconstritores e estão elevadas na IC⁹³. Ramires *et al.*,⁹⁴ em modelos de infarto do miocárdio em ratos, demonstraram que a endotelina representa um mediador para a fibrose miocárdica independente dos fatores hemodinâmicos e do tamanho do infarto. As citocinas representam proteínas secretadas por diversos tipos de células em resposta a inúmeros estímulos. O TNF-alfa é uma delas e está aumentado em pacientes caquéticos com IC⁹⁵. Outro estudo demonstrou que aumento na concentração de TNF-alfa está relacionado com o surgimento do remodelamento miocárdico em modelos animais de IC⁹⁶. A alteração estrutural dos miócitos com disfunção de suas organelas e proteínas, além da modificação bioquímica das reações internas dos miócitos, também colabora para a progressão da

disfunção miocárdica. Cada vez mais, a apoptose demonstra seu papel no remodelamento e disfunção cardíaca.

Assim, o remodelamento cardíaco é um mecanismo complexo que participa, isoladamente ou não, da progressão das miocardiopatias dilatadas e da insuficiência cardíaca. A avaliação isolada da quantidade de colágeno miocárdico intersticial é uma parte deste conjunto, devendo outras variáveis serem avaliadas posteriormente.

Conclusão

Não houve correlação entre a quantidade de colágeno miocárdico intersticial e a sobrevivência de pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática ou chagásica. Não houve diferença da quantidade de colágeno miocárdico intersticial entre as duas etiologias. A quantidade de colágeno miocárdico intersticial não se correlacionou com a fração de ejeção e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo na miocardiopatia dilatada chagásica, mas se correlacionou com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo apenas na miocardiopatia dilatada idiopática.

Limitações do estudo

O estudo apresentou como limitação o número de pacientes analisados. Como não havia estudo na literatura com a mesma metodologia, não foi possível calcular o número amostral de pacientes antes da realização do estudo. Em nossa análise, partimos de um total de 1406 pacientes que realizaram biópsia endomiocárdica e, após submetidos aos critérios de inclusão e exclusão, chegamos a 35 pacientes, que constituíram o nosso grupo de pacientes miocardiopatas. A partir da realização do nosso estudo, conseguimos calcular o número amostral, que foi de 662 pacientes, demonstrando a dificuldade e até inviabilidade de realizar um novo estudo prospectivo usando a metodologia empregada em nosso estudo (biópsia endomiocárdica) para obtermos resultados significativos.

Outra limitação do estudo foi em relação ao método. O erro amostral associado ao pequeno tamanho das biópsias endomiocárdicas pode interferir parcialmente nos resultados.

Referências bibliográficas

1. RICHARDSON, P.; MCKENNA, W.; BRISTOW, M.; MAISCH, B.; MAUTNER, B.; O'CONNELL, J.; OLSEN, E.; THIENE, G. Report of 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. **Circulation**, v.93, p.841-2, 1996.
2. HEART DISEASE AND STROKE STATISTIC – 2003 UPDATE. American Heart Association. Our guide to current statistics and the supplement to our “Heart and Stroke Facts”. Other Cardiovascular Diseases (item 9 - Cardiomyopathy and Congestive Heart Failure), p.22-3. Disponível em : www.americanheart.org.
3. MANOLIO, T.A.; BAUGHMAN, K.L.; RODEHEFFER, R.; PEARSON, T.A.; BRISTOW, J.D.; MICHELS, V.V.; ABELMANN, W.H.; HARLAN, W.R. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a national heart, lung, and blood institute workshop). **Am. J. Cardiol.**, v.69, p.1458-66, 1992.
4. JOSSERAND, E.; GALLAVARDIN, L. De l' asystole progressive des jeunes sujets par myocardite subaigue primitive. **Arch. Gen. de Méd.**, v.78, p.513-684, 1901.
5. JUILLIÈRE, Y.; BARBIER, G.; FELDMANN, L.; GRENTZINGER, A.; DANCHIN, N.; CHERRIER, F. Additional predictive value of both left and right ventricular ejection fractions on long-term survival in idiopathic dilated cardiomyopathy. **Eur. Heart J.**, v.18, p.276-80, 1997.
6. MICHELS, V.V.; MOLL, P.P.; MILLER, F.A.; TAJIK, A.J.; CHU, J.S.; DRISCOLL, D.J.; BURNETT, J.C.; RODEHEFFER, R.J.; CHESEBRO, J.H.; TAZELAAR, H.D. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **N. Engl. J. Med.**, v.326, p.77-82, 1992.
7. PRAZAK, P.; PFISTERER, M.; OSSWALD, S.; BUSER, P.; BURKART, F. Differences of disease progression in congestive heart failure due alcoholic as compared to idiopathic dilated cardiomyopathy. **Eur. Heart J.**, v.17, p.251-7, 1996.
8. CUNHA-NETO, E.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; KALIL, J. Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v.2, p.217-29, 1995.

