

SANDRIGO MANGINI

**Agentes infecciosos e inflamação em miocárdio de pacientes  
com miocardiopatia dilatada**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Edimar Alcides Bocchi

São Paulo

2013

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mangini, Sandrigo

Agentes infecciosos e inflamação em miocárdio de pacientes com  
miocardiopatia dilatada / Sandrigo Mangini. -- São Paulo, 2013.

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

Programa de Cardiologia.

Orientador: Edimar Alcides Bocchi.

Descritores: 1.Insuficiência cardíaca 2.Miocardiopatia dilatada  
3.Inflamação 4.Vírus 5.Bactérias 6.Doença de Chagas 7.Biopsia 8.Biologia  
molecular

USP/FM/DBD-014/13

***Dedicatória***

*Aos meus pais, Luiz e Domingas, que se abdicaram das próprias vidas pela formação dos filhos; esta é a colheita da semente plantada por vocês há muitos anos; meu eterno carinho, amor e gratidão.*

*À minha esposa Renata, por seu amor incondicional, companheirismo, carinho e cumplicidade; com você, minha vida passou a ter muito mais sentido; meu eterno carinho, amor e gratidão.*

# ***Agradecimientos***

*À minha irmã Soraya, meu cunhado Maurício, meus sobrinhos Enzo e Sofia, minha madrinha Elsa, minha afilhada Beatriz, meus tios Flávio e Abílio e meus avós Abílio e Terezinha pela torcida, amor e carinho; obrigado por tudo!*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Edimar Alcides Bocchi por sua brilhante capacidade intelectual e visão para pesquisa; obrigado pelas discussões, paciência e incentivo.*

*À Prof. Dra. Maria de Lourdes Higuchi, e suas assistentes Joyce Kawakami, Márcia Reis, Renata Ikegami e Suely Palomino pela atenção e esforço incondicionais para realização deste trabalho; sem o esforço de vocês, nada disso seria possível.*

*Aos meus eternos Professores: Dr. Sílvio dos Santos Carvalhal, Dra. Maria Aparecida Barone Teixeira e Dr. Wilson Nadruz Jr; vocês me transformaram em médico.*

*Ao Prof. Dr. Fernando Bacal, meu padrinho e exemplo de médico; obrigado pelo apoio constante e por me permitir fazer parte de seu time.*

*Aos assistentes da Unidade de Insuficiência Cardíaca e Transplante do InCor HCFMUSP, Dra. Silvia Moreira Ayub-Ferreira, Dr. Victor Sarli Issa, Dr. Paulo Roberto Chizzola, Dr. Germano Emílio Conceição Souza e Dra. Fátima das Dores Cruz pelo apoio, e especialmente, à Dra. Silvia Moreira Ayub-Ferreira pela contribuição para as análises estatísticas.*

*Aos meus amigos de pós-graduação Dra. Fabiana Goulart Marcondes-Braga, Dr. Tarso Augusto Duenhas Accorsi, Dr. Aguinaldo Freitas Jr, Dr Cristiano Pereira Silva, Dr. Odilson Silvestre, Dr. Abrão Abuhab e Dr. Phillipe Vieira Pires por dividirem as angústias e incertezas desta fase de nossa formação.*

*À secretária Maria de Lourdes Ribeiro pelo constante apoio.*

*À Comissão de Pós-graduação em especial à Neusa Rodrigues Dini e Juliana Lattari Sobrinho pela atenção e orientação.*

*Aos membros participantes da minha banca de qualificação, Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires, Dr. Juliano Novaes Cardoso e Prof. Dra. Vera Demarchi Aiello pelas valiosas sugestões que contribuíram para a finalização desta tese.*

*Aos pacientes com insuficiência cardíaca, que em meio ao sofrimento causado pela própria doença, em nenhum momento hesitaram em participar e colaborar com a pesquisa.*

*Aos doadores de múltiplos órgãos e seus familiares, pelo gesto de amor incondicional e colaboração com a pesquisa.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão do auxílio à pesquisa e o apoio financeiro para a realização deste projeto.*

***“Quem não sabe o que procura, não reconhece quando encontra”***

***Claude Bernard***

## DEDICATÓRIA e AGRADECIMENTOS

### SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE FOTOS

<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
1.1 Miocardiopatia .....	6
1.1.1 Histórico e Conceito de Miocardiopatia .....	6
1.2 Miocardiopatia Dilatada .....	8
1.2.1 Miocardiopatia Inflamatória .....	10
1.2.2 Miocardite: Biopsia Endomiocárdica e Histopatologia.....	10
1.2.3 Miocardite: Aspectos Clínicos .....	13
1.2.4 Miocardite: Etiologias e Fisiopatologia .....	13
1.2.4.1 Microorganismos Mais Comumente Descritos.....	15
1.2.5 Miocardite: Técnicas de Detecção de Agentes Infecciosos no Tecido Cardíaco .....	17
1.3 Estudos Relevantes em Miocardite e Miocardiopatia Dilatada Idiopática .....	18
1.3.1 Informações Nacionais.....	18
1.3.2 Ensaio Clínico em Miocardite e Miocardiopatia Dilatada Idiopática .....	19
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>20</b>
2.1 Primário .....	21
<b>3. MÉTODO .....</b>	<b>22</b>
3.1.1 Critérios de Inclusão Miocardiopatia Dilatada Idiopática .....	23
3.1.2 Critérios de Exclusão Miocardiopatia Dilatada Idiopática .....	24
3.2 Dinâmica do Estudo .....	25
3.3 Avaliação Histológica .....	26
3.3.1 Imunohistoquímica: Técnica de Imunoperoxidase .....	26
3.4 Biologia Molecular .....	28
3.4.1 Extração de DNA e Padronização da PCR Convencional.....	28
3.4.2 Adenovírus .....	29
3.4.3 Citomegalovírus .....	29
3.4.4 Epstein-Barr vírus .....	30
3.4.5 Herpes vírus humano 6 .....	30
3.4.6 Parvovírus B19 .....	30
3.4.7 <i>Chlamydia pneumoniae</i> .....	30
3.4.8 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	31
3.4.9 <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	31
3.5 Hibridização <i>in situ</i> e Microscopia Eletrônica.....	31
3.5.1 Hibridização <i>in situ</i> .....	31
3.5.2 Microscopia Eletrônica .....	32



<b>4. MÉTODO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>33</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
5.1 Características das Populações Estudadas .....	36
5.1.1 Grupo Controle: Doadores de Transplante Cardíaco .....	36
5.1.2 Grupo Miocardiopatia Dilatada .....	38
5.1.3 Doadores x Miocardiopatia Dilatada: idade, sexo e laboratório .....	41
5.2.1 Critérios de Inflamação: CD3 e CD68 .....	43
5.2.2 Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Linfócitos T (CD3) .....	43
5.2.3 Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Macrófagos (CD68) .....	45
5.2.4 Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Celularidade, HLA e ICAM .....	47
5.2.5 Comparação da Expressão de HLA e ICAM nos Doadores e Miocardiopatas em Relação ao Infiltrado Inflamatório por CD3 e CD68.....	50
5.2.6 Tempo de Início dos Sintomas de IC x Celularidade, HLA e ICAM.....	52
5.3 Pesquisa de Microorganismos por Imunohistoquímica.....	53
5.4 Correlação entre Células Inflamatórias, HLA, ICAM e Microorganismos ..	60
5.5 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular .....	65
5.5.1 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular: Doadores.....	65
5.5.2 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular: Miocardiopatia Idiopática .....	69
5.5.3 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular: Miocardiopatia Chagásica .....	73
5.5.4 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular: Miocardiopatia Isquêmica .....	76
5.5.5 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular: Outras Miocardiopatias.....	79
5.5.6 Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Microorganismos .....	82
5.5.7 Inflamação x Microorganismos por Biologia Molecular .....	83
5.6 Pesquisa de PB19 por Hibridização <i>in situ</i> .....	84
5.7 Pesquisa de Microorganismos por Microscopia Eletrônica .....	85
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
6.1 Vírus na Miocardiopatia Chagásica .....	90
6.2 Inflamação nos Doadores .....	91
6.3 Celularidade Inflamatória na Doença de Chagas e Diferentes Miocardiopatias .....	94
6.4 Elevada Frequência de Microorganismos nos Doadores e nas Miocardiopatias .....	95
6.4.1 Parvovírus B19 .....	95
6.4.2 Enterovírus .....	96
6.4.3 Hepatites B e C .....	97
6.4.4 Borrelia .....	98
6.4.5 Clamídia e Micoplasma .....	99
6.4.6 A Relação Causal entre a Presença de Microorganismos no Tecido Miocárdico e o Desenvolvimento de Miocardiopatia .....	100
6.4.7 Agentes Infeciosos no Miocárdio de Doadores .....	102
6.4.8 Considerações sobre as Técnicas de Detecção de Microorganismos ..	103
<b>7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>	<b>106</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>9. IMPLICAÇÃO CLÍNICA .....</b>	<b>111</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>113</b>
<b>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>127</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADV	adenovírus
ACC	<i>American College of Cardiology</i>
AE	átrio esquerdo
AHA	<i>American Heart Association</i>
AVC	acidente vascular cerebral
BIA	balão-intra-aórtico
bpm	batimentos por minuto
BRA	bloqueador dos receptores da angiotensina
CAR	<i>Coxsackievirus and Adenovirus Receptor</i>
CD3	linfócitos T
CD20	linfócitos B
CD68	macrófagos
CD45R0	leucócitos ativados
CF	classe funcional
CH	etiologia chagásica
CMV	citomegalovírus
CP	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
CPK	creatinofosfoquinase
DAVD	displasia arritmogênica do ventrículo direito
Dobu	dobutamina
DDVE	diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DO	doador
DSVE	diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPN	dispnéia paroxística noturna
EBV	Epstein-Barr vírus
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
Entero	enterovírus
FC	frequência cardíaca
FEVE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HBs	Antígeno de superfície hepatite B
HBc	Antígeno do núcleo hepatite B
HS1	<i>Herpes simplex 1</i>
HS2	<i>Herpes simplex 2</i>
HC	Hospital das Clínicas
HLA classe II	<i>Human Leukocyte Antigen</i> – classe II
HHV6	Herpes Vírus Humano-6
HIV	vírus da imunodeficiência humana
iECA	inibidor da enzima conversora de angiotensina
IC	insuficiência cardíaca
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
ID	etiologia idiopática
IL	Interleucina
IMC	índice de massa corporal
IMP	proteína integral de membrana EBV
InCor	Instituto do Coração
IS	etiologia isquêmica
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
Masc	Masculino
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>

Mioc	Miocardiopatia
MP	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
n	número de pacientes
N	Negativo (biologia molecular)
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
NS1	proteína não estrutural 1 PB19
Nitro	nitroprussiato de sódio
nr	não realizado (biologia molecular)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OU	Outras etiologias
p	significância estatística
P	Positivo (biologia molecular)
pb	pares de base
PAS	pressão arterial sistólica
PAD	pressão arterial diastólica
PB19	parvovírus B19
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
p25	percentil 25
p75	percentil 75
r	correlação
RHJ	refluxo hepato-jugular
RNA	ácido ribonucléico
TA	temperatura ambiente
TCE	trauma crânio-encefálico
TE	Tris-EDTA
TNF $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
UV	ultravioleta
VD	ventrículo direito
VP1	proteína viral do capsídeo 1 PB19
VP2	proteína viral do capsídeo 2 PB19
WHF	<i>World Heart Federation</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
% área	porcentagem de área
céls/mm <sup>2</sup>	células por milímetro quadrado
pg/mL	picogramas por ml
pmol	picomol
pmol/L	picomol por litro
ml/min	mililitros por minuto
<	menor
>	maior
ng/ml	nanogramas por mililitro
ng/μL	nanogramas por microlitro
>	maior ou igual
≤	menor ou igual
kg	quilograma
bpm	batimentos por minuto
mg/dl	miligramas por decilitro
mg/ml	miligramas por mililitro
ml/kg/min	mililitros por quilo por minuto
mmHg	milímetros de mercúrio
°C	graus Celsius
mL	mililitros
-	menos
m	metros
x	versus
mm	milímetros
mm <sup>2</sup>	milímetros quadrados
mm <sup>3</sup>	milímetros cúbicos
μL	microlitros
mL/min	mililitros por minuto
°C/min	graus Celsius por minuto
mg/L	miligramas por litro
mol/L	mol por litro
mM	milimolar
nm	nanômetros
g/dL	gramas por decilitro
mg/dL	miligrama por decilitro
mEq/L	mEq por litro
mg%	miligrama por cento
U/L	unidades por litro
μg/μL	microgramas por microlitro
μg/mL	microgramas por mililitro
=	igual
±	mais ou menos
μg/kg/min	microgramas por quilo por minuto
nmol/L	nanomol por litro

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Mecanismos envolvidos no desenvolvimento das miocardiopatias	10
Tabela 2.	Critérios de Dallas	11
Tabela 3.	Causas infecciosas e não infecciosas de miocardite	14
Tabela 4.	Protocolo das Reações de Imunohistoquímica	27
Tabela 5.	Grupo Controle: Doadores de Transplante Cardíaco	37
Tabela 6.	Grupo Miocardiopatia Dilatada	39
Tabela 7.	Tratamento: Miocardiopatia Dilatada	40
Tabela 8.	Diferentes Etiologias de Miocardiopatia Dilatada	40
Tabela 9.	Idade, Sexo e Exames Laboratoriais de Doadores e Miocardiopatia Dilatada	42
Tabela 10.	Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Inflamação por Linfócitos T (CD3)	43
Tabela 11.	Inflamação: Linfócitos T (CD3) por Etiologias	44
Tabela 12.	Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Inflamação por Macrófagos (CD68)	45
Tabela 13.	Inflamação: Macrófagos (CD68) por Etiologias	46
Tabela 14.	Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Celularidade, HLA e ICAM	47
Tabela 15.	Celularidade, HLA e ICAM por Etiologias	49
Tabela 16.	Celularidade, HLA e ICAM por Etiologias, sem doença de Chagas	50
Tabela 17.	Inflamação: Celularidade x HLA e ICAM	51
Tabela 18.	Tempo do Início dos Sintomas de IC x Celularidade, HLA e ICAM	52
Tabela 19.	Pesquisa de Vírus por Imunohistoquímica	54
Tabela 20.	Pesquisa de Bactérias por Imunohistoquímica	54

Tabela 21. Pesquisa Viral por Imunohistoquímica: Doadores e Diferentes Etiologias	55
Tabela 22. Pesquisa Bacteriana por Imunohistoquímica: Doadores e Diferentes Etiologias	55
Tabela 23. Pesquisa Viral por Imunohistoquímica: Doadores e Diferentes Etiologias, sem Doença de Chagas	56
Tabela 24. Pesquisa Bacteriana por Imunohistoquímica: Doadores e Diferentes Etiologias, sem Doença de Chagas	56
Tabela 25. Localização dos Antígenos de Microorganismos no Tecido Miocárdico	57
Tabela 26. Doadores: Linfócitos T (CD3) x Outras Células, HLA, ICAM e Microorganismos	61
Tabela 27. Doadores: Macrófagos (CD68) x Outras Células, HLA, ICAM e Microorganismos	62
Tabela 28. Miocardiopatas: Linfócitos T (CD3) x Outras células, HLA, ICAM e Microorganismos	63
Tabela 29. Miocardiopatas: Macrófagos (CD68) x Outras células, HLA, ICAM e Microorganismos	64
Tabela 30. Pesquisa de Agentes Infeciosos por Biologia Molecular: Doadores	66
Tabela 31. Pesquisa de Agentes Infeciosos por Biologia Molecular: Miocardiopatia Idiopática	70
Tabela 32. Pesquisa de Agentes Infeciosos por Biologia Molecular: Miocardiopatia Chagásica	74
Tabela 33. Pesquisa de Agentes Infeciosos por Biologia Molecular: Miocardiopatia Isquêmica	77
Tabela 34. Pesquisa de Agentes Infeciosos por Biologia Molecular: Outras Miocardiopatias	80
Tabela 35. Pesquisa de Vírus e Bactérias por Biologia Molecular	82
Tabela 36. Pesquisa de Vírus e Bactérias: Doadores e Miocardiopatias	82
Tabela 37. Inflamação x Número de Microorganismos	83

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Dinâmica do Estudo	25
Gráfico 2.	Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Inflamação por Linfócitos T (CD3)	43
Gráfico 3.	Inflamação: Linfócitos T (CD3) por Etiologias	44
Gráfico 4.	Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Inflamação por Macrófagos (CD68)	45
Gráfico 5.	Inflamação: Macrófagos (CD68) por Etiologias	46
Gráfico 6.	Quantificação de Linfócitos T (CD3): Doadores e Diferentes Etiologias	49
Gráfico 7.	Expressão de HLA: Doadores e Diferentes Etiologias	50
Gráfico 8.	Genoma Viral: Doadores	68
Gráfico 9.	Genoma Bacteriano: Doadores	68
Gráfico 10.	Genoma Viral: Miocardiopatia Idiopática	72
Gráfico 11.	Genoma Bacteriano: Miocardiopatia Idiopática	72
Gráfico 12.	Genoma Viral: Miocardiopatia Chagásica	75
Gráfico 13.	Genoma Bacteriano: Miocardiopatia Chagásica	75
Gráfico 14.	Genoma Viral: Miocardiopatia Isquêmica	78
Gráfico 15.	Genoma Bacteriano: Miocardiopatia Isquêmica	78
Gráfico 16.	Genoma Viral: Outras Miocardiopatias	81
Gráfico 17.	Genoma Bacteriano: Outras Miocardiopatias	81