9. DIAS, J.C.P. A doença de Chagas e seu controle na América Latina. Uma análise de possibilidades. **Cad. Saúde Públ. (RJ)**, v.9,p.201-9,1993.
10. HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; REIS, M.M.; METZGER, M. Pathophysiology of heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc. Res.**, v.60,p.96-107,2003.
11. ABEL, L.C.J.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. **Braz. J. Med. Res.**, v.30, p.1305-8, 1997.
12. CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' heart disease. **São Paulo Medical Journal/RPM**, v.113, p.757-66, 1995.
13. CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; MESSIAS, I.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PATARROYO, M.E.; PILLEGGI, F.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.3541-5, 1995.
14. ALBANESI FILHO, F.M. Insuficiência cardíaca no Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.56, p.1-72, 1998.
15. WOOD, D.A. Preventing clinical heart failure: the rationale and scientific evidence. **Heart**, v.88(Suppl II), p.II15-II22, 2002.
16. ANKER, S.D.; COATS, A.J.S. Metabolic, functional and haemodynamic staging for CHF? **Lancet**, v.348, p.1530-2, 1996.
17. BOCCHI, E.A. Situação atual das indicações e resultados do tratamento cirúrgico da insuficiência cardíaca. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.63, p.523-30, 1994.
18. BRILLA, C.G. Regression of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: diverse effects of various antihypertensive drugs. **Cardiovasc. Res.**, v.46, p.324-31, 2000.

19. LEVY, D.; GARRISON, R.J.; SAVAGE, D.D.; KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N. Engl. J. Med.**, v.322, p.1561-6, 1990.
20. FRIMM, C.C.; TREZZA, B.M.; GRUPPI, C.; MEDEIROS, C.C.J.; CÚRI, M.; KRIEGER, E.M. Left ventricular hypertrophy predicts outcome of hypertension regardless of the type of ventricular arrhythmia present. **J. Hum. Hypertens.**, v.13, p.617-23, 1999.
21. BRILLA, C.G.; REAMS, G.P.; MAISCH, B.; WEBER K.T. Renin-angiotensin system and myocardial fibrosis in hypertension: regulation of the myocardial collagen matrix. **Eur. Heart J.**, v.14, p.57-61, 1993.
22. TAN, L.B.; BRILLA, C.G.; WEBER, K.T. Prevention of structural changes in the heart in hypertension by angiotensin converting enzyme inhibition. **J. Hypertens.**, v.10(suppl 1), p.S31-4, 1992.
23. FELKER, G.M.; SHAW, L.K.; O'CONNOR, C.M. A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.39, p.210-8, 2002.
24. BART, B.A.; SHAW, L.K.; MCCANTS, C.B.; FORTIN, D.F.; LEE, K.L.; CALIFF, R.M.; O'CONNOR, C.M. Clinical determinants of mortality in patients with angiographically diagnosed ischemic or nonischemic cardiomyopathy. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.30, p.1002-8, 1997.
25. FELKER, G.M.; THOMPSON, R.E.; HARE, J.M.; HRUBAN, R.H.; CLEMETSON, D.E.; HOWARD, D.L.; BAUGHMAN, K.L.; KASPER, E.K. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. **N. Engl. J. Med.**, v.342, p.1077-84, 2000.
26. HO, K.K.L.; ANDERSON, K.M.; KANNEL, W.B.; GROSSMAN, W.; LEVY, D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. **Circulation**, v.88, p.107-15, 1993.