## LISTA DE FOTOS

Foto 1.	Infiltrado de Linfócitos T (CD3) em Mioc. Idiopática	44
Foto 2.	Infiltrado de Macrófagos (CD68) em Doador	46
Foto 3.	Expressão de HLA de classe II em Mioc. Chagásica	47
Foto 4.	Expressão de HLA de classe II em Doador	48
Foto 5.	Expressão de ICAM-I em Mioc. Chagásica	48
Foto 6.	Parvovírus B19 em Mioc. Idiopática	57
Foto 7.	Enterovírus em Doador	58
Foto 8.	HHV6 em Mioc. Idiopática	58
Foto 9.	Hepatite B – antígeno HBs em Mioc. Idiopática	59
Foto 10.	Hepatite C em Mioc. Idiopática	59
Foto 11.	Borrelia em Mioc. Chagásica	60
Foto 12.	Imunohistoquímica Parvovírus B19 em Mioc. Idiopática	84
Foto 13.	Hibridização <i>in situ</i> Parvovírus B19 em Mioc. Idiopática	84
Foto 14.	Enterovírus em Doador	85
Foto 15.	Parvovírus B19 e Hepatite C em Mioc. Idiopática	86
Foto 16.	HHV6 e Hepatite B em Mioc. Idiopática	86
Foto 17.	Borrelia em Mioc. Idiopática	87
Foto 18.	Hepatite C em Mioc. Chagásica	87
Foto 19.	HHV6 e Borrelia em Mioc. Chagásica	88



## RESUMO

Mangini S. Agentes infecciosos e inflamação em miocárdio de pacientes com miocardiopatia dilatada [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica de alta morbimortalidade e em uma parcela expressiva de casos, sem etiologia definida, o papel de agentes infecciosos tem sido considerado. No entanto, muitas dúvidas existem neste contexto, além de incipiente participação da população nacional em estudos sobre o tema. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência de agentes infecciosos pré-estabelecidos e de inflamação, em fragmentos de biopsia endomiocárdica de pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e miocardiopatias de outras etiologias específicas, em comparação a grupo controle sem evidência de cardiopatia. Entre julho de 2008 e agosto de 2011 foram estudados fragmentos de biopsia endomiocárdica de pacientes internados com miocardiopatia dilatada idiopática em avaliação para transplante cardíaco, doadores e corações explantados de diferentes miocardiopatias. Foram definidos 2 grupos: doadores (29 casos) e miocardiopatas (55 casos, incluindo, 32 idiopáticos, 9 chagásicos, 6 isquêmicos e 8 de outras etiologias específicas). Observamos que a inflamação por linfócitos T foi mais intensa nos miocardiopatas em relação aos doadores, não havendo diferença em relação à presença de macrófagos, expressão de HLA de classe II e de ICAM-I. Quando se comparou por etiologia, a inflamação na doença de Chagas foi preponderante. A pesquisa de microorganismos por imunohistoquímica demonstrou uma maior expressão de antígenos de enterovírus nos doadores, de borrelia e das hepatites B e C nos miocardiopatas. Por biologia molecular, em todos os grupos, a positividade para os microorganismos foi elevada, incluindo co-infecções, havendo uma maior positividade de adenovírus e HHV6 nos doadores em relação aos miocardiopatas. Os parâmetros de inflamação não se correlacionaram à presença de microorganismos, quer seja por imunohistoquímica ou por biologia molecular. Que seja do nosso conhecimento, este estudo foi pioneiro ao demonstrar a presença de vírus em tecido cardíaco de miocardiopatia chagásica e aumento da expressão de HLA de classe II, ICAM-I e do número

de macrófagos em fragmentos de biopsia endomiocárdica de doadores, tal como nas miocardiopatias. Assim, podemos concluir que a presença de agentes infecciosos e inflamação no miocárdio de pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática é frequente, e da mesma forma, em doadores de transplante cardíaco e miocardiopatias de outras etiologias. Com base em nosso estudo, a relação causal entre a presença de agentes infecciosos no tecido cardíaco e o desenvolvimento de miocardiopatia é controversa. Novos estudos envolvendo a quantificação de cópias de microorganismos, utilização de diferentes técnicas simultaneamente, sequenciamento de cepas patogênicas, simbiose entre agentes e o hospedeiro, produção de autoanticorpos mediada por microorganismos e predisposição genética do hospedeiro devem ser realizados visando estabelecer o real papel de agentes infecciosos no desenvolvimento das miocardiopatias.

Descritores: 1. Insuficiência cardíaca 2. Miocardiopatia dilatada 3. Inflamação 4. Vírus 5. Bactérias 6. Doença de Chagas 7. Biopsia 8. Biologia molecular

## **ABSTRACT**

Mangini S. Infectious agents and inflammation in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Heart failure is a clinical syndrome with high morbidity and mortality. In a significant portion of cases of unknown etiology, the role of infectious agents has been considered. However, there are many pitfalls in this context and incipient studies including national population. The aim of this study was to determine the frequency of predetermined infectious agents and inflammation in endomyocardial biopsy specimens from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and other specific etiologies, compared to the control group without heart disease. Between July 2008 and August 2011 were studied endomyocardial biopsy specimens from hospitalized patients with idiopathic dilated cardiomyopathy undergoing evaluation for heart transplantation, donors and explanted hearts from different cardiomyopathies. 2 groups were defined: donors (29 cases) and cardiomyopathy (55 cases, including 32 idiopathic, 9 chagasic, 6 ischemic and 8 other specific etiologies). We observed that inflammation by T lymphocytes was more intense in cardiomyopathy in relation to donors and no difference regarding the presence of macrophages, expression of class II HLA and ICAM-I. When comparing by etiology, inflammation in Chagas' disease was predominant. The search of microorganisms by immunohistochemistry showed a higher expression of antigens of enteroviruses in donors, borrelia, hepatitis B and C in cardiomyopathy. In molecular biology, in all groups, the positivity was elevated to microorganisms, including co-infection, with a higher positivity to adenovirus and HHV6 in donors towards cardiomyopathy. The parameters of inflammation did not correlate with the presence of microorganisms, either by immunohistochemistry or by molecular biology. To our knowledge, this study was pioneer demonstrating the presence of virus in the heart tissue of chagasic cardiomyopathy and increased expression of class II HLA, ICAM-I and macrophages in endomyocardial biopsy specimens from donors, as in cardiomyopathies. Thus, we can conclude that the presence of infectious agents and inflammation in the myocardium of patients with idiopathic dilated

cardiomyopathy is frequent, and similarly in heart transplant donors and cardiomyopathies of other etiologies. Based on our study, the causal relationship between the presence of infectious agents in cardiac tissue and the development of cardiomyopathy is controversial. Further studies involving the quantification of copies of microorganisms, simultaneous use of different techniques, sequencing of pathogenic strains, symbiosis between agents and the host, mediated autoantibody production by microorganisms and genetic predisposition of the host must be performed in order to determine the real role of infectious agents in the pathogenesis of cardiomyopathies.

Descriptors: 1. Heart failure 2. Dilated cardiomyopathy 3. Inflammation 4. Virus  
5. Bacteria 6. Chagas' Disease 7. Biopsy 8. Molecular Biology

# ***Introdução***

## **1. INTRODUÇÃO**

A insuficiência cardíaca (IC) é condição de elevada incidência e prevalência. Segundo dados do DATASUS, referentes ao ano de 2011, as doenças do sistema circulatório são a primeira causa de mortalidade no Brasil (21%), sendo a IC a principal responsável pelos óbitos de origem cardiovascular neste período (27,6%) e a principal causa cardiovascular de internação hospitalar (22,5%)<sup>1</sup>.

Apesar de avanços no entendimento da sua fisiopatologia e consequentemente do seu tratamento, persiste com morbidade e mortalidade elevadas<sup>2,3</sup>.

O diagnóstico etiológico da IC tem implicações prognósticas e terapêuticas<sup>4</sup>. Diferentes mecanismos de agressão ao coração como doença arterial coronária, hipertensão arterial sistêmica, microorganismos, valvopatias e cardiopatias congênitas podem estar relacionadas ao desenvolvimento de IC. Entretanto, após avaliação clínica, pode-se não chegar ao diagnóstico etiológico em parcela considerável de pacientes<sup>5</sup>. Quando existe lesão estrutural e funcional do miocárdio levando à IC e sem etiologia definida após investigação clínica, considera-se o diagnóstico de doença do músculo cardíaco de causa desconhecida ou miocardiopatia dilatada idiopática. Tal condição no Brasil e no mundo é muito frequente e acomete aproximadamente um terço dos pacientes com IC.

### **1.1. Miocardiopatia**

#### **1.1.1 Histórico e Conceito de Miocardiopatia**

O termo miocardite foi inicialmente apresentado no início do século XIX, por Corvisart, na diferenciação entre hipertrofia e dilatação das câmaras cardíacas (miocardite hipertrófica)<sup>6</sup>. Joseph Soberheim em 1937 descreveu a miocardite como a presença de inflamação no miocárdio<sup>7</sup>. O conceito de doença do músculo cardíaco foi primeiramente introduzido em meados do século XIX por Virchow<sup>8,9</sup>, em que a doença cardíaca não valvar foi denominada como “miocardite crônica”, sendo a inflamação a única causa reconhecida de doença do miocárdio. Em 1881, Khrel<sup>10</sup> descreveu o conceito

da doença idiopática do músculo cardíaco. Josserand e Gallavardin em 1901<sup>11</sup> utilizaram o termo doença miocárdica primária.

Já no século XX, patologistas observaram baixa freqüência de miocardite crônica nas necropsias; a procura por etiologia não inflamatória foi intensificada e o reconhecimento clínico da lesão do músculo cardíaco secundária à doença coronária e hipertensão aumentou em freqüência<sup>12</sup>. Em 1950, Henry Christian descreveu que um terço das doenças não inflamatórias do coração não poderia ser atribuído à hipertensão ou doença arterial coronária<sup>13</sup>.

O termo miocardiopatia foi utilizado pela primeira vez por Brigden em 1957, para descrever a doença do músculo cardíaco, não relacionada à doença coronária<sup>14</sup>.

Em 1967 a Organização Mundial de Saúde (OMS) realizou um encontro em Kingston (Jamaica) com representantes de várias partes do mundo para discutir sobre as miocardiopatias. Na ocasião Fritz Köberle (FMUSP Ribeirão Preto) e Aluizio Prata (Universidade da Bahia) foram os representantes brasileiros e apresentaram seus estudos em doença de Chagas. A publicação de 1968<sup>15</sup> traz uma ampla discussão sobre os achados de miocardiopatia em diferentes regiões do mundo e apresenta as bases para o diagnóstico clínico da “cardiomegalia idiopática”.

Goodwin e Oakley, em 1972, propuseram a classificação das miocardiopatias em congestiva, hipertrófica ou obliterativa<sup>16</sup>.

Na década de 1980 a OMS definiu miocardiopatias como doenças do miocárdio de causas desconhecidas e as classificou em dilatada, hipertrófica e restritiva. Quando associadas a alterações sistêmicas ou cardíacas conhecidas foram classificadas como miocardiopatias específicas (isquêmica, valvar, por hipertensão, congênita, infecciosa, metabólica, distrofias musculares, tóxicas, periparto)<sup>17</sup>.

Em 1995 a OMS coordenou uma segunda força tarefa para definição e classificação das miocardiopatias<sup>18</sup>. Na ocasião foi acrescida à classificação a displasia arritmogênica de ventrículo direito (DAVD). Em relação às miocardiopatias específicas o conceito de miocardiopatia inflamatória foi introduzido com base em achados histológicos, imunológicos e

imunohistoquímicos e englobando não apenas as infecções, mas também autoimunidade e inflamação idiopática.

Com a progressão do conhecimento científico em relação à melhor definição de causas até então desconhecidas, uma década depois, a *American Heart Association / American College of Cardiology* (AHA / ACC) revisou o conceito de miocardiopatias as reclassificando em primárias e secundárias<sup>19</sup>. As miocardiopatias primárias seriam restritas ao músculo cardíaco e foram divididas em genéticas (hipertrófica, DAVD, miocárdio não-compactado, doenças de depósito de glicogênio, miopatias mitocondriais, doenças dos canais iônicos), mistas (miocardiopatia dilatada, restritiva) e adquiridas (inflamatórias, por estresse, periparto, taquicardiomiopatia). As secundárias apresentariam envolvimento miocárdico relacionado a uma variedade de alterações sistêmicas acometendo também outros órgãos.

Em 2008 a Sociedade Européia de Cardiologia (ESC) também publicou uma nova classificação<sup>20</sup>. Manteve o conceito da década de 1980 das miocardiopatias como exclusão de causas específicas e da revisão de 1995 dividindo as miocardiopatias em hipertrófica, dilatada, DAVD, restritiva e não-classificadas, além disso subdividiu este conjunto de miocardiopatias em genéticas/familiares ou não-genéticas/não-familiares.

## **1.2 Miocardiopatia Dilatada**

Combinando estes conceitos evolutivamente apresentados, dentre as miocardiopatias primárias, a miocardiopatia dilatada é a causa mais comum e pode estar relacionada a diferentes situações podendo ser genética e/ou familiar, adquirida ou mista. Estruturalmente apresenta-se com dilatação e comprometimento da contração do ventrículo esquerdo ou de ambos os ventrículos. Pode ser diagnosticada em associação com doenças cardiovasculares reconhecidas, porém, para se definir como miocardiopatia dilatada a extensão da disfunção miocárdica não pode ser explicada por sobrecarga de câmaras ou isquemia<sup>21</sup>.

Pode acometer indivíduos de qualquer idade, sexo ou raça, apesar de um predomínio do sexo masculino<sup>21</sup>. Sua prevalência na população geral é imprecisa e provavelmente subestimada. Em crianças estima-se uma incidência de 0,57 casos/100000/ano, com predomínio do sexo masculino,



negros e crianças abaixo de 1 ano, sendo dois terços dos casos provavelmente sem causa definida<sup>22</sup>. Em adultos a prevalência estimada é de 1 para cada 2500 indivíduos, com uma incidência provavelmente subestimada de 7 casos/100000/ano<sup>23</sup>.

Na tabela 1 estão descritos os principais mecanismos relacionados ao desenvolvimento de miocardiopatia dilatada. Mutações genéticas são encontradas em 30 a 50% dos pacientes e podem envolver diferentes proteínas do citoesqueleto e do sarcômero de cardiomiócitos<sup>21,24</sup>, além disso, algumas formas da doença têm caráter familiar, podendo-se encontrar doença cardíaca em 20 a 65%<sup>4,25,26</sup> das famílias de pacientes com miocardiopatia dilatada<sup>27</sup>. Herança autossômica dominante é a mais comum, e menos frequentemente podemos encontrar herança ligada ao X, autossômica recessiva e mitocondrial<sup>28</sup>. Outro escopo da miocardiopatia dilatada de destaque é a miocardiopatia inflamatória quer seja por auto-imunidade ou secundária a agentes infecciosos<sup>29</sup>. A auto-imunidade se considera a partir do achado de infiltrado inflamatório na ausência de agentes infecciosos identificáveis em tecido miocárdico, aliado ao aumento da expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), moléculas de adesão e presença de autoanticorpos circulantes em pacientes com miocardiopatia dilatada<sup>30,31,32</sup>. Genoma viral tem sido detectado em 10 a 71% dos pacientes com miocardiopatia dilatada com predomínio de parvovírus B19 (PB19)<sup>33,34</sup>, enterovírus<sup>35</sup> e adenovírus<sup>36</sup>; outros agentes etiológicos também têm sido descritos<sup>37</sup>. Entretanto, a relação causal entre o achado de agentes infecciosos e o desenvolvimento de doença ainda é motivo de debate<sup>38,39</sup>. Os aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares da miocardiopatia inflamatória serão discutidos a seguir.

**Tabela 1.****Mecanismos envolvidos no desenvolvimento das miocardiopatias**

Mutações genéticas

Infecções

Toxicidade de drogas

Apoptose

Autoanticorpos e doenças auto-imunes

Doenças metabólicas de depósito

Disfunção mitocondrial

Doenças de canais iônicos

Taquicardiomiopatia

Periparto

Doença infiltrativa

Doença endomiocárdica

Doenças endócrinas

Deficiências nutricionais

Distúrbios eletrolíticos

Adaptado de Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. Lancet 2010; 375: 752-62<sup>18</sup>.

**1.2.1 Miocardiopatia Inflamatória**

Segundo consenso da OMS de 1995<sup>18</sup> a miocardiopatia inflamatória é definida como miocardite associada à disfunção cardíaca com base em achados histológicos, imunológicos e imunohistoquímicos. Pode ser relacionada à agressão infecciosa, auto-imune ou idiopática. Para seu diagnóstico é necessária a realização de biopsia endomiocárdica. Assim, a miocardite é o substrato histopatológico, que aliado à disfunção cardíaca resulta na miocardiopatia inflamatória.

**1.2.2 Miocardite: biopsia endomiocárdica e histopatologia**

A primeira descrição de técnica não cirúrgica de biopsia endomiocárdica ocorreu na década de 1950<sup>40</sup>. A partir da década de 70 as pinças reutilizáveis se tornaram o método padrão e mais recentemente as pinças descartáveis tem substituído as reutilizáveis.

Apesar de discussões sobre seus riscos e potenciais benefícios, se mantém como padrão-ouro para o diagnóstico de miocardite. Em centros com profissionais experientes para realização do procedimento o índice de complicações é baixo<sup>41</sup>. A abordagem habitual é através da veia jugular interna ou femoral visando fragmentos do septo do ventrículo direito, sob visualização, através de radioscopia na sala de hemodinâmica.

Em 2007 foi publicada uma diretriz conjunta AHA / ACC / ESC sobre o uso da biopsia endomiocárdica no manejo das doenças cardiovasculares<sup>42</sup>, definindo os cenários clínicos possíveis para utilização desta estratégia incluindo níveis de evidência e graus de recomendação. Pela diretriz, na investigação de IC de início recente, sem melhora com tratamento convencional, a biopsia endomiocárdica é altamente recomendada. Nos casos de miocardiopatia dilatada de causa indeterminada recomenda-se que a investigação seja realizada em centros com elevada expertise em anatomia patológica e estrutura para realização de análises histológicas, imunohistológicas e de biologia molecular.

Baseado na histopatologia, diversos tipos de miocardite podem ser identificadas: linfocitária, eosinofílica, polimorfonuclear, células gigantes e granulomatosa. A miocardite linfocitária é a forma mais comum<sup>43</sup>.

A intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório são muito variáveis, apresentando desde um pequeno foco solitário a agregados multifocais e comprometimento difuso de amplo espectro.

**Tabela 2.**  
**Critérios de Dallas**

<b>Biopsia inicial</b>	<b>Biopsia de seguimento</b>
Miocardite ativa	Miocardite persistente
Miocardite “borderline”	Miocardite em resolução
Ausência de miocardite	Miocardite resolvida

A presença ou ausência de fibrose pode ser descrita

Em 1987<sup>44</sup> foram publicados os critérios de Dallas para o diagnóstico de miocardite (tabela 2); duas classificações separadas são utilizadas para a biopsia inicial e a de seguimento. Estes critérios avaliam a presença de

infiltrado inflamatório celular, com ou sem necrose de miócitos, em fragmentos de tecido cardíaco corados em hematoxilina-eosina. Apesar de terem sido utilizados por mais de 20 anos, apresentam limitações relacionadas à variabilidade interobservador, valor prognóstico, discrepância com outros marcadores de ativação imune ou infecciosa do miocárdio e baixa sensibilidade<sup>45,46</sup>.

Devido à limitação dos critérios de Dallas para o diagnóstico de miocardiopatia inflamatória, novas estratégias foram desenvolvidas a partir da utilização de técnicas de imunohistoquímica para marcação de linhagens celulares<sup>47</sup> (linfócitos T, linfócitos B e macrófagos), expressão de HLA<sup>48</sup> e moléculas de adesão<sup>49</sup>.

Estudos que avaliaram a presença de células inflamatórias em corações normais<sup>50,51,52,53,54</sup> e também de doadores de transplante cardíaco<sup>55</sup>, demonstraram a presença de leucócitos e macrófagos, em especial linfócitos, porém em quantidade reduzida. Com base nestes achados, um consenso do Conselho de Miocardiopatias da *World Heart Federation* (WHF)<sup>56</sup> especificou como inflamação na BEM a contagem de leucócitos  $\geq 14$  células / mm<sup>2</sup>. Mais recentemente, outros autores tem levado em consideração para definição de inflamação na BEM a contagem  $\geq 14$  leucócitos/mm<sup>2</sup> e/ou  $\geq 7$  linfócitos T / mm<sup>2</sup><sup>43,57,58</sup>.

Os macrófagos são células importantes tanto na resposta imune inata quanto no desenvolvimento da imunidade adquirida e apresentam um papel de ativação do sistema imune através da produção de citocinas, favorecendo a perpetuação da inflamação<sup>59</sup>; podem ser evidenciados por imunohistoquímica com a marcação CD68. Na miocardiopatia inflamatória, o papel das diferentes linhagens de linfócitos não está totalmente esclarecido, apesar de sua presença conferir pior prognóstico<sup>39</sup>. A marcação CD3 reconhece os linfócitos T e CD20 os linfócitos B. A marcação CD45R0 reconhece uma isoforma do antígeno comum de leucócitos e está presente em 40% dos linfócitos T e subpopulações de monócitos, macrófagos e granulócitos<sup>60</sup>. Além de sua ação direta sobre microorganismos e os próprios cardiomiócitos, os linfócitos produzem múltiplas citocinas com influência sobre inflamação, reparação e evolução da miocardiopatia<sup>61</sup>.

Além da quantificação de leucócitos, algumas publicações<sup>39,58</sup> têm valorizado a associação do aumento na expressão de MHC (HLA de classes I ou II)<sup>48</sup> e de moléculas de adesão intercelular (ICAM-I)<sup>49</sup> para estabelecer o diagnóstico de inflamação no tecido cardíaco. Para a resposta inflamatória a qualquer agressão, uma rede de receptores endoteliais de adesão e seus ligantes específicos organiza o processo de recrutamento das células do sistema imune<sup>62</sup>. Esta rede é composta por 3 grupos: as integrinas (incluindo a LFA-1 - *lymphocyte function-associated antigen*), as selectinas e a superfamília das imunoglobulinas. Esta última é composta pelos receptores de células T, HLA de classe I e II, CD4, CD8, ICAM, VCAM, LFA-2 e LFA-3. Uma vez que o infiltrado celular pode ser focal e a biopsia não ser representativa desta área, a expressão de HLA / ICAM por ter caráter de distribuição difusa, pode aumentar a sensibilidade para o diagnóstico de inflamação miocárdica<sup>54</sup>.

### **1.2.3 Miocardite: aspectos clínicos**

As manifestações clínicas da miocardite são muito amplas, com um espectro de sintomas variando desde cursos assintomáticos a apresentações com sinais de infarto do miocárdio, IC descompensada e até choque cardiogênico. Dor torácica e arritmias atriais ou ventriculares podem estar presentes, além dos sinais/sintomas de IC aguda ou crônica.

### **1.2.4 Miocardite: etiologias e fisiopatologia**

Conforme tabela 3, existe uma grande gama de microorganismos, substâncias e doenças (em especial auto-imunes) que podem gerar miocardite.

Os agentes infecciosos, principalmente os vírus, tem sido considerados os maiores responsáveis pelo desenvolvimento da inflamação miocárdica.

**Tabela 3.****Causas infecciosas e não infecciosas de miocardite**

<b>Infecciosas</b>	<b>Não infecciosas</b>
<p><b>Vírus:</b> adenovírus, arbovírus, Chikungunya vírus, citomegalovírus, echovírus, enterovírus (Coxsackie B), Epstein-Barr vírus, flavivírus, hepatite B, hepatite C, herpes simplex 1 e 2, herpes vírus humano 6, HIV, influenza A e B, parvovírus B19, sarampo, poliovírus, raiva, vírus sincicial respiratório, rubéola, varicela, varíola</p> <p><b>Bactérias:</b> <i>Burkholderia pseudomallei</i>, <i>Brucella</i>, <i>Chlamydia</i>, <i>Corynebacterium diphtheriae</i>, <i>Francisella tularensis</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>, gonococcus, <i>Clostridium</i>, <i>Legionella</i>, <i>Mycobacterium</i>, <i>Mycoplasma</i>, <i>Neisseria meningitidis</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Streptococcus</i> A, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, tétano, tularemia, cólera</p> <p><b>Espiroquetas:</b> <i>Borrelia</i>, <i>Leptospira</i>, <i>Treponema pallidum</i></p> <p><b>Helmintos:</b> <i>Ascaris</i>, <i>Echinococcus granulosus</i>, <i>Heterophyes</i>, <i>Paragonimus westermani</i>, <i>Schistosoma</i>, <i>Strongyloides stercoralis</i>, <i>Taenia solium</i>, <i>Toxocara canis</i>, <i>Trichinella spiralis</i>, <i>Wuchereria bancrofti</i></p> <p><b>Fungos:</b> <i>Actinomyces</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Blastomyces</i>, <i>Candida</i>, <i>Coccidioides</i>, <i>Cryptococcus</i>, <i>Histoplasma</i>, <i>Mucor</i>, <i>Nocardia</i>, <i>Sporothrix schenckii</i>,</p> <p><b>Protozoários:</b> <i>Balantidium</i>, <i>Entamoeba histolytica</i>, <i>Leishmania</i>, <i>Plasmodium falciparum</i>, <i>Sarcocystis</i>, <i>Trypanosoma cruzi</i>, <i>Trypanosoma brucei</i>, <i>Toxoplasma gondii</i></p> <p><b>Riquetsias:</b> <i>Coxiella burnetti</i>, <i>Orientia tsutsugamushi</i>, <i>Rickettsia rickettsii</i>, <i>Rickettsia prowazekii</i>,</p>	<p><b>Drogas:</b> aminofilina, anfetaminas, antraciclina, catecolaminas, cloranfenicol, cocaína, ciclofosfamida, etanol, fenitoína, 5-flouracil, imatinib, interleucina-2, metisergida, trastuzumab, zidovudina</p> <p><b>Hipersensibilidade:</b> antiinflamatórios não-hormonais, benzodiazepínicos, clozapina, cefalosporinas, dapsona, dobutamina, diuréticos de alça e tiazídicos, estreptomicina, fenobarbital, gefitinib, macrolídeos, metildopa, mexiletine, penicilinas, sulfa, toxóide tetânico, tetraciclina, tricíclicos, vacinas (varíola), venenos (abelha, aranha, cobra, escorpião, vespa)</p> <p><b>Ambientais:</b> arsênico, chumbo, cobre, ferro, monóxido de carbono</p> <p><b>Doenças auto-ímmunes:</b> dermatomiosite, miocardite de células gigantes, doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatóide, doença de Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico, esclerodermia, arterite de Takayasu, granulomatose de Wegener</p> <p><b>Doenças sistêmicas:</b> doença celíaca, síndrome de Churg Strauss, síndrome hipereosinofílica, doença de Kawasaki, sarcoidose</p> <p><b>Outras:</b> hipotermia, rejeição ao transplante, radiação</p>

Adaptado de Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. Lancet 2010; 375: 752-6218

A fisiopatologia da miocardite em humanos não é completamente entendida. Modelos murinos de miocardite viral sugerem, de maneira simplificada, que seu desenvolvimento apresenta 3 fases: aguda (alguns dias), subaguda (algumas semanas a meses) e crônica (desenvolvimento da miocardiopatia dilatada)<sup>63</sup> e além disso, 2 mecanismos patogênicos são descritos: lesão citopática direta induzida pelos microorganismos e resposta imune anticardíaca mediada pelos microorganismos. A fase 1 corresponde à infecção inicial, que pode curar até mesmo sem sequelas ou levar à IC ou morte, ou progredir para as fases 2 / 3<sup>64</sup>. Na maioria dos pacientes com miocardite viral o patógeno é eliminado e o sistema imune reduz sua atividade sem outras complicações adicionais. Entretanto, em uma minoria de pacientes o vírus não é eliminado resultando em lesão miocárdica persistente e inflamação secundária à produção de anticorpos<sup>65</sup>. Assim a miocardite viral poderia ser considerada um dos precursores para o desenvolvimento da miocardiopatia dilatada, sendo observada esta evolução em 21% dos casos de miocardite ao final de 3 anos<sup>66</sup>.

#### 1.2.4.1 Microorganismos mais comumente descritos

**Coxsackie B e Adenovírus:** utilizam um receptor transmembrana (CAR – *coxsackie and adenovirus receptor*) para internalização do seu genoma na célula miocárdica<sup>67</sup>. Quando não existe expressão de CAR na célula miocárdica não ocorre infecção viral por estes agentes<sup>68</sup>. Após a entrada do vírus ocorre lesão aguda da célula miocárdica induzida pela replicação viral levando à necrose, exposição de antígenos intracelulares e ativação do sistema imune, caracterizada pela invasão de células citotóxicas e macrófagos, seguida pela infiltração de linfócitos T. Após a fase aguda, a segunda fase é caracterizada por reações auto-imunes. Nesta fase subaguda existe a ativação dos linfócitos T vírus-específicos, produção de citocinas (fator de necrose tumoral – TNF- $\alpha$ , interleucinas – IL - 1 e 6) e anticorpos contra os vírus e proteínas cardíacas que podem agravar a lesão cardíaca e levar a disfunção contrátil. Na maioria dos pacientes com miocardite a resposta imune é reduzida com a eliminação viral e a função cardíaca se recupera sem sequelas. Entretanto, nos modelos animais e provavelmente nos pacientes, em alguns casos, a autoimunidade persiste, independentemente da presença viral e leva à

fase crônica, caracterizada pelo remodelamento miocárdico e consequente desenvolvimento da miocardiopatia<sup>69,70</sup>.

**Parvovírus B19 (PB19):** nos últimos anos, as miocardites por enterovírus e adenovírus tem sido cada vez menos descritas na Europa e o PB19 vem surgindo como um novo possível importante patógeno. Também conhecido por eritrovírus, os PB19 são formados por pequenos capsídeos de cerca de 25 nm de diâmetro que contém um genoma de DNA de fita única com 5600 nucleotídeos. O genoma viral codifica a proteína não estrutural NS1 e duas proteínas estruturais VP1 e VP2<sup>71</sup>. É um patógeno comum na infância relacionado ao exantema infeccioso. No adulto pode causar artropatia devido à deposição de imunocomplexos (mimetizando artrite reumatóide). Pode estar associado também a crises de anemia aplástica, anemia crônica persistente, hidropsia fetal, púrpura de Henoch-Schönlein, miocardite e IC<sup>71,72</sup>. A soropositividade é elevada na idade adulta<sup>73</sup>. Sua patogenia não é tão bem descrita como dos enterovírus. O PB19 necessita das células do hospedeiro ou de outros vírus para replicação. Modelos animais de doença cardíaca induzida por PB19 não estão disponíveis. Por ser um eritrovírus, tem seu receptor-P na superfície endotelial e não na superfície da célula miocárdica<sup>72</sup>. Após uma infecção primária, o genoma do PB19 pode ser identificado nos tecidos não apenas de indivíduos doentes, mas também de saudáveis<sup>74</sup>. Estudos europeus veem demonstrando o achado frequente de genoma viral de PB19 em pacientes com miocardiopatia dilatada e miocardite<sup>34,75</sup>, entretanto a presença de genoma viral em corações com outras etiologias específicas de miocardiopatia<sup>76</sup> e também em corações sem cardiopatia<sup>77,78,79,80</sup> tem levantado a discussão sobre a real participação deste microorganismo no desenvolvimento da miocardiopatia inflamatória / miocardite.

**Herpesvírus-6 Humano (HHV6):** descrito pela primeira vez em 1986<sup>81</sup>, pertence à família *Herpesviridae*. A infecção pelo HHV6 é geralmente assintomática, sendo muito comum em crianças até os dois ou três anos de idade (cerca de 90%). Em algumas crianças, a infecção primária é caracterizada por um exantema súbito. A infecção pelo HHV6 em adultos é considerada rara, mas, caso se verifique, caracteriza-se por uma infecção hepática do tipo mononucleose. Considera-se ainda que este vírus é um importante co-factor de outros vírus como HIV e citomegalovírus (CMV)



especialmente em adultos imunocomprometidos (receptores de transplantes de órgãos e HIV positivos)<sup>82</sup>. A presença de genoma viral de HHV6 em biopsia endomiocárdica de pacientes com miocardite / miocardiopatia dilatada, tal qual o PB19, tem sido descrita e da mesma forma existe dúvida sobre seu papel no desenvolvimento de miocardiopatia<sup>34,39,83</sup>.

Outras infecções virais como Epstein-Barr (EBV), hepatite C, HIV e citomegalovírus (CMV) tem sido descritas, porém em menor frequência que os referidos anteriormente<sup>64</sup>. Da mesma forma, agentes bacterianos como causa de miocardite / miocardiopatia dilatada também tem sido discutidos. Vale destacar a descrição de *Borrelia burgdorferi*<sup>84</sup>, clamídia<sup>85</sup> e micoplasma<sup>86,87</sup>.

### **1.2.5 Miocardite: técnicas de detecção de agentes infecciosos no tecido cardíaco**

Para a detecção de microorganismos no tecido cardíaco diversas técnicas foram descritas e incluem imunohistoquímica, biologia molecular, hibridização *in situ* e microscopia eletrônica.

Pela imunohistoquímica, anticorpos específicos são utilizados visando a reação contra antígenos de diferentes regiões dos microorganismos. Tem a vantagem de tornar possível visualizar a localização e quantificação dos respectivos antígenos no tecido. Na doença de Chagas, a experiência nacional em detecção de antígenos do *Trypanosoma cruzi* por imunohistoquímica é expressiva<sup>88,89</sup>, no entanto, na literatura, são poucos os estudos visando a detecção de microorganismos em miocardiopatia dilatada utilizando esta técnica<sup>77,90,91,92,93</sup> e isso se deve à introdução da biologia molecular, através da técnica da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) que se apresenta como mais sensível e específica, uma vez que é capaz de determinar a presença do genoma do microorganismo. Além disso, a pesquisa pela biologia molecular é tecnicamente mais rápida sendo possível o diagnóstico em grande número de amostras de diferentes pacientes. Pode ser qualitativa (PCR convencional) em que se define a presença ou ausência do genoma de determinado microorganismo ou quantitativa (PCR *real time*), na qual se quantifica o número de cópias do microorganismo no tecido. Em investigação de miocardiopatia dilatada, a maioria dos estudos até o momento utilizou a técnica convencional. A quantificação de cópias parece um possível

marcador de intensidade de infecção, bem como de resposta ao tratamento, porém estudos em miocardiopatia dilatada são escassos<sup>94</sup> e sua relevância clínica não está estabelecida<sup>95</sup>.

A hibridização *in situ* combina a análise histomorfológica e a detecção de genoma viral podendo ser considerada vantajosa em relação ao PCR, entretanto, da mesma forma que a imunohistoquímica, é um método mais demorado, trabalhoso e de difícil padronização<sup>95</sup>.

Apesar da microscopia eletrônica ser a melhor forma para visualizar a estrutura e morfologia dos vírus, informações na literatura relacionadas à miocardite são limitadas e isso deve a dificuldade para padronização da avaliação frente a grande quantidade de microorganismos e alto custo<sup>96</sup>.

### **1.3 Estudos relevantes em miocardite e miocardiopatia dilatada idiopática**

#### **1.3.1 Informações nacionais**

No Brasil, com exceção à doença de Chagas, os estudos envolvendo pesquisa de inflamação e agentes infecciosos em miocardite e miocardiopatia dilatada são escassos.