27. BOURASSA, M.G.; GURNE, O.; BANGDIWALA, S.L. Natural history and patterns of current practice with symptomatic heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.12, p.14A-19A, 1993.
28. ADAMS JR, K.F.; SUETA, C.A.; GHEORGHIADE, M.; O'CONNOR, C.M.; SCHWARTZ, T.A.; KOCH, G.G.; URETSKY, B.; SWEDBERG, K.; MCKENNA, W.; SOLER-SOLER, J.; CALLIF, R.M. Gender differences in survival in advanced heart failure (insights from the first study). **Circulation**, v.99, p.1816-21, 1999.
29. ADAMS JR, K.F.; DUNLAP, S.H.; SUETA, C.A.; CLARKE, S.W.; PATTERSON, J.H.; BLAUWET, M.B.; JENSEN, L.R.; TOMASKO, L.; KOCH, G. Relation between gender, etiology and survival in patients with symptomatic heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.28, p.1781-8, 1996.
30. COHN, J.N.; RECTOR, T.S. Prognosis of congestive heart failure and predictors of mortality. **Am. J. Cardiol.**, v.62, p.25A-30A, 1988.
31. MADY, C.; CARDOSO, R.H.A.; BARRETTO, A.C.P.; LUZ, P.L.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. **Circulation**, v.90, p.3098-102, 1994.
32. GRADMAN, A.; DEEDWANIA, P.; CODY, R.; MASSIE, B.; PACKER, M.; PITT, B.; GOLDSTEIN, S. Predictors of total mortality and sudden death in mild to moderate heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.14, p.564-70, 1989.
33. FRANCIOSA, J.A.; WILEN, M.; ZIESCHE, S.; COHN, J.N. Survival in men with severe chronic left ventricular failure due to either coronary heart disease or idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am. J. Cardiol.**, v.51, p.831-6, 1983.
34. KEOGH, AM.; BARON, D.W.; HICKIE, J.B. Prognostic guides in patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy assessed for cardiac transplantation. **Am. J. Cardiol.**, v.65, p.903-8, 1990.
35. COHN, J.N.; LEVINE, B.; OLIVARO, M.T.; GARBERG, V.; LURA, D.; FRANCIS, G.S.; SIMON, A.B.; RECTOR, T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in

- patients with chronic congestive heart failure. **N. Engl. J. Med.**, v.311, p.819-23, 1984.
36. WEBER, K.T.; PICK, R.; JANICKI, J.S.; GADODIA, G.; LAKIER, J.B. Inadequate collagen tethers in dilated cardiopathy. **Am. Heart J.**, v.116, p.1641-6, 1988.
 37. BRILLA, C.G.; MATSUBARA, L.; WEBER, K.T. Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.28, p.269-75, 1996.
 38. BRILLA, C.G.; MAISCH, B.; WEBER, K.T. Myocardial collagen matrix remodelling in arterial hypertension. **Eur. Heart J.**, v.13(Supplement D), p.24-32, 1992.
 39. BRILLA, C.G.; PICK, R.; TAN, L.B.; JANICKI, J.S.; WEBER, K.T. Remodeling of the rat right and left ventricle in experimental hypertension. **Circ. Res.**, v.67, p.1355-64, 1990.
 40. WEBER, K.T.; BRILLA, C.G. Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. **Clin. Cardiol.**, v.16(Suppl.II), p.II-10 – II-14, 1993.
 41. WEBER, K.T., JANICKI, J.S.; PICK, R.; CAPASSO, J.; ANVERSA, P. Myocardial fibrosis and pathologic hypertrophy in the rat with renovascular hypertension. **Am. J. Cardiol.**, v.65, p.1G-7G, 1990.
 42. WEINBERG, M.; FELL, E.H.; LYNFIELD, J. Diagnostic biopsy of the pericardium and myocardium. **Arch. Surg.**, v.76, p.825-9, 1958.
 43. SUTTON, G.C.; DRISCOLL, J.F.; GUNNAR, R.M.; TOBIN, J.R. Exploratory mediastinotomy in primary myocardial disease. **Progr. Cardiovasc. Dis.**, v.7, p.83-97, 1964.
 44. SUTTON, D.C.; SUTTON, G.C. Needle biopsy of the human ventricular myocardium: review of 54 consecutive cases. **Am. Heart J.**, v.60, p.364-70, 1960.
 45. BERCU, B.; HEINZ, J.; CHOUDHRY, A.S.; CABRERA, P. Myocardial biopsy: a new technique utilizing the ventricular septum. **Am. J. Cardiol.**, v.14, p.675-8, 1964.