Através de imunohistoquímica, na década de 1980, Bellotti demonstrou a presença de antígenos do *Trypanosoma cruzi* no tecido miocárdico de pacientes com miocardiopatia dilatada chagásica<sup>97</sup>. Outros estudos nacionais demonstraram o aspecto inflamatório da doença de Chagas com a demonstração de alterações no tecido miocárdico de celularidade<sup>98</sup>, moléculas de adesão, HLA<sup>99</sup> e expressão de citocinas<sup>100</sup>.

Na década de 1980, Mady descreveu inflamação em pacientes com miocardiopatia dilatada<sup>101</sup> e Arteaga-Fernandez utilizou imunossupressão em pacientes com inflamação documentada por biopsia endomiocárdica, sem pesquisa de agentes infecciosos, não demonstrando diferença de evolução em comparação ao grupo de tratamento convencional, apesar da redução da inflamação no grupo tratado<sup>102</sup>.

Na década de 1990 foi descrito genoma viral de enterovírus em 3 de 6 pacientes com miocardiopatia dilatada no norte do Brasil<sup>103</sup>.

Em pediatria, Camargo estudou inflamação e pesquisou agentes infecciosos em biopsia endomiocárdica de crianças com miocardiopatia dilatada. Houve inflamação em 10 de 30 pacientes pelos critérios de Dallas e

independentemente da presença de agentes infecciosos houve melhora da função ventricular e débito cardíaco com tratamento imunossupressor. Os genomas de CMV, adenovírus, enterovírus e *herpes simplex* foram pesquisados e demonstrados em 40% dos casos, não havendo relação com a presença de inflamação<sup>104</sup>.

Ao estudar 159 pacientes com miocardiopatia dilatada, Montera encontrou inflamação em 111 (68,5%) e genoma viral em 32 (20%). Genoma de PB19 esteve presente em 30%, adenovírus 20%, herpes simplex 25%, Epstein-Barr e vírus da hepatite C 10%, enterovírus 5%<sup>105</sup>.

Dada a escassez de informação nacional sobre o tema, torna-se importante a realização de estudos de agentes infecciosos e inflamação na população brasileira.

### **1.3.2 Ensaios clínicos em miocardite e miocardiopatia dilatada idiopática**

Desde a década de 1980 ensaios clínicos randomizados e não randomizados foram realizados visando o tratamento da miocardite e miocardiopatia dilatada utilizando diversas estratégias, incluindo agentes antiinflamatórios e imunossupressores<sup>57,106,107,108,109</sup>, imunomoduladores<sup>94,110</sup>, agentes específicos contra microorganismos<sup>33,111</sup> e também imunoadsorção<sup>112,113</sup>.

Além da apresentação clínica de IC aguda de causa não definida, os parâmetros de inflamação e da presença de agentes infecciosos tem guiado o racional para tratamento das miocardites e miocardiopatia dilatada idiopática. Apesar da evolução das técnicas de histologia, imunohistologia e biologia molecular, muitas dúvidas ainda existem nesta área do conhecimento, incluindo as definições de inflamação, melhor estratégia para pesquisa de agentes infecciosos e seu real papel na patogênese da miocardite/miocardiopatia dilatada, justificando assim a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o tema.

## ***Objetivo***

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Primário**

Determinar a frequência de agentes infecciosos pré-estabelecidos e de inflamação, em fragmentos de biópsia endomiocárdica de pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e miocardiopatias de outras etiologias específicas, em comparação a grupo controle sem evidência de cardiopatia.

## ***Método***

### 3. MÉTODO

O recrutamento de casos ocorreu no período de julho de 2008 a agosto de 2011 e envolveu pacientes da Unidade de IC e Transplante do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor HCFMUSP) e doadores que foram utilizados para transplante cardíaco no InCor HCFMUSP. Durante este período, os pacientes que estiveram internados com miocardiopatia dilatada idiopática, em avaliação para transplante cardíaco, foram consecutivamente recrutados para participação no estudo, da mesma forma os pacientes que foram submetidos ao transplante cardíaco.

Foram estabelecidos 2 grupos: miocardiopatias e controle sem cardiopatia. O grupo de miocardiopatias envolveu pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática em avaliação para transplante cardíaco e também de etiologias específicas que foram submetidos ao transplante cardíaco. O grupo controle sem cardiopatia foi constituído de doadores de múltiplos órgãos que foram utilizados para o transplante cardíaco.

O estudo recebeu aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP sob o número 0296/06. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

#### 3.1.1 Critérios de Inclusão Miocardiopatia Dilatada Idiopática

- Pacientes com idade superior a 12 anos de ambos os sexos;
- Pacientes com miocardiopatia dilatada segundo critérios da OMS<sup>18</sup> e disfunção sistólica (diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo - DDVE  $\geq$  55 mm e fração de ejeção o ventrículo esquerdo - FEVE  $\leq$  40%).
- Pacientes com sinais e sintomas de IC de acordo com critérios de Framingham<sup>114</sup> - presença simultânea de dois critérios maiores ou um critério maior e dois menores.

Critérios maiores:

- Dispnéia paroxística noturna (DPN)
- Estase jugular
- Estertores pulmonares
- Cardiomegalia (índice cardiotorácico  $>$  0,5)
- Edema agudo de pulmão
- Terceira bulha cardíaca

- Refluxo hepato-jugular (RHJ)
- Perda de peso  $\geq 4,5\text{kg}$  em 5 dias em resposta ao tratamento

Critérios menores:

- Edema bilateral de membros inferiores
- Tosse noturna
- Dispnéia de esforço
- Hepatomegalia
- Derrame pleural
- Redução da capacidade funcional em um terço da máxima
- Taquicardia (frequência cardíaca - FC  $> 100$  bpm)

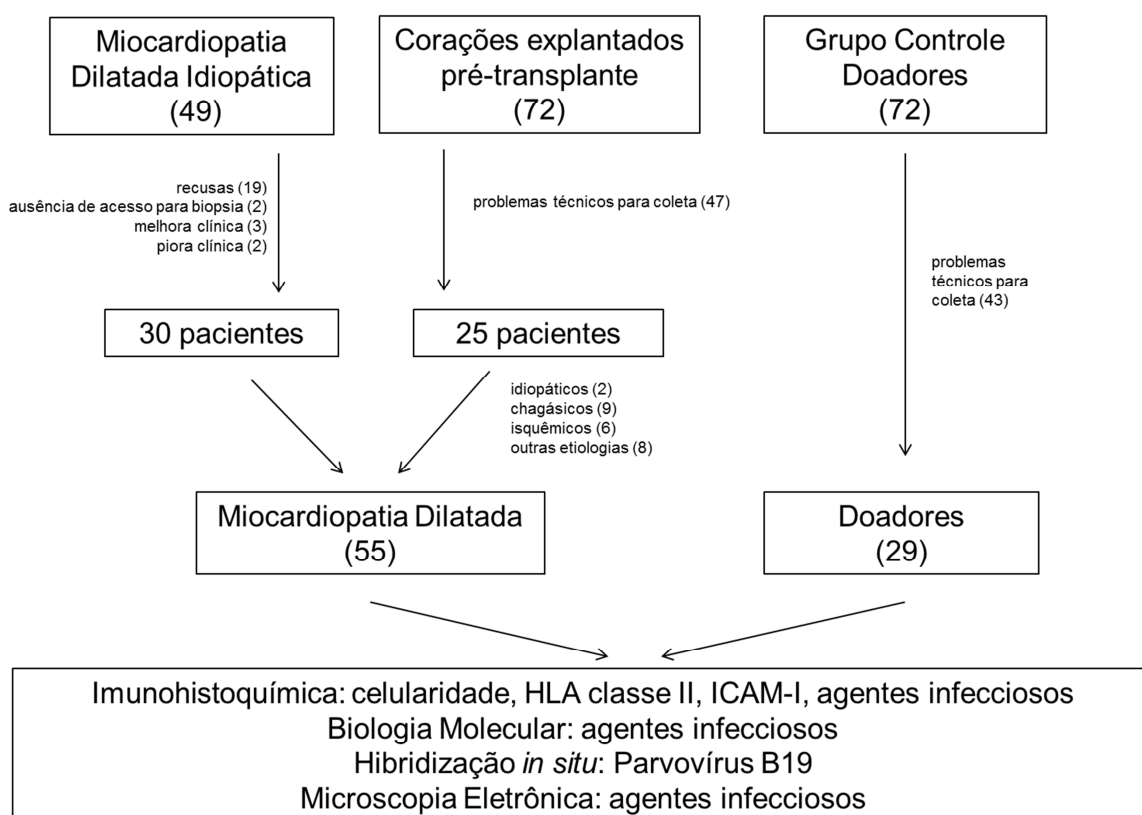
### **3.1.2 Critérios de Exclusão Miocardiopatia Dilatada Idiopática**

- Recusa do paciente
- Contra-indicação à realização da biopsia endomiocárdica
- Presença de miocardiopatia dilatada com etiologia definida, a saber, hipertensiva (antecedente de HAS não controlada associado a padrão ecocardiográfico de hipertrofia excêntrica), chagásica (sorologia positiva), isquêmica (cineangiocoronariografia ou angiotomografia de coronária com lesões compatíveis com a disfunção ventricular), valvar (lesão valvar primária reumática ou degenerativa), infiltrativa (suspeita clínica e por exames complementares), tóxico-metabólica (uso de drogas ilícitas, hiper ou hipotireoidismo não controlados).
- Etilismo
- Doença pulmonar obstrutiva crônica
- Neoplasia maligna
- Embolia pulmonar documentada nos últimos 6 meses
- Cirurgias nos últimos 30 dias
- Doença infecciosa aguda ou crônica em atividade
- Gestantes



### 3.2 Dinâmica do estudo

**Gráfico 1.**  
**Dinâmica do Estudo**



Os pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática incluídos no estudo foram submetidos à avaliação clínica, laboratorial, ecocardiográfica, hemodinâmica e biópsia endomiocárdica.

Na sala de hemodinâmica os pacientes foram submetidos à cateterismo direito com medidas de pressões pulmonares e débito cardíaco e posteriormente à biópsia endomiocárdica do ventrículo direito com retirada de 7 fragmentos: 4 para microscopia óptica e imunohistoquímica (fixação em formalina a 10%), 2 para biologia molecular (fixação em *RNA later* e posteriormente nitrogênio líquido) e 1 para microscopia eletrônica (fixação em glutaraldeído 3%).

Durante o transplante cardíaco foram retirados fragmentos do ventrículo direito dos corações explantados de diferentes etiologias e coletadas informações clínicas, laboratoriais e ecocardiográficas destes pacientes.

O grupo controle foi constituído por doadores de coração, sendo retirados fragmentos do septo do ventrículo direito imediatamente antes da utilização no transplante e coletadas informações clínicas e laboratoriais destes doadores.

Durante a vigência do estudo ocorreu a troca da equipe cirúrgica do transplante do InCor HCFMUSP proporcionando uma dificuldade para inclusão de casos, relacionada à questões técnicas para coleta do material dos corações explantados e dos doadores. Por um período foram realizados transplantes cardíacos, porém as amostras do estudo não foram coletadas de maneira sistemática.

Todas as avaliações histológicas e de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Inflamação e Infecção em Cardiologia do InCor HCFMUSP, sob a coordenação da Prof. Dra. Maria de Lourdes Higuchi.

### **3.3 Avaliação Histológica**

#### **3.3.1 Imunohistoquímica: Técnica de Imunoperoxidase**

Os fragmentos de biopsia endomiocárdica foram processados para emblocamento em parafina. Cortes seriados de 5 µm foram submetidos à imunohistoquímica para detecção de antígenos de microorganismos e de células inflamatórias: linfócitos T (CD3), leucócitos (CD45R0), linfócitos B (CD20) e macrófagos (CD68).

A recuperação antigênica foi realizada com tripsina a 37°C ou tampões (TRIS-EDTA 10mM pH 9.0 ou Citrato 10mM pH6.0) em panela de pressão. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6%, 4 vezes, 5 min em temperatura ambiente (TA). Para eliminar as proteínas inespecíficas foi usada uma solução bloqueadora de proteínas (DakoCytomation- California/ Ref X0909), 10 min, TA.

Os anticorpos primários foram diluídos no diluente de anticorpo (Invitrogen/ N° 3218) e incubados por 40 min, TA. Como controle negativo, foram utilizados os mesmos casos omitindo o anticorpo primário. Para a detecção do complexo antígeno/anticorpo foi utilizado o Kit *Picture Max HRP* (Invitrogen/N° 878983). Na visualização do complexo foi utilizado o cromógeno DAB (DakoCytomation- California/ N° K3468) e a contra-coloração com Hematoxilina de Harris.

Para análise das células inflamatórias foi quantificado no microscópio óptico o número de células positivas/ 400x (em média 20 campos) obtendo-se o número médio de células imunomarcadas. Os resultados foram expressos em número de células/mm<sup>2</sup> e para isso foi dividido o número médio de células pelo valor de 0,159mm<sup>2</sup> que representa o diâmetro do campo do microscópio no aumento de 400x. Para estudo de antígenos virais, bacterianos, ICAM-I e HLA de classe II foi quantificada a área positiva (%) através do analisador de imagem usando o software *Quantimet 500 (Leica)* acoplado ao microscópio óptico e que detecta o produto marrom das reações de imunohistoquímica; foi realizada análise semiquantitativa para localização da positividade desses antígenos. Na tabela 4 estão descritos os anticorpos, clones, diluições, fabricantes e protocolos utilizados.

**Tabela 4.**  
**Protocolo das Reações de Imunohistoquímica**

NOME AC	CLONE	DILUIÇÃO	FABRICANTE	PROTOCOLO
<b>HLA classe II</b>	CR3/43	1/ 625	Dako Denmark A/S	Citrato pH6,0 + Tween 0,05%
<b>ICAM-I</b>	EP1442Y	1/40	Abcam Inc	TRIS/EDTA pH 9,0 + Tween0,05%
<b>CD68</b>	KP1	1/3200	Dako Denmark A/S	TRIS/EDTA pH 9,0 + Tween0,05%
<b>CD45R0</b>	UCHL	1/250	Dako Denmark A/S	TRIS/EDTA pH 9,0 + Tween0,05%
<b>CD3</b>	7.2.38	1/200	Dako Denmark A/S	TRIS/EDTA pH 9,0 + Tween0,05%
<b>CD20</b>	L26	1/1000	Dako Denmark A/S	TRIS/EDTA pH 9,0 + Tween0,05%
<b>Epstein Barr Virus</b>	CS.1-4	1/10	Dako Denmark A/S	Citrato pH6,0 + Tween 0,05%
<b>Parvovirus B 19</b>	R92F6	1/5	Novocastra Laboratories Ltd	TRIS/EDTA pH 9,0 + Tween0,05%
<b>Enterovírus</b>	5-D8/1	1/600	Dako Denmark A/S	Citrato pH6,0 + Tween 0,05%
<b>Hepatite B Surface</b>	Policlonal de coelho	1/500	Doação do Instituto Adolfo Lutz- SP	Sem recuperação de antígenos
<b>Hepatite B core</b>	Policlonal de coelho	1/1500	Dako Denmark A/S	Sem recuperação de antígenos

<b>Adenovirus</b>	(blend) dos clones 20/11 e 2/6	1/8000	Chemicon International	Tripsina 0,15% 5 minutos 38,6°C
<b>Hepatite C*</b>	TORDJI-22	1/25	Zymed	TRIS/EDTA pH 9,0 + Tween0,05%
<b>Hepatite C</b>	MMM33	1/25	Monosan	Tripsina 0,15% 5 minutos 38,6°C
<b>HHV6</b>	HJG-20	1/8000	Bioworld Consulting Laboratories	TRIS/EDTA pH 9,0 + Tween0,05%
<b>Herpes simplex I</b>	Policlonal de coelho	1/6000	Dako Denmark A/S	Sem recuperação de antígenos
<b>Herpes simplex II</b>	Policlonal de coelho	1/8000	Dako Denmark A/S	Sem recuperação de antígenos
<b>Borrelia burgdorferi</b>	Policlonal de coelho	1/1000	Abcam Inc	TRIS/EDTA pH 9,0 + Tween0,05%
<b>Chlamydia pneumoniae</b>	M73066	1/200	Abcam Inc	TRIS/EDTA pH 9,0 + Tween0,05%
<b>Mycoplasma pneumoniae</b>	M9010923	1/100	Abcam Inc	Citrato pH6,0 + Tween 0,05%

\* nos primeiros 50 casos utilizado TORDJI-22, no restante MMM33

### 3.4 Biologia Molecular

#### 3.4.1 - Extração de DNA e padronização da PCR convencional.

Fragmentos de biopsias endomiocárdicas foram coletadas em frascos criogênicos contendo RNA<sub>later</sub> e armazenados em nitrogênio líquido até o momento do uso.

As amostras estocadas em nitrogênio líquido foram maceradas e para a extração de DNA foi utilizado o *Puregene Core Kit A* seguindo especificações do fabricante. As amostras foram incubadas com tampão de lise + proteinase K 20mg/ml a 55°C por 24 horas. Após a incubação, foi feita a precipitação das proteínas adicionando-se *Protein Precipitation Solution*, sendo material incubado em gelo e centrifugado. O sobrenadante foi recolhido em outro tubo e iniciou-se a precipitação do DNA adicionando Isopropanol + solução de glicogênio 20mg/ml. O tubo foi invertido 50 vezes e centrifugado, o sobrenadante descartado, o *pellet* foi lavado com etanol 70%, re-suspenso em *DNA Hydration Solution* e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro.

O DNA purificado da amostra foi eluído com 50µl de água estéril, livre de RNase e submetidas à análise de sua concentração e pureza determinadas através da leitura de absorbância em 260nm (UV - Concentração do DNA em mg/ml=Absx100x50µg/ml) e em 280nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro (*NanoDrop Thermo Scientific 2000*). Os valores foram expressos em µg/µl.

Os *primers* foram otimizados antes de serem testados na plataforma de PCR com a realização de gradiente de temperatura entre 45° e 68°C. Como controle positivo foram utilizadas amostras de tecidos sabidamente positivos para o agente estudado obtidas no Laboratório de Anatomia Patológica do InCor e como controle negativo foi utilizado água no lugar das amostras.

Para a confirmação da amplificação do DNA por PCR, realizamos o re-PCR para aumentar a quantidade de produto final amplificado, facilitando a visualização na corrida eletroforética.

Após as amplificações, os produtos foram aplicados em gel de agarose 2%, corado por brometo de etidium e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

#### **3.4.2 Adenovírus (ADV):**

Realizada conforme descrito em McDonough<sup>115</sup>, com volume final de 25µl contendo: 100ng/µl de DNA e 50 pmol de cada primer ADV F: (ATG ACT TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA) e ADV R: GCC GAG AAG GGC GTG CGC AGG TA). Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 10 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos, cada um consistindo em uma desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 52°C por 20 segundos, extensão a 74°C por 45 segundos e extensão final a 70°C por 5 minutos. (amplificação 134pb).

#### **3.4.3 Citomegalovirus (CMV):**

Realizada conforme descrito em Espy<sup>116</sup>, com volume final de 25µl contendo: 100ng/µl de DNA e 50pmol de cada primer CMV F: (CCT AGT GTG GAT GAC CTA CGG GCC A) e CMV R: (CAG ACA CAG TGT CCT CCC GCT CCT C). Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 96°C, seguida de 30 ciclos, cada um consistindo em uma

desnaturação a 94°C por 1,5 minutos, anelamento a 56°C por 1,5 minutos, extensão a 72°C por 1,5 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos. (amplificação 250pb).

#### **3.4.4 Epstein-Barr Vírus (EBV):**

Realizada conforme descrito em Telenti<sup>117</sup>, com volume final de 25µl contendo: 100ng/µl de DNA e 50pmol de cada primer EBV F(AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA) e EBV R(TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA T). Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguida de 45 ciclos, cada um consistindo em uma desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. (amplificação 597pb).

#### **3.4.5 Herpes vírus humano 6 (HHV-6):**

Realizada conforme descrito em Canto<sup>118</sup> com volume final de 25µl contendo: 100ng/µl de DNA e 50pmol de cada primer HHV-6 F(CAA TGC TTT TCT AGC CGC CTC TTC) e HHV-6 R(ACA TCT ATA ATT TTA GAC GAT CCC) (amplificação 480pb). O controle positivo foi gentilmente cedido pelo Prof. Uwe Kühl (Charité - Berlim).

#### **3.4.6 Parvovírus B19 (PB19):**

Realizada conforme descrito em Kühl<sup>34</sup> com volume final de 25µl contendo: 100ng/µl de DNA e 50pmol de cada primer PB19 F(TTT CAA AGT CAT GGA TTA TCT GA) e PB19 R(TTG TGT AAG TCT TCA CTA GAT AAT ACT GCA TT) (amplificação 110 pb). Foi utilizado controle positivo gentilmente cedido pelo Prof. Uwe Kühl (Charité – Berlim).

#### **3.4.7 *Chlamydia pneumoniae* (CP):**

Realizada conforme descrito em Campbell<sup>119</sup> com volume final de 25µl contendo: 100ng/µl de DNA e 50pmol de cada primer CP F(TGC ATA ACC TAC GGT GTG TT) e CP R(GTT GTT CAT GAA GGC CTA CT). Como controle positivo foi utilizado uma cultura de *Chlamydia pneumoniae* (amplificação 435

pb) cepa padrão AR-39 cultivada em células Hep2 gentilmente cedida pelo Setor de Riquétsias do Instituto Adolfo Lutz.

#### **3.4.8 *Mycoplasma pneumoniae* (MP):**

Realizada com volume final de 25µl contendo: 100ng/µl de DNA e 50pmol de cada primer MP F(GAA GCT TAT GGT ACA GGT TGG) e MP R(ATT ACC ATC CTT GTT GTA AG). Como controle positivo foi utilizada cultura de *Mycoplasma pneumoniae* (amplificação 110pb), gentilmente cedida pelo Prof. Jorge Timenetsky, do Laboratório de Bactérias Oportunistas, Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo, SP.

#### **3.4.9 *Borrelia Burgdorferi***

A PCR de *Borrelia* genoespécie foi realizada conforme descrito em Richter<sup>120</sup> com volume final de 25µl contendo: 100ng/µl de DNA e 50pmol de cada primer *Borrelia* F(CTA ACG CTG GCA GTG CGT CTT AAG C) e *Borrelia* R(AGC GTC AGT CTT GAC CCA GAA GTT C) (amplificação 724 pb). Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos, cada um consistindo em uma desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 63°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 2 minutos. Como controle positivo foi utilizada cultura de *Borrelia burgdorferi* gentilmente cedida pelo Prof. Natalino Hajime Yoshinari, laboratório de Reumatologia (LIM 17), HCFMUSP.

### **3.5 Hibridização *in situ* e microscopia eletrônica**

De maneira preliminar, foram pesquisados microorganismos por microscopia eletrônica e PB19 por hibridização *in situ*, em alguns casos com elevada expressão de antígenos por imunohistoquímica.

#### **3.5.1 Hibridização *in situ***

A hibridização *in situ* foi realizada para detecção do DNA de PB19 com a utilização da sonda ACCCATCCTCTCTGTTTGACTTAGTTGCTCG.

Para a permeabilização celular dos cortes histológicos utilizou-se tampão Tris/EDTA 10mM pH 9.0, bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

6% e redução de proteínas não específicas com bloqueador de proteínas (CAS Block –Invitrogen, Estados Unidos). A dupla fita de DNA foi desnaturada na estufa a  $95 \pm 5^{\circ}\text{C}$  e a hibridização *in situ* foi realizada a  $60^{\circ}\text{C}$ , por 18 horas em estufa (concentração de sonda-  $30\text{ng}/\mu\text{l}$ ). O sinal foi amplificado utilizando-se o kit *Genpoint* (Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos) e a reação foi visualizada com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos). Controles: para controle negativo foi omitida a sonda. Cortes histológicos com tecidos previamente diagnosticados como positivos para PB19 foram utilizados como controles positivos para as reações.

### **3.5.2 Microscopia Eletrônica**

Os fragmentos foram fixados em glutaraldeído a 3% e pós-fixados na solução tetróxido de ósmio 1%. A seguir, foram lavados em solução salina e mantidos até o dia seguinte em acetato de uranila 0,5% a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de etanol e óxido de propileno, seguido de infiltração feita com uma mistura contendo óxido de propileno e araldite adicionados à resina pura.

A seguir, os fragmentos foram emblocados em moldes flexíveis de silicone contendo resina e polimerizados por 48 horas a  $60^{\circ}\text{C}$ . Foram realizados cortes semi-finos de  $0,5\ \mu\text{m}$ , corados com azul de metileno a 1% contendo bórax a 1% e azur II a 1%. Após seleção dos melhores blocos, cortes de 60-70 nm de espessura foram realizados com o auxílio do ultramicrótomo e colocados em telas de cobre de 200 mesh.

As telas foram contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo para análise em microscópio eletrônico de transmissão.



***Método de Análise  
Estatística***

#### **4. MÉTODO de ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O software GraphPad Prism 5 foi utilizado para os cálculos estatísticos.

Os dados categóricos foram representados através de frequência absoluta (n) e frequência relativa (%) e os grupos foram comparados através do teste de Qui-quadrado de Pearson ou exato de Fischer.

Os dados contínuos de cada variável foram inicialmente comparados com a curva normal através do teste de distância Kolmogorov-Smirnov e classificados em paramétricos e não paramétricos.

Os dados paramétricos foram representados através de média e desvio padrão da amostra e os grupos independentes comparados entre si através do teste t de Student e análise de variância.

Os dados não paramétricos foram representados através de mediana, quartil inferior (percentil 25) e quartil superior (percentil 75); os grupos independentes foram comparados entre si através dos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

Foi utilizado o método de Spearman para avaliação de correlação entre dados não paramétricos.

# ***Resultados***

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Características das Populações Estudadas**

#### **5.1.1 Grupo Controle: Doadores de Transplante Cardíaco**

No grupo controle (tabela 5), constituído de 29 doadores de transplante cardíaco, houve um predomínio de jovens do sexo masculino, com poucas comorbidades e que sofreram morte encefálica por traumatismo crânioencefálico (TCE). O uso de noradrenalina foi muito frequente e nos exames laboratoriais, destacou-se a anemia, leucocitose e plaquetopenia, além disso, hipernatremia e elevação de enzimas musculares (CPK).

**Tabela 5.**  
**Grupo Controle: Doadores de Transplante Cardíaco**

<b>Grupo controle</b>	<b>n = 29</b>
Idade (anos)	28 (22,5 – 37)
Sexo Masculino (n)(%)	26 (89,6)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	25 (24 – 28)
Morte encefálica TCE (n)(%)	22 (74,9)
Morte encefálica AVC (n)(%)	7 (24,1)
Tempo isquemia (min)	165 (136,5 – 203)
Noradrenalina (n)(%)	24 (82,7)
Hipertensão arterial (n)(%)	2 (6,9)
Diabetes melitus (n)(%)	0
Tabagismo (n)(%)	3 (10,3)
Etilismo (n)(%)	2 (6,9)
Drogadição (n)(%)	2 (6,9)
Hemoglobina (g/dl)	10,7 (9,6 – 12,9)
Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	13700 (10825 – 17815)
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	133000 (88000 – 169500)
Uréia (mg/dL)	38 (25 – 47)
Creatinina (mg/dL)	1,1 (0,79 – 1,68)
Sódio (mEq/L)	153 (147 – 168)
Potássio (mEq/L)	3,9 (3,35 – 4,5)
Glicemia (mg/dL)	141 (109 – 166)
CPK (U/L)	2458 (660 – 4613)
CKMB (U/L)	40 (15 – 93)
TGO (U/L)	87 (38,5 – 180,5)
TGP (U/L)	52 (28,5 – 94,5)
Fosfatase alcalina (U/L)	75,5 (55,5 – 176,3)
Gama GT (U/L)	29 (16,5 – 62)
Bilirrubinas (mg/dL)	0,5 (0,29 – 0,88)
pH	7,37 (7,27 – 7,44)

Dados apresentados como mediana (p25, p75) ou n (%) de casos

IMC: índice de massa corpórea, TCE: trauma crânio-encefálico, AVC: acidente vascular cerebral

### 5.1.2 Grupo Miocardiopatia Dilatada

O grupo miocardiopatia dilatada (tabela 6) foi constituído de 55 pacientes com predomínio do sexo masculino e raça branca, incluindo 32 pacientes de etiologia idiopática, 9 chagásicos, 6 isquêmicos e 8 pacientes de outras etiologias (2 casos de miocárdio não compactado e um caso de cada etiologia: mucopolissacaridose, hipertensiva, pós-quimioterapia, valvar, taquicardiomiopatia, alcoólica).

A IC foi considerada aguda quando o início dos sintomas ocorreu com menos de 6 meses (31% dos pacientes). A mediana de tempo de início dos sintomas de IC foi de 24 meses.

A maioria dos pacientes (60%) estava em classe funcional IV, estágio D (63,3%). A mediana da fração de ejeção foi de 20% e do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo de 70,5 mm.

Do ponto de vista de tratamento, a maioria dos pacientes estava em uso de drogas vasoativas (58,2% dobutamina, 38,2% nitroprussiato) e uma parcela expressiva em uso de balão intra-aórtico (21,8%) (tabela 7).

Na comparação entre as diferentes etiologias de miocardiopatia dilatada (tabela 8), os pacientes idiopáticos e de outras etiologias eram mais jovens e com menos tempo de história de sintomas de IC que os chagásicos e isquêmicos. Houve uma tendência à predominância de classe funcional IV nos chagásicos, isquêmicos e de outras etiologias em comparação aos idiopáticos. Não houve diferença em relação à fração de ejeção e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Foram submetidos à biópsia endomiocárdica do ventrículo direito 30 pacientes e retirados fragmentos de tecido miocárdico de 25 pacientes durante o explante do coração no transplante cardíaco. Foram comuns episódios de arritmia ventricular auto-limitados durante a realização da biópsia endomiocárdica, todos eles sem necessidade de terapêutica específica. Durante a biópsia endomiocárdica de uma paciente do sexo feminino com IC de início recente (2 semanas), com choque cardiogênico, em uso de drogas vasoativas e balão intra-aórtico, houve perfuração cardíaca com necessidade de cirurgia de urgência; a paciente faleceu posteriormente por complicações neurológicas e infecciosas.

**Tabela 6.****Grupo Miocardiopatia Dilatada**

<b>Grupo Miocardiopatia Dilatada</b>	<b>N=55</b>
Sexo masculino (n)(%)	34 (61,8)
Idade	35 (28 - 53)
Raça (n)(%)	
Branca	47 (85,5)
Negra	8 (14,5)
Tempo de início dos sintomas (meses)	24 (4 – 48)
Tempo início dos sintomas < 6 meses (n)(%)	17 (31)
Classe Funcional (NYHA) (n)(%)	
II	13 (23,6)
III	9 (16,4)
IV	33 (60)
Estádio C (n)(%)	20 (36,4)
Estádio D (n)(%)	35 (63,6)
História familiar miocardiopatia (n)(%)	11 (20)
História familiar morte súbita (n)(%)	4 (7,27)
História familiar doença coronariana (n)(%)	8 (14,5)
Tabagismo (n)(%)	15 (27,3)
Etilismo (n)(%)	4 (7,3)
Drogadição (n)(%)	1 (1,8)
Hipertensão arterial (n)(%)	10 (18,2)
Diabetes melitus (n)(%)	8 (14,5)
Dislipidemia (n)(%)	11 (20)
Hipotireoidismo (n)(%)	30 (54,5)
Marcapasso (n)(%)	11 (20)
Fibrilação atrial (n)(%)	15 (27,3)
Bloqueio ramo esquerdo (n)(%)	12 (21,8)
Índice cardio-torácico (relação)	0,6 (0,56 - 0,64)
FEVE (%)	20 (17 – 25)
DDVE (mm)	70,5 (64 – 78,25)
DSVE (mm)	62 (56 – 73)
AE (mm)	47 (45 – 52)
Pressão sistólica ventrículo direito (mmHg)	47 (38,5 – 53)

Dados apresentados como mediana (p25, p75) ou n (%) de casos

NYHA: New York Heart Association, FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo, DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, DSVE diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, AE: átrio esquerdo

**Tabela 7.**  
**Tratamento: Miocardiopatia Dilatada**

Medicação	N(%)
Dobutamina (n)(%)	32 (58,2)
Nitroprussiato (n)(%)	21 (38,2)
Balão intra-aórtico (n)(%)	12 (21,8)
Betabloqueador (n)(%)	29 (52,7)
iECA (n)(%)	36 (64,5)
BRA (n)(%)	5 (9,1)
Antagonista Aldosterona (n)(%)	37 (67,3)
Digoxina (n)(%)	22 (40)
Hidralazina (n)(%) / Nitrato (n)(%)	11 (20) / 7 (12,7)
Diurético (n)(%)	45 (81,8)
Amiodarona (n)(%)	11 (20)
Estatina (n)(%)	22 (40)

Dados apresentados como n (%) de casos

IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina, BRA: bloqueadores do receptor de angiotensina.

**Tabela 8.**  
**Diferentes Etiologias de Miocardiopatia Dilatada**

	ID (32)	CH (9)	IS (6)	OU (8)	p
Idade (anos)	32 (27 – 45,5)	53 (34,5 – 59,5)	57,5 (52,2 – 64,5)	26 (19,7 – 40,5)	0,0003
Masc n(%)	20 (62,5)	6 (66,7)	5 (83,3)	3 (37,5)	0,35
Raça					0,88
Branca n(%)	25 (78,1)	8 (88,9)	5 (83,3)	6 (75)	
Negra n(%)	7 (21,9)	1 (11,1)	1 (16,7)	2 (25)	
CF					0,051
II n(%)	9 (28,2)	0	1 (16,7)	0	
III n(%)	9 (28,2)	1 (11,1)	1 (16,7)	0	
IV n(%)	14 (43,6)	8 (88,9)	4 (66,6)	8 (100)	
Tempo meses	8 (3,25 – 33)	88 (42 – 94)	42 (27,5 – 70)	30 (4,2 – 45)	0,0005*
<6meses n(%)	13 (40,6)	0	1 (16,7)	3 (37,5)	0,1
Dobu n(%)	13 (40,6)	9 (100)	4 (66,7)	6 (75)	0,012
Nitro n(%)	8 (25)	6 (66,7)	3 (50)	4 (50)	0,1
BIA n(%)	5 (15,6)	4 (44,4)	2 (33,3)	1 (12,5)	0,23
FEVE (%)	21 (17,2 – 26)	19 (15 – 21,5)	22,5 (19,5 – 45)	20 (17,7 – 24)	0,32
DDVE (mm)	70,5 (64,2 – 78,2)	72 (67,5 – 77)	66,5 (49,7 – 79,2)	64 (59 – 95)	0,81

Dados apresentados como mediana (p25, p75) ou n (%) de casos

ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras; Masc: sexo masculino; CF: Classe funcional (NYHA); Tempo: tempo de sintomas de IC; < 6 meses: início dos sintomas a menos de 6 meses; Dobu: dobutamina; Nitro: nitroprussiato; BIA: balão intra-aórtico; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo



### **5.1.3 Doadores x Miocardiopatia Dilatada: idade, sexo e laboratório**

Na comparação entre os doadores e as diferentes etiologias de miocardiopatias, houve um predomínio do sexo masculino nos doadores, chagásicos e isquêmicos em relação aos de outras etiologias. Os doadores, idiopáticos e de outras etiologias eram mais jovens que os isquêmicos e chagásicos (tabela 8).