46. SHIREY, E.K.; HAWAK, W.A.; MUKERJI, D.; EFFLER, D.B. Percutaneous myocardial biopsy of the left ventricle. **Circulation**, v.46, p.112-22, 1972.
47. BULLOCH, R.T.; MURPHY, M.L.; PEARCE, M.B. Intracardiac needle biopsy of the left ventricular septum. **Am. J. Cardiol.**, v.16, p.227-33, 1965.
48. SAKAKIBARA, S.; KONNO, S. Endomyocardial biopsy. **Jpn. Heart J.**, v.3, p. 537-43, 1962.
49. RICHARDSON, P.J. King's endomyocardial biopome. **Lancet**, v.1, p.660-1, 1974.
50. FELKER, G.M.; HU, W.; HARE, J.M.; HRUBAN, R.H.; BAUGHMAN, K.L.; KASPER, E.K. The spectrum of dilated cardiomyopathy. The Johns Hopkins experience with 1,278 patients. **Medicine** (Baltimore), v.78, p.270-83, 1999.
51. KASPER, E.K.; AGEMA, W.R.P.; HUTCHINS, G.M.; DECKERS, J.W.; HARE, J.M.; BAUGHMAN, K.L. The cause of dilated cardiomyopathy: a clinicaopathologic review of 673 consecutive patients. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.23, p.586-90, 1994.
52. MACKAY, E.H.; LITTLER, W.A.; SLEIGHT, P. Critical assessment of diagnostic value of endomyocardial biopsy. **Br. Heart J.**, v.40, p.69-78, 1978.
53. UNVERFERTH, D.V.; FETTERS, J.K.; UNVERFERTH, B.J.; LEIER, C.V.; MAGORIEN, R.D.; ARN, A.R.; BAKER, P.B. Human myocardial histologic characteristics in congestive heart failure. **Circulation**, v.68(6), p.1194-1200, 1983.
54. PELLICCIA, F.; D'AMATI, G.; CIANFROCCA, C.; BERNUCCI, P.; NIGRI, A.; MARINO, B.; GALLO, P. Histomorphometric features predict 1-year outcome of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy considered to be at low priority for cardiac transplantation. **Am. Heart J.**, v. 128, p.316-25, 1994.
55. FIGULLA, H.R.; RAHLF, G.; NIEGER, M.; LUIG, H.; KREUSER, H. Spontaneous hemodynamic improvement or stabilization and associated biopsy findings in patients with congestive cardiomyopathy. **Circulation**:71(6), p.1095-104, 1985.
56. GALLO, P.; D'AMATI, G.; PELLICCIA, F.; BERNUCCI, P.; CIANFROCCA, C.; MARINO, B. Functional significance of myocellular hypertrophy in dilated

- cardiomyopathy: histomorphometric analysis on 40 endomyocardial biopsies. **Am. J. Cardiovasc. Pathol.**, v.5, p.11-8, 1994.
57. DEC, G.W.; FUSTER, V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. **N. Engl. J. Med.**, v.331, p.1564-75, 1994.
58. BRILLA, C.G.; MATSUBARA, L.S.; WEBER, K.T. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.25, p.563-75, 1993.
59. SCHWARZ, F.; MALL, G.; ZEBE, H.; BLICKLE, J.; DERKS, H.; MANTHEY, J. Quantitative morphologic findings of the myocardium in idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am. J. Cardiol.**, v.51, p.501-6, 1983.
60. UNVERFERTH, D.V.; MAGORIEN, R.D.; MOESCHBERGER, M.L.; BAKER, P.B.; FETTERS, J.K.; LEIER, C.V. Factor influencing the one-year mortality of dilated cardiomyopathy. **Am. J. Cardiol.**, v.54, p.147-52, 1984.
61. MATTOS, B.P.; ZETTLER, C.G.; PINOTTI, A.F.F.; RAUDALES, J.C.; ZAGO, A.J. Left ventricular function and endomyocardial biopsy in early and advanced dilated cardiomyopathy. **Int. J. Cardiol.**, v. 63, p.141-9, 1998.
62. GRIMM, W.; RUDOLPH, S.; CHRIST, M.; PANKUWEIT, S.; MAISCH, B. Prognostic significance of morphometric endomyocardial biopsy analysis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am. Heart J.**, v. 146, p. 372-6, 2003.
63. MADY, C.; IANNI, B.M.; ARTEAGA, E.; MONTES, G.S.; CALDINI, E.G.; ANDRADE, G.; GIORGI, M.C.P.; SALDIVA, P.H.N. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' Disease. **Am. J. Cardiol.**, v.84, p.354-6, 1999.
64. BARRETTO, A.C.P.; MADY, C.; ARTEAGA, E.; STOLF, N.; LOPES, E.A.; HIGUCHI, M.L.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. **Am. Heart J.**, v.111, p.307-12, 1986.

65. FABRIZIO, L.; REGAN, T.J. Alcoholic cardiomyopathy. **Cardiovasc. Drugs Ther.**,v.8, p.89-94, 1994.
66. ARETZ, H.T. Myocarditis: the Dallas criteria. **Hum. Pathol.**, v.18, p.619-24, 1987.
67. MASON, J.W. Techniques for right and left ventricular endomyocardial biopsy. **Am. J. Cardiol.**, v.41, p.887-92, 1978.
68. HOLMGREN, E. Ueber die Trophospongien des quergestriefften Muskelfasern, nebst Bemerkungen ueber den allgemeinen Bau dieser Fasern. **Ach. Mikrosk. Anat.**, v.22, p.694-706, 1935.
69. HORT, W. Untersuchungrn zur funktionellen Morphologie des Bindegewebsgerustes und der Blutgefasse der linken Herzkammerwnad. **Virchow Arch. Path. Anat.**, v.333, p.565-81, 1960.
70. WEBER, K.T.; JALIL, J.E.; JANICKI, J.S.; PICK, R. Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy. **Am. J. Hypertens.**, v.2, p.931-40, 1989.
71. WEBER, K.T.; BRILLA, C.G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. **Circulation**, v.83, p.1849-65, 1991.
72. JALIL, J.E.; JANICKI, J.S.; PICK, R.; ABRAHAMS, C.; WEBER, K.T. Fibrosis-induced reduction of rndomyocardium in the rat after isoproterenol treatment. **Circ. Res.**, v.65, p.258-64, 1989.
73. WEBER, K.T.; BRILLA, C.G.; CAMPBELL, S.E. Regulatory mechanisms of myocardial hypertrophy and fibrosis: results of in vivo studies. **Cardiology**, v.81, p.266-73, 1992.
74. BRILLA, C.G.; JANICKI, J.S.; WEBER, K.T. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. **Circ. Res.**, v.69, p.107-15, 1991.
75. FENOGLIO, J.J. Jr.; URSELL, P.C.; KELLOGG, C.F.; DRUSIN, R.E.; WEISS, M.B. Diagnosis and classification of myocarditis by endomyocardial biopsy. **N. Engl. J. Med.**, v.308, p.12-8, 1983.

76. NODA, S. Histopathology of endomyocardial biopsy from patients with idiopathic cardiomyopathy: quantitative evaluation based on multivariate statistical analysis. **Jpn. Circ. J.**, v.44, p.95-116, 1980.
77. BAANDRUP, U.; OLSEN, E.G.J. Critical analysis of endomyocardial biopsies from patients suspected of having cardiomyopathy I: Morphological and morphometric aspects. **Br. Heart J.**, 45, p.475-86, 1981.
78. SHIREY, E.K.; PROUDFIT, W.L.; HAWK, W.A. Primary myocardial disease. Correlation with clinical finding, angiographic and biopsy diagnosis. **Am. Heart J.**, v.99, p.198-207, 1980.
79. KUNKEL, B.; SCHNEIDER, M.; KOBER, G.; BUSSMANN, D.; HOPF, R.; KALTENBACH, M. Die Morphologie der Myokardbiopsie und ihre klinische. **Z. Kardiol.**, v.71, p.787-94, 1982.
80. POPMA, J.J.; CIGARROA, R.G.; BUJA, L.M.; HILLIS, L.D. Diagnostic and prognostic utility of right-sided catheterization and endomyocardial biopsy in idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am. J. Cardiol.**, v.63, p.955-8, 1989.
81. BAANDRUP, U.; FLORIO, R.A.; REHAHN, M.; RICHARDSON, P.J.; OLSEN, E.G.J. Critical analysis of endomyocardial biopsies from patients suspected of having cardiomyopathy II: *Comparison of histology and clinical/hemodynamic information*. **Br. Heart J.**, v.45, p.487-93, 1981.
82. COKER, M.L.; SPINALE, F.G. Myocardial extracellular matrix remodeling with the development of pacing induced congestive heart failure: contributory mechanisms. **Cardiovasc. Pathol.**, v.7, p.161-8, 1998.
83. JALIL, J.E.; DOERING, C.W.; JANICKI, J.S.; PICK, R.; SHROFF, S.G.; WEBER, K.T. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. **Circ. Res.**, v.64, p.1041-50, 1989.
84. HESS, O.M.; SCHNEIDER, J.; KOCH, R.; BAMERT, C.; GRIMM, J.; KRAYENBUEHL, P.H. Diastolic function and myocardial structure in patients with myocardial hypertrophy. **Circulation**, v.63, p.360-71, 1981.