Em relação aos exames laboratoriais, os doadores apresentaram maior número de leucócitos, plaquetopenia, hipernatremia e menor valor de potássio em relação aos miocardiopatas (tabela 9).

**Tabela 9.**  
**Idade, Sexo e Exames Laboratoriais de Doadores e Miocardiopatia Dilatada**

	DO (29)	ID (32)	CH (9)	IS (6)	OU (8)	p
Idade (anos)	28 (22,5 – 37)	32 (27 – 45,5)	53 (34,5 – 59,5)	57,5 (52,2 – 64,5)	26 (19,7 – 40,5)	<0,0001
Masc (n)(%)	26 (89,6)	20 (62,5)	6 (66,7)	5 (83,3)	3 (37,5)	0,004
Hemoglobina (g/dl)	10,7 (9,6 – 12,9)	12,9 (10,3 – 13,9)	11,4 (8,6 – 13,1)	10,5 (8,9 – 12,6)	10,9 (8,1 – 12,3)	0,11
Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	13700 (10825 – 17815)	7200 (6200 – 8100)	5400 (4600 – 6450)	6745 (4500 – 11500)	5910 (5650 – 8990)	<0,0001
Plaq x 1000 (mm <sup>3</sup> )	133 (88 – 169,5)	229 (193 – 257)	169 (148 – 254)	242 (178 – 259)	226 (178 – 265)	0,0002
Uréia (mg/dl)	38 (25 – 47)	34 (31 – 54)	52 (28 – 73)	65 (48 – 153)	43 (27 – 51)	0,06
Creatinina (mg/dl)	1,1 (0,79 – 1,68)	1,03 (0,9 – 1,16)	1,17 (0,9 – 1,8)	1,4 (0,96 – 3,3)	0,94 (0,66 – 1,3)	0,37
Sódio (mEq/l)	153 (147 – 168)	137 (135 – 139)	136 (133 – 136)	133 (131 – 136)	133 (130 – 138)	<0,0001
Potássio (mEq/l)	3,9 (3,35 – 4,5)	4,2 (4 – 4,5)	4,3 (3,6 – 4,9)	5,2 (4,2 – 5,6)	4,2 (3,8 – 4,4)	0,013

Dados apresentados como mediana (p25, p75) ou n (%) de casos

DO: doador; ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras; Masc: sexo masculino; IMC: índice de massa corpórea; Plaq: plaquetas

### 5.2.1 Critérios de Inflamação: CD3 e CD68

Para definição de presença de inflamação no tecido miocárdico foram considerados os valores acima de 7 linfócitos T (CD3) / mm<sup>2</sup> e/ou 7 macrófagos (CD68) / mm<sup>2</sup>. Entre 7 e 14 céls / mm<sup>2</sup> nós definimos e denominamos inflamação discreta e acima de 14 céls / mm<sup>2</sup> inflamação moderada.

### 5.2.2 Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Linfócitos T (CD3)

Em relação aos linfócitos T (CD3) (foto1), houve diferença no diagnóstico de inflamação na comparação entre doadores e miocardiopatas (tabela 10 e gráfico 2).

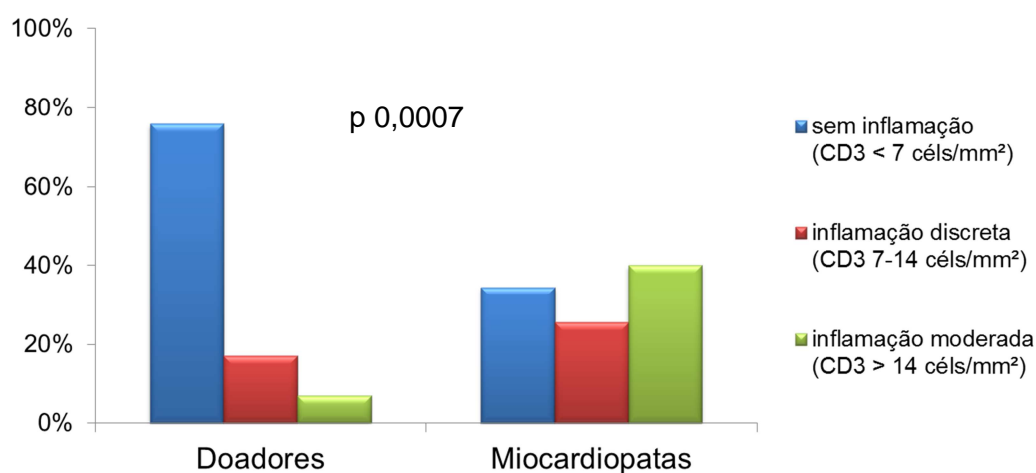
**Tabela 10.**

**Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Inflamação por Linfócitos T (CD3)**

	Doadores (29)	Miocardiopatia (55)	P
Sem inflamação n(%)	22 (75,9)	19 (34,5)	
Inflamação discreta n (%)	5 (17,2)	14 (25,5)	0,0007
Inflamação moderada n (%)	2 (6,9)	22 (40)	

**Gráfico 2.**

**Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Inflamação por Linfócitos T (CD3)**



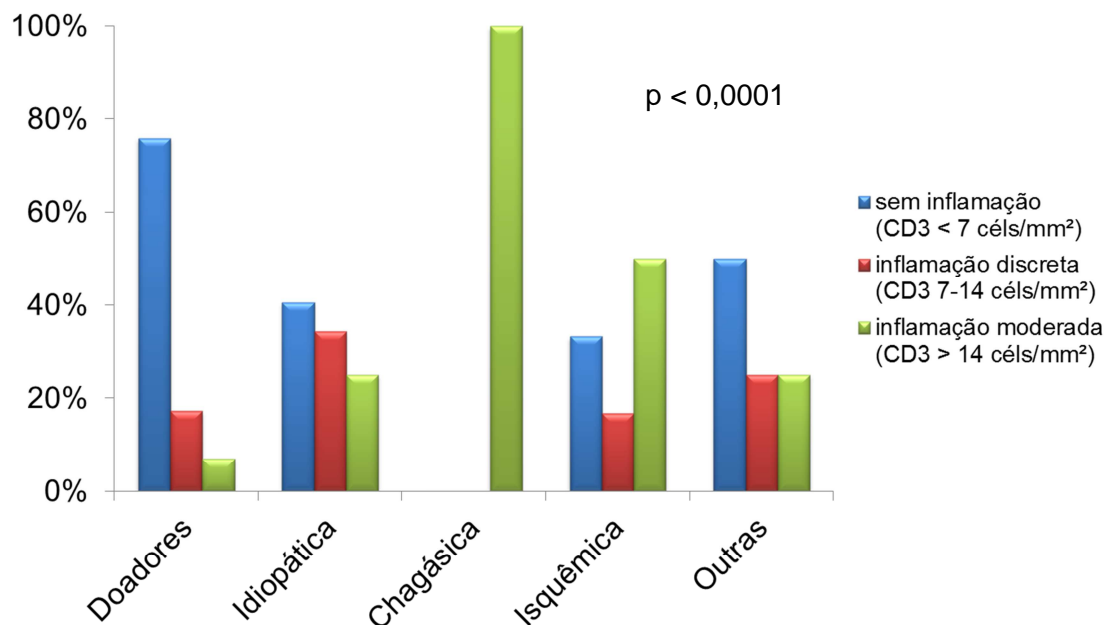
A comparação entre doadores e as diferentes etiologias de miocardiopatia revelou diferença de inflamação por linfócitos T (CD3) (tabela 11 e gráfico 3).

**Tabela 11.**  
**Inflamação: Linfócitos T (CD3) por Etiologias**

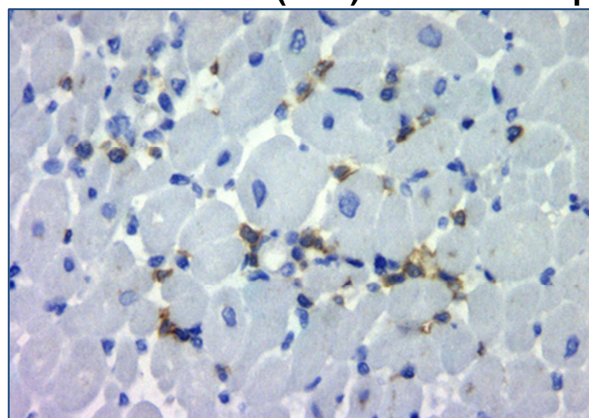
	DO (29)	ID (32)	CH (9)	IS (6)	OU (8)	p
Sem inflamação n(%)	22 (75,9)	13 (40,6)	0	2 (33,3)	4 (50)	<0,0001
Inflamação disc n(%)	5 (17,2)	11 (34,4)	0	1 (16,7)	2 (25)	
Inflamação mod n(%)	2 (6,9)	8 (25)	9 (100)	3 (50)	2 (25)	

DO: doador; ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras; disc: discreta; mod: moderada

**Gráfico 3.**  
**Inflamação: Linfócitos T (CD3) por Etiologias**



**Foto 1. Infiltrado de Linfócitos T (CD3) em Mioc. Idiopática**



Fotomicrografia de imunohistoquímica de linfócitos T (CD3) em fragmento de biópsia endomiocárdica de miocardiopatia idiopática (40x). Presença de infiltrado intersticial.

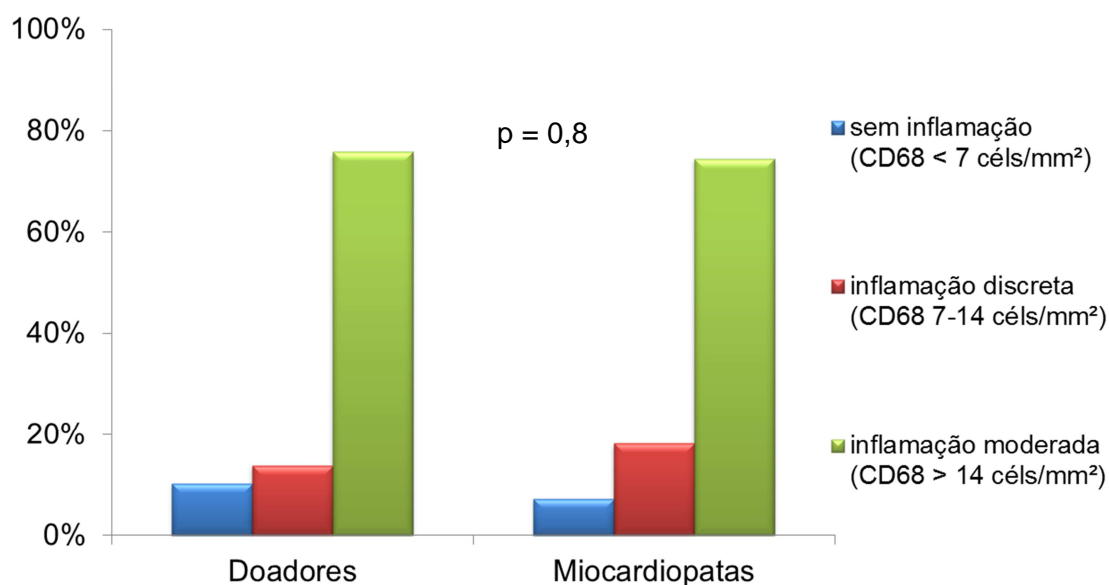
### 5.2.3 Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Macrófagos (CD68)

Pela contagem de macrófagos (CD68) (foto 2), não houve diferença entre doadores e miocardiopatas em relação a presença ou ausência de inflamação (tabela 12 e gráfico 4). Na comparação entre doadores e diferentes etiologias houve diferença com significância estatística (tabela 13 e gráfico 5).

**Tabela 12.**  
**Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Inflamação por Macrófagos (CD68)**

	Doadores (29)	Miocardiopatas (55)	p
Sem inflamação n(%)	3 (10,3)	4 (7,3)	
Inflamação discreta n(%)	4 (13,8)	10 (18,2)	0,8
Inflamação moderada n(%)	22 (75,9)	41 (74,5)	

**Gráfico 4.**  
**Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Inflamação por Macrófagos (CD68)**

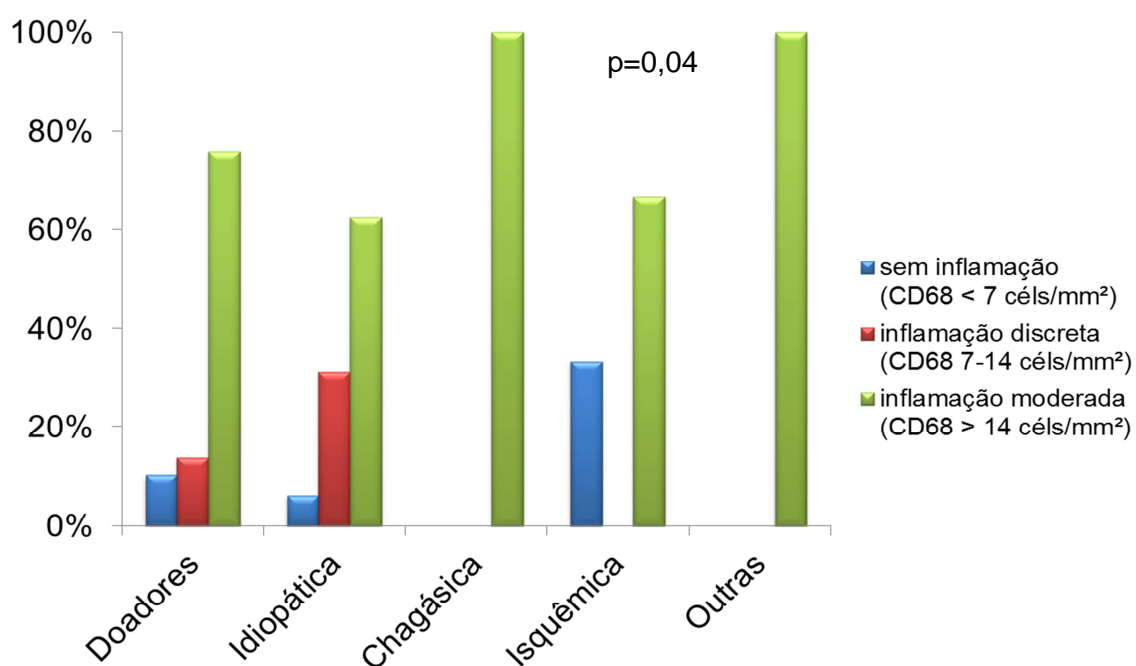


**Tabela 13.**  
**Inflamação: Macrófagos (CD68) por Etiologias**

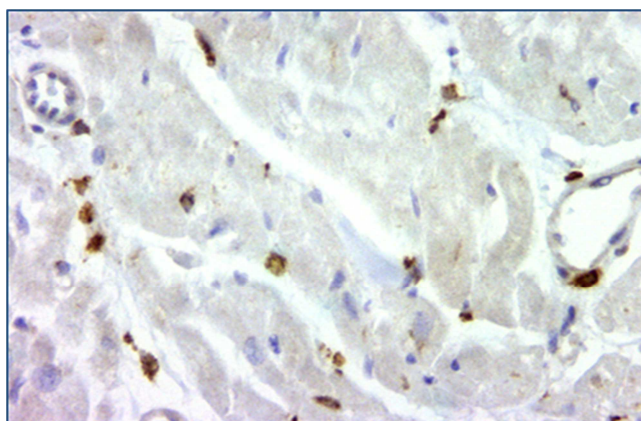
	DO (29)	ID (32)	CH (9)	IS (6)	OU (8)	p
Sem inflamação n(%)	3 (10,3)	2 (6,25)	0	2 (33,3)	0	
Inflamação disc n(%)	4 (13,8)	10 (31,25)	0	0	0	0,04
Inflamação mod n(%)	22 (75,9)	20 (62,5)	9 (100)	4 (66,7)	8 (100)	

DO: doador; ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras; disc: discreta; mod: moderada

**Gráfico 5.**  
**Inflamação: Macrófagos (CD68) por Etiologias**



**Foto 2. Infiltrado de Macrófagos (CD68) em Doador**



Fotomicrografia de imunohistoquímica de macrófagos (CD68) em fragmento de biópsia endomiocárdica de doador (40x). Presença de infiltrado intersticial e vascular.

## 5.2.4 Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Celularidade, HLA e ICAM

Houve predomínio de linfócitos T (CD3) e B (CD20) nos miocardiopatas em relação aos doadores. Não houve diferença no número de macrófagos (CD68), leucócitos (CD45R0), expressão de HLA e ICAM (tabela 14) (fotos 3, 4 e 5).