85. SOUFEN, H.N. Análise histológica e molecular da fibrose miocárdica em pacientes portadores de miocardiopatia dilatada de diferentes etiologias. São Paulo, 2001. 102p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
86. NAKAYAMA, Y.; SHIMIZU, G.; HIROTA, Y.; SAITO, T.; KINO, M.; KITAURA, Y.; KAWAMURA, K. Functional and histopathologic correlation in patients with dilated cardiomyopathy: an integrated evaluation by multivariate analysis. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.10, p.186-92, 1987.
87. CAPASSO, J.M.; PALACKAL, T.; OLIVETTI, G.; ANVERSA, P. Left ventricular Failure Induced by Long-term Hypertension in Rats. **Circ. Res.**, v.66, p.1400-12, 1990.
88. UNVERFERTH, D.V.; MAGORIEN, R.D.; KOLIBASH, A.J.; LEWIS, R.P.; LYKENS, M.; ALTSCHULD, R.; BABA, N.; LEIER, C.V. Biochemical and histologic correlates of ventricular end-diastolic pressure. **Int. J. Cardiol.**, v.1, p.133-42, 1981.
89. SCHWARZ, F.; FLAMENG, W.; SCHAPER, J.; LANGEBARTELS, F.; SESTO, M.; HEHRLEIN, F.; SCHLEPPER, M. Myocardial structure and function in patients with aortic valve disease and their relation to postoperative results. **Am. J. Cardiol.**, v.41, p.661-9, 1978.
90. BRILLA, C.G.; MATSUBARA, L.S.; WEBER, K.T. Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension. **Am. J. Cardiol.**, v.71, p.12A-16A, 1993.
91. CAMPBELL, S.C.; JANICKI, J.S.; MATSUBARA, B.B.; WEBER, K.T. Myocardial Fibrosis in the rat with mineralocorticoid excess. Prevention of scarring by amiloride. **Am. J. Hypertens.**, v.6, p.487-95, 1993.
92. SANDERSON, J.E.; COCKRAM, C.S.; YU, C.M.; CAMPBELL, S.C.; WEBER, K.T. Myocardial fibrosis and hyperaldosteronism. **Eur. Heart J.**, v.17, p.:1761-2, 1996.
93. McMURRAY, J.J.; RAY, S.G.; ABDULLAH, I.; DARGIE, H.J.; MORTON, J.J. Plasma endothelin in chronic heart failure. **Circulation**, v.85, p.1374-9, 1992.

94. RAMIRES, F.J.A.; NUNES, V.L.; FERNANDES, F.; MADY, C.; RAMIRES, J.A.F. Endothelins and myocardial fibrosis. **J. Card. Fail.**, v.9, p.232-7, 2003.
95. LEVINE, B.; KALMAN, J.; MAYER, L.; FILLIT, H.M.; PACKER, M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. **N. Engl. J. Med.**, v.323, p.236-41, 1990.
96. BOZKUNT, B.; KRIBBS, S.B.; CLUBB, F.J. Pathophysiologically relevant concentration of tumor necrosis factor-alpha promotes progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. **Circulation**, v.97, p.1382-91, 1998.