**Tabela 14.**  
**Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Celularidade, HLA e ICAM**

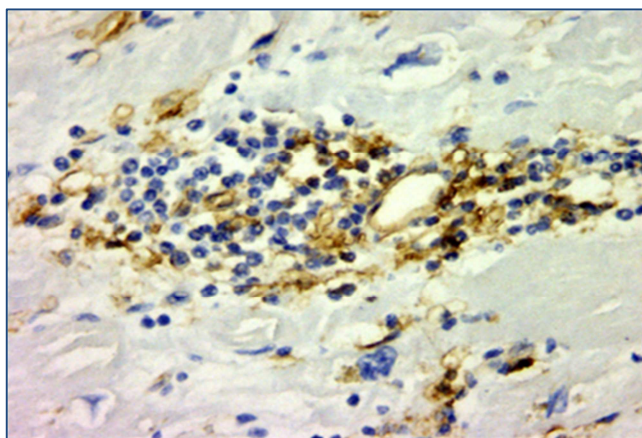
	Doadores	Miocardiopatia	p
CD3 (célis/mm <sup>2</sup> )	4,42 (1,25 – 7,9)	9,99 (5,84 – 24,38)	<0,0001
CD68 (célis/mm <sup>2</sup> )	27,8 (14,5 – 34,6)	21,31 (13,95 – 33,75)	0,51
CD20 (célis/mm <sup>2</sup> )	0 (0 – 0,4)	0,5 (0 – 1,62)	0,013
CD45R0 (célis/mm <sup>2</sup> )	8,22 (3,69 – 14,85)	11,17 (4,83 – 28,6)	0,19
HLA (% de área)	1,33 (0,68 – 2,4)	1,047 (0,34 – 2,01)	0,13
ICAM (% de área)	1,4 (0,7 – 4,86)	1,46 (0,64 – 3,1)	0,58

Dados apresentados como mediana (p25, p75)

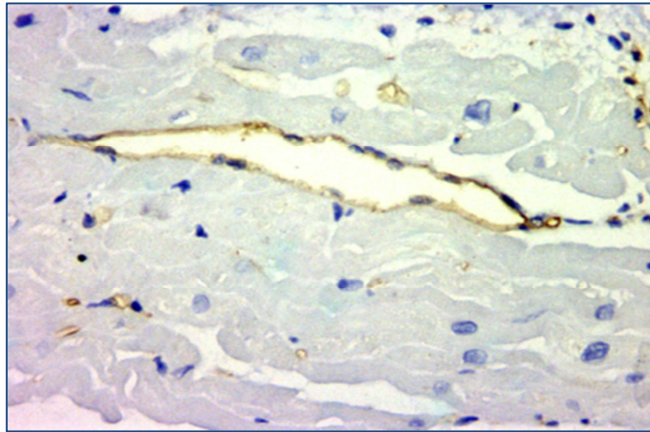
Na comparação entre doadores e as etiologias de miocardiopatia dilatada, destaca-se a intensidade do infiltrado inflamatório da etiologia chagásica em todos os tipos celulares. Na expressão de HLA houve maior intensidade nos chagásicos em comparação aos idiopáticos. Não houve diferença na expressão de ICAM (tabela 15, gráficos 6 e7).

### Fotos 3 e 4. Expressão de HLA classe II

#### Foto 3. Mioc. Chagásica

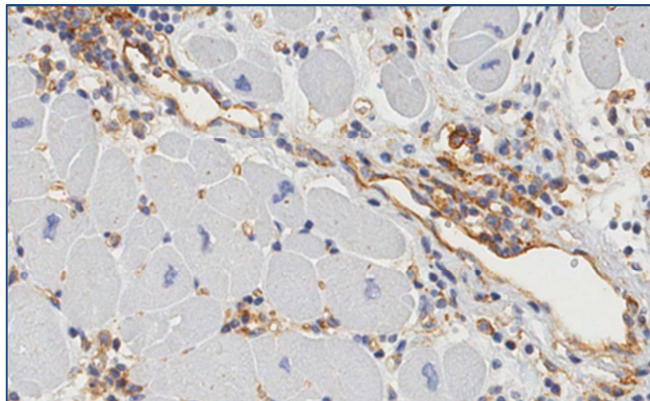


#### Foto 4. Doador



Fotomicrografias de imunohistoquímica de HLA de classe II em fragmento de biópsia endomiocárdica (40x). Positividade em células inflamatórias e endotélio de caso de miocardiopatia chagásica (foto 3). Positividade em endotélio de doador (foto 4).

#### Foto 5. Expressão de ICAM-I em Mioc. Chagásica



Fotomicrografia de imunohistoquímica de ICAM-I em fragmento de biópsia endomiocárdica de miocardiopatia chagásica (40x). Positividade em células inflamatórias e endotélio.



**Tabela 15**  
**Celularidade, HLA e ICAM por Etiologias**

	DO (29)	ID (32)	CH (9)	IS (6)	OU (8)	p
CD3	4,42	8	77,6	14	8,13	<0,0001
(célis/mm <sup>2</sup> )	(1,25 – 7,9)	(4,7 – 14,7)	(54,2 – 163,8)	(3,23 – 32,3)	(5 – 15,5)	
CD68	27,8	17,32	74,8	36,35	20	<0,0001
(célis/mm <sup>2</sup> )	(14,5 – 34,6)	(11,4 – 23,5)	(44,1 – 82)	(14 – 46,7)	(14,9 – 33,7)	
CD20	0	0	8,75	0,73	0	<0,0001
(célis/mm <sup>2</sup> )	(0 – 0,4)	(0 – 0,92)	(6 – 18,7)	(0,19 – 1,19)	(0 – 0,54)	
CD45R0	8,2	8,3	126,4	22,23	8,1	<0,0001
(célis/mm <sup>2</sup> )	(3,7 – 14,8)	(4,6 – 19,6)	(64,7 – 199,6)	(8,3 – 44,52)	(3,2 – 13)	
HLA	1,33	0,76	3,38	1	0,8	0,002
(%de área)	(0,7 – 2,4)	(0,22 – 1,14)	(1,27 – 8,6)	(0,5 – 1,2)	(0,2 – 2)	
ICAM	1,4	1,8	1,92	0,75	0,8	0,35
(%deárea)	(0,7 – 4,9)	(0,66 – 2,7)	(0,83 – 5,83)	(0,52 – 1)	(0,6 – 4,7)	

Dados apresentados como mediana (p25, p75) ou n (%) de casos

DO: doador; ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras

Teste de Kruskal Wallis e comparação de Dunn

CD3 significância: CH x DO, CH x ID, CH x OU

CD68 significância: CH x DO, CH x ID, CH x OU

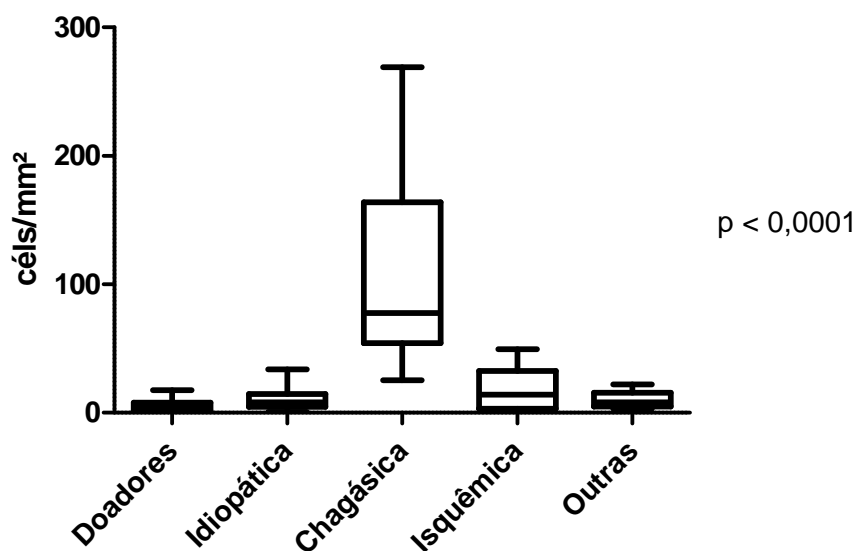
CD20 significância: CH x DO, CH x ID, CH x OU

CD45R0 significância: CH x DO, CH x ID, CH x OU

HLA significância: CH x ID

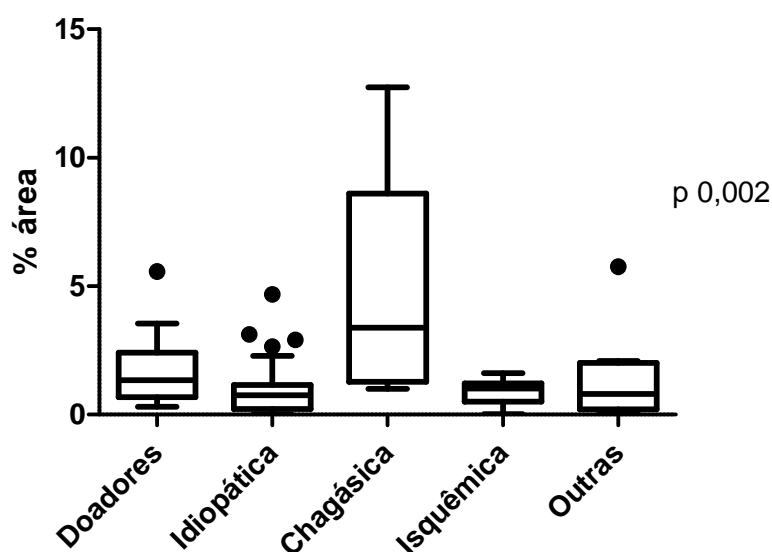
**Gráfico 6**

**Quantificação de Linfócitos T (CD3): doadores e diferentes etiologias**



## Gráfico 7

### Expressão de HLA: doadores e diferentes etiologias



Quando retiramos os chagásicos da avaliação, observamos que apenas em relação aos linfócitos T (CD3) existe diferença entre os doadores e miocardiopatas idiopáticos (tabela 16).

**Tabela 16**  
**Celularidade, HLA e ICAM por Etiologias, sem doença de Chagas**

	DO (29)	ID (32)	IS (6)	OU (8)	p
CD3 (célis/mm <sup>2</sup> )	4,42 (1,25 – 7,9)	8 (4,7 – 14,7)	14 (3,23 – 32,3)	8,13 (5 – 15,5)	0,0081
CD68 (célis/mm <sup>2</sup> )	27,8 (14,5 – 34,6)	17,32 (11,4 – 23,5)	36,35 (14 – 46,7)	20 (14,9 – 33,7)	0,073
CD20 (célis/mm <sup>2</sup> )	0 (0 – 0,4)	0 (0 – 0,92)	0,73 (0,19 – 1,19)	0 (0 – 0,54)	0,17
CD45R0 (célis/mm <sup>2</sup> )	8,2 (3,7 – 14,8)	8,3 (4,6 – 19,6)	22,23 (8,3 – 44,52)	8,1 (3,2 – 13)	0,42
HLA (%de área)	1,33 (0,7 – 2,4)	0,76 (0,22 – 1,14)	1 (0,5 – 1,2)	0,8 (0,2 – 2)	0,096
ICAM (%deárea)	1,4 (0,7 – 4,9)	1,8 (0,66 – 2,7)	0,75 (0,52 – 1)	0,8 (0,6 – 4,7)	0,24

Dados apresentados como mediana (p25, p75)

DO: doador; ID: idiopática; IS: isquêmica; OU: outras

Teste de Kruskal Wallis e comparação de Dunn

CD3: significância DO x ID

### 5.2.5 Comparação da expressão de HLA e ICAM nos doadores e miocardiopatas em relação ao infiltrado inflamatório por CD3 e CD68

Quando comparamos os doadores e os miocardiopatas em relação à ausência e presença de inflamação por linfócitos T (CD3) e macrófagos (CD68) (contagem acima de 7 ou 14 células / mm<sup>2</sup>), não houve diferença na expressão

de HLA e ICAM em relação à celularidade, tanto nos doadores como nos miocardiopatas, com exceção feita aos casos em que o número de linfócitos T (CD3) foi acima 14 céls/mm<sup>2</sup> nos miocardiopatas (tabela 17).

**Tabela 17.**  
**Inflamação: Celularidade x HLA e ICAM**

<b>Doadores</b>	<b>CD3 &lt; 7 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>CD3 &gt; 7 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
CD3 (céls/mm <sup>2</sup> )	2,13 (0,82 – 4,92)	9,62 (7,91 – 13,54)	<0,0001
HLA (%de área)	1,24 (0,56 – 2,17)	1,35 (0,88 – 2,68)	0,66
ICAM (%de área)	1,32 (0,62 – 4,9)	1,5 (1,05 – 6,1)	0,59

<b>Doadores</b>	<b>CD3 &lt; 14 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>CD3 &gt; 14 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
CD3 (céls/mm <sup>2</sup> )	4,05 (1,75 – 7,33)	16,52 (15,4 – 17,7)	0,027
HLA (%de área)	1,72 (0,53 – 3,01)	1,03 (0,74 – 1,32)	0,49
ICAM (%de área)	1,18 (0,47 – 3,8)	1,14 (1,24 – 1,56)	0,85

<b>Doadores</b>	<b>CD68 &lt; 7 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>CD68 &gt; 7 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
CD68 (céls/mm <sup>2</sup> )	2,34 (0,32 – 6,2)	28,33 (18,1 – 37,2)	0,006
HLA (%de área)	1,07 (0,87 – 1,24)	1,35 (0,6 – 2,6)	0,46
ICAM (%de área)	1,86 (1,32 – 1,98)	1,29 (0,63 – 4,92)	0,71

<b>Doadores</b>	<b>CD68 &lt; 14 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>CD68 &gt; 14 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
CD68 (céls/mm <sup>2</sup> )	10,7 (4,2 – 11,5)	29,35 (26,2 – 41,3)	0,0012
HLA (%de área)	1,12 (0,68 – 3,82)	1,35 (0,56 – 2,87)	0,73
ICAM (%de área)	1,86 (0,22 – 3,83)	1,24 (0,62 – 3,45)	0,79

<b>Miocardiopatas</b>	<b>CD3 &lt; 7 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>CD3 &gt; 7 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
CD3 (céls/mm <sup>2</sup> )	4,57 (3,1 – 5,8)	16,98 (9,6 – 33,5)	<0,0001
HLA (%de área)	0,72 (0,21 – 2,28)	1,07 (0,39 – 2)	0,4
ICAM (%de área)	1,38 (0,6 – 2,1)	1,46 (0,67 – 4,1)	0,34

<b>Miocardiópatas</b>	<b>CD3 &lt; 14 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>CD3 &gt; 14 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
CD3 (céls/mm <sup>2</sup> )	4,57 (3,1 – 5,8)	26,6 (17,7 - 66,9)	<0,0001
<b>HLA (%de área)</b>	<b>0,68 (0,19 – 1,18)</b>	<b>1,19 (1,03 – 2,68)</b>	<b>0,0045</b>
ICAM (%de área)	1,42 (0,65 – 2,1)	1,92 (0,7 – 5,5)	0,3

<b>Miocardiópatas</b>	<b>CD68 &lt; 7 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>CD68 &gt; 7 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
CD68 (céls/mm <sup>2</sup> )	2,68 (0,4 – 5,27)	22,3 (15,85 – 36,35)	<0,0001
HLA (%de área)	1,1 (0,98 – 3,79)	1 (0,24 – 2,1)	0,35
ICAM (%de área)	1,74 (0,49 – 3,25)	1,44 (0,65 – 2,74)	0,98

<b>Miocardiópatas</b>	<b>CD68 &lt; 14 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>CD68 &gt; 14 céls/mm<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
CD68 (céls/mm <sup>2</sup> )	9,67 (6,9 – 2,17)	25,4 (19,2 – 39,75)	<0,0001
HLA (%de área)	0,8 (0,27 – 1,1)	1,08 (0,34 – 2,16)	0,3
ICAM (%de área)	2,07 (0,8 – 3,33)	1,2 (0,66 – 2,95)	0,58

Dados apresentados como mediana (p25, p75)

### **5.2.6 Tempo de Início dos Sintomas de IC x Celularidade, HLA e ICAM**

O grupo de miocardiopatias foi dividido em relação ao tempo de início dos sintomas em IC aguda (abaixo de 6 meses) e crônica (acima de 6 meses). O grupo de IC aguda correspondeu a 31% dos casos e o grupo de IC crônica 69%. Apesar da grande diferença entre os grupos em relação ao tempo de início dos sintomas, não houve diferença em relação às células inflamatórias, HLA e ICAM (tabela 18).

**Tabela 18.**

#### **Tempo do Início dos Sintomas de IC x Celularidade, HLA e ICAM**

	<b>Aguda (&lt; 6 meses) (17)</b>	<b>Crônica (&lt; 6 meses) (38)</b>	<b>p</b>
Tempo (meses)	3 (2 - 4)	36 (24 – 62,5)	<0,0001
CD3 (céls/mm <sup>2</sup> )	8,67 (5,9 – 19,1)	10,52 (5,1 – 27,3)	0,67
CD68 (céls/mm <sup>2</sup> )	17,7 (12,2 – 25,9)	22,6 (14,1 – 36,4)	0,19
CD20 (céls/mm <sup>2</sup> )	0,64 (0 – 1,64)	0,5 (0 – 2)	0,88
CD45R0 (céls/mm <sup>2</sup> )	8,5 (4,1 – 13,4)	11,4 (5,31 – 34,4)	0,15
HLA (% de área)	0,94 (0,36 – 1,15)	1,07 (0,24 – 2,37)	0,32
ICAM (% de área)	1,85 (0,85 – 3,12)	1,4 (0,63 – 2,95)	0,5

Dados apresentados como mediana (p25, p75)

### **5.3 Pesquisa de Microorganismos por Imunohistoquímica**

Na comparação entre doadores e miocardiopatas (tabelas 19 e 20), houve predomínio dos antígenos de enterovírus nos doadores e antígenos do vírus da hepatite C nos miocardiopatas. Não houve diferença entre os antígenos bacterianos.

A marcação do antígeno de HHV6 predominou nos idiopáticos e nas outras etiologias em comparação aos chagásicos; o antígeno de superfície da hepatite B predominou nos idiopáticos em comparação aos doadores e chagásicos e de borrelia também nos idiopáticos em relação aos chagásicos (tabelas 21 e 22).

Quando retiramos os chagásicos da análise, o predomínio de antígenos de enterovírus dos doadores em relação aos idiopáticos se evidenciou e o contrário observou-se em relação aos antígenos de hepatite C e de superfície de hepatite B; ocorreu também predomínio de antígenos de borrelia nos idiopáticos em relação aos doadores (tabelas 23 e 24).

A tabela 25 e as fotos 6 - 11 apresentam a análise de positividade dos microorganismos levando em consideração sua expressão em endotélio, células inflamatórias, fibras cardíacas, núcleo e interstício. Não houve diferença de localização de positividade para cada microorganismo na comparação entre os doadores e as diferentes miocardiopatias.

**Tabela 19.**  
**Pesquisa de Vírus por Imunohistoquímica**

	<b>Doador</b>	<b>Miocardiopatia</b>	<b>p</b>
ADV (% de área)	0,23 (0,12 - 0,37)	0,15 (0,06 – 0,29)	0,16
HS1 (% de área)	0,26 (0,11 – 0,4)	0,18 (0,05 – 0,4)	0,62
HS2 (% de área)	0,26 (0,08 – 0,41)	0,37 (0,1 – 0,8)	0,66
EBV (% de área)	0,61 (0,2 – 0,95)	0,35 (0,22 – 0,86)	0,67
PB19 (% de área)	0,48 (0,32 – 0,7)	0,47 (0,3 – 1,05)	0,63
Entero (% de área)	2 (0,56 – 5,7)	0,61 (0,28 – 2,45)	0,0075
HHV6 (% de área)	4,9 (2,44 – 7,23)	5,75 (2,96 – 8,42)	0,47
HBs (% de área)	0,41 (0,22 – 1,05)	0,77 (0,3 – 2,4)	0,056
HBc (% de área)	0,29 (0,12 – 1,04)	0,56 (0,22 – 1,6)	0,19
HCV (% de área)	0,6 (0,37 – 1,41)	1,31 (0,5 – 3,6)	0,02

Dados apresentados como mediana (p25, p75); ADV: adenovírus; HS1: herpes simplex 1; HS2: herpes simplex 2; EBV: Epstein-Barr vírus; PB19: parvovírus B19; Entero: enterovírus; HHV6: herpes vírus 6; HBs: antígeno de superfície vírus B; HBc: antígeno nuclear vírus B; HCV: vírus hepatite C

**Tabela 20.**  
**Pesquisa de Bactérias por Imunohistoquímica**

	<b>Doador</b>	<b>Miocardiopatia</b>	<b>p</b>
CP (% de área)	1,7 (0,58 – 3,73)	1,93 (0,73 – 4,5)	0,43
MP (% de área)	14,14 (11 – 21,5)	13,65 (7,53 – 18,54)	0,55
Bor (% de área)	1,16 (0,45 – 2,42)	2,1 (0,77 – 6)	0,076

Dados apresentados como mediana (p25, p75); CP: *Chlamydia pneumoniae*; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; Bor: *Borrelia*

**Tabela 21.**  
**Pesquisa Viral por Imunohistoquímica: doadores e diferentes etiologias**

	DO	ID	CH	IS	OU	p
ADV (% de área)	0,23 (0,12 - 0,37)	0,16 (0,07 - 0,35)	0,13 (0,06 - 0,33)	0,16 (0,04 - 0,26)	0,08 (0,05 - 0,36)	0,61
HS1 (% de área)	0,26 (0,11 - 0,4)	0,18 (0,05 - 0,54)	0,06 (0,004 - 0,32)	0,17 (0,07 - 2,85)	0,35 (0,14 - 0,42)	0,58
HS2 (% de área)	0,26 (0,08 - 0,41)	0,44 (0,13 - 0,83)	0,13 (0,01 - 0,38)	0,24 (0,24 - 3,9)	0,18 (0,03 - 0,46)	0,21
EBV (% de área)	0,61 (0,2 - 0,95)	0,41 (0,25 - 1,12)	0,56 (0,16 - 0,81)	0,25 (0,22 - 0,56)	0,3 (0,2 - 0,5)	0,68
PB19 (% de área)	0,48 (0,32 - 0,7)	0,62 (0,3 - 1,6)	0,35 (0,25 - 0,68)	0,77 (0,44 - 3,14)	0,25 (0,11 - 0,64)	0,07
Entero (% de área)	2 (0,56 - 5,7)	0,57 (0,26 - 2,1)	0,61 (0,26 - 2,75)	0,83 (0,42 - 6,7)	1,27 (0,33 - 3,54)	0,07
HHV6 (% de área)	4,9 (2,44 - 7,23)	6,5 (4,1 - 8,5)	2,47 (1,03 - 3,9)	3,83 (2,93 - 7,3)	7,65 (5,43 - 10,44)	0,01
HBs (% de área)	0,41 (0,22 - 1,05)	1,36 (0,58 - 4,3)	0,28 (0,17 - 0,53)	0,95 (0,18 - 1,5)	0,59 (0,15 - 2,27)	0,006
HBc (% de área)	0,29 (0,12 - 1,04)	0,76 (0,23 - 1,77)	0,37 (0,17 - 0,75)	0,57 (0,3 - 1,84)	0,38 (0,15 - 0,93)	0,43
HCV (% de área)	0,6 (0,37 - 1,41)	1,93 (0,58 - 5,3)	1,74 (0,48 - 4,51)	0,64 (0,3 - 1,84)	1,16 (0,43 - 2,38)	0,062

Dados apresentados como mediana (p25, p75); DO: doador; ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras; ADV: adenovírus; HS1: herpes simplex 1; HS2: herpes simplex 2; EBV: Epstein-Barr vírus; PB19: parvovírus B19; Entero: enterovírus; HHV6: herpes vírus 6; HBs: antígeno de superfície vírus B; HBc: antígeno nuclear vírus B; HCV: vírus hepatite C; Teste de Kruskal Wallis e comparação de Dunn  
HHV6 significância: ID x CH, OU x CH; Hbs significância: ID x DO, ID x CH

**Tabela 22.**  
**Pesquisa Bacteriana por Imunohistoquímica:**  
**Doadores e diferentes etiologias**

	DO	ID	CH	IS	OU	p
CP (% de área)	1,7 (0,58 - 3,73)	2,31 (0,74 - 4,6)	1,93 (0,68 - 5,1)	1,7 (0,87 - 3,52)	2,87 (0,63 - 18,21)	0,88
MP (% de área)	14,14 (11 - 21,5)	13,43 (5,9 - 18,8)	9,56 (5,8 - 14,1)	16,11 (12,75 - 24,68)	16,04 (11,27 - 23,9)	0,22
Bor (% de área)	1,16 (0,45 - 2,42)	2,45 (1,08 - 13,97)	0,46 (0,17 - 2,5)	1,69 (0,95 - 9,5)	1,6 (0,46 - 2,64)	0,015

Dados apresentados como mediana (p25, p75); DO: doador; ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras; CP: *Chlamydia pneumoniae*; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; Bor: Borrelia; Teste de Kruskal Wallis e comparação de Dunn; Bor significância: ID x CH

**Tabela 23.**  
**Pesquisa Viral por Imunohistoquímica:**  
**Doadores e diferentes etiologias, sem doença de Chagas**

	DO	ID	IS	OU	p
ADV (% de área)	0,23 (0,12 - 0,37)	0,16 (0,07 - 0,35)	0,16 (0,04 - 0,26)	0,08 (0,05 - 0,36)	0,52
HS1 (% de área)	0,26 (0,11 - 0,4)	0,18 (0,05 - 0,54)	0,17 (0,07 - 2,85)	0,35 (0,14 - 0,42)	0,91
HS2 (% de área)	0,26 (0,08 - 0,41)	0,44 (0,13 - 0,83)	0,24 (0,24 - 3,9)	0,18 (0,03 - 0,46)	0,39
EBV (% de área)	0,61 (0,2 - 0,95)	0,41 (0,25 - 1,12)	0,25 (0,22 - 0,56)	0,3 (0,2 - 0,5)	0,51
PB19 (% de área)	0,48 (0,32 - 0,7)	0,62 (0,3 - 1,6)	0,77 (0,44 - 3,14)	0,25 (0,11 - 0,64)	0,07
Entero (% de área)	2 (0,56 - 5,7)	0,57 (0,26 - 2,1)	0,83 (0,42 - 6,7)	1,27 (0,33 - 3,54)	0,052
HHV6 (% de área)	4,9 (2,44 - 7,23)	6,5 (4,1 - 8,5)	3,83 (2,93 - 7,3)	7,65 (5,43 - 10,44)	0,24
HBs (% de área)	0,41 (0,22 - 1,05)	1,36 (0,58 - 4,3)	0,95 (0,18 - 1,5)	0,59 (0,15 - 2,27)	0,02
HBc (% de área)	0,29 (0,12 - 1,04)	0,76 (0,23 - 1,77)	0,57 (0,3 - 1,84)	0,38 (0,15 - 0,93)	0,36
HCV (% de área)	0,6 (0,37 - 1,41)	1,93 (0,58 - 5,3)	0,64 (0,3 - 1,84)	1,16 (0,43 - 2,38)	0,04

Dados apresentados como mediana (p25, p75); DO: doador; ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras; ADV: adenovírus; HS1: herpes simplex 1; HS2: herpes simplex 2; EBV: Epstein-Barr vírus; PB19: parvovírus B19; Entero: enterovírus; HHV6: herpes vírus 6; HBs: antígeno de superfície vírus B; HBc: antígeno nuclear vírus B; HCV: vírus hepatite C; Teste de Kruskall Wallis e comparação de Dunn; Entero significância: DO x ID; HBs significância: ID x DO; HCV significância: ID x DO

**Tabela 24.**  
**Pesquisa Bacteriana por Imunohistoquímica:**  
**Doadores e diferentes etiologias, sem doença de Chagas**

	DO	ID	IS	OU	p
CP (% de área)	1,7 (0,58 - 3,73)	2,31 (0,74 - 4,6)	1,7 (0,87 - 3,52)	2,87 (0,63 - 18,21)	0,75
MP (% de área)	14,14 (11 - 21,5)	13,43 (5,9 - 18,8)	16,11 (12,75 - 24,68)	16,04 (11,27 - 23,9)	0,40
Bor (% de área)	1,16 (0,45 - 2,42)	2,45 (1,08 - 13,97)	1,69 (0,95 - 9,5)	1,6 (0,46 - 2,64)	0,036

Dados apresentados como mediana (p25, p75); DO: doador; ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras; CP: *Chlamydia pneumoniae*; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; Bor: Borrelia; Teste de Kruskall Wallis e comparação de Dunn; Bor significância: ID x DO.

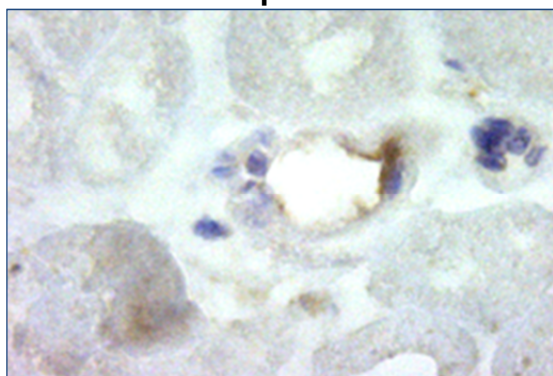


**Tabela 25.**  
**Localização dos antígenos de microorganismos no tecido miocárdico**

	Endotélio	Células inflamatórias	Fibras	Núcleo	Interstício
PB19	+	+	+	0	0
Entero	0	0	+	0	0
HHV6	+	+	+	0	0
HBs	0	0	+	0	+
HBc	0	0	+	0	0
HCV	0	0	+	0	0
Borrelia	+	+	+	+	0

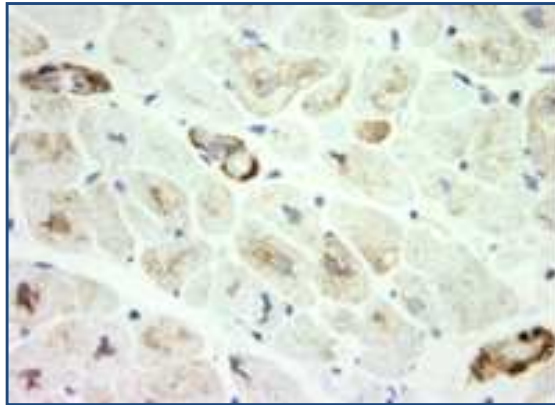
PB19: parvovírus B19; Entero: enterovírus; HHV6: herpes vírus 6; HBs: antígeno de superfície vírus B; HBc: antígeno nuclear vírus B; HCV: vírus hepatite C; +: presente; 0: ausente

**Foto 6. Parvovírus B19 em Mioc. Idiopática**



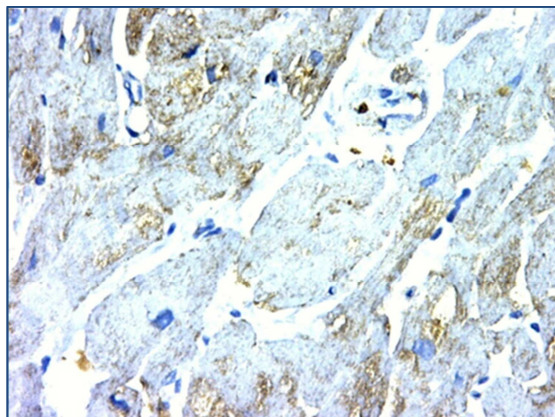
Fotomicrografia de imunohistoquímica para PB19 em fragmento de biopsia endomiocárdica de caso de miocardiopatia idiopática (100x). Positividade em endotélio, células inflamatórias e fibras cardíacas.

### Foto 7. Enterovírus em Doador



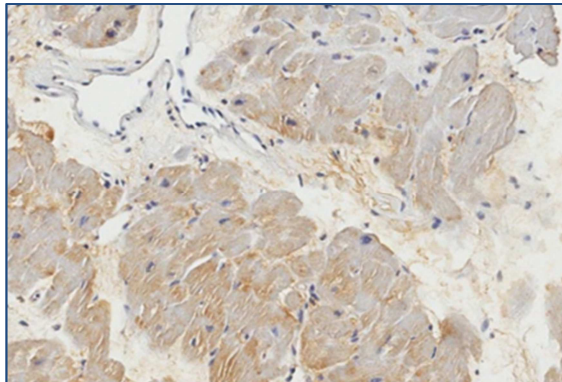
Fotomicrografia de imunohistoquímica para enterovírus em fragmento de biópsia endomiocárdica de doador (40x). Positividade em arteríolas e fibras cardíacas.

### Foto 8. HHV6 em Mioc. Idiopática



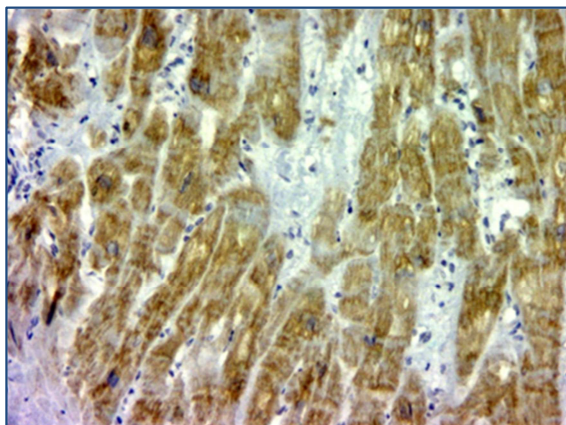
Fotomicrografia de imunohistoquímica para HHV6 em fragmento de biópsia endomiocárdica de caso de miocardiopatia idiopática (40x). Positividade em endotélio, células inflamatórias e fibras cardíacas.

### Foto 9. Hepatite B – antígeno HBs em Mioc. Idiopática



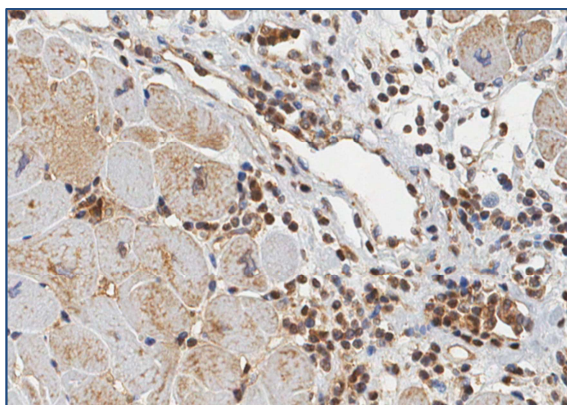
Fotomicrografia de imunohistoquímica para Hepatite B (HBs) em fragmento de biópsia endomiocárdica de caso de miocardiopatia idiopática (40x). Positividade em fibras cardíacas e interstício.

### Foto 10. Hepatite C em Mioc. Idiopática



Fotomicrografia de imunohistoquímica para Hepatite C em fragmento de biópsia endomiocárdica de caso de miocardiopatia idiopática (40x). Positividade em fibras cardíacas.

#### Foto 11. Borrelia em Mioc. Chagásica



Fotomicrografia de imunohistoquímica para *Borrelia* em fragmento de biópsia endomiocárdica de caso de miocardiopatia chagásica (40x). Positividade em endotélio, células inflamatórias, fibras cardíacas e núcleo.

#### 5.4 Correlação entre células inflamatórias, HLA, ICAM e microorganismos

Nos doadores, houve correlação do número de linfócitos T (CD3) com o número das outras células inflamatórias, não havendo correlação com a quantificação de expressão de HLA e de moléculas de adesão (tabela 26). A quantificação de macrófagos se correlacionou à quantificação de linfócitos T (CD3) e à quantificação de antígenos de PB19. (Tabela 27)

Já nos miocardiopatas houve correlação entre o número de linfócitos T (CD3) e o número das outras células inflamatórias, bem como quantificação da expressão de HLA (houve tendência para correlação de expressão de ICAM). Entretanto, não houve correlação entre o número de linfócitos T (CD3) e a quantificação de antígenos de microorganismos (tabela 28). Em relação ao número de macrófagos, também houve correlação com o número das outras células inflamatórias e tendência com a quantificação da expressão de HLA; não houve correlação com quantificação de expressão de ICAM e com a quantificação de antígenos de microorganismos (tabela 29).

**Tabela 26.**  
**Doadores: Linfócitos T (CD3) x Outras Células, HLA, ICAM e**  
**Microorganismos**

Correlação Spearman	Valor de r	p
CD3 x CD68	0,38 (0,01 – 0,66)	0,04
CD3 x CD20	0,4 (0,04 – 0,68)	0,027
CD3 x CD45	0,54 (0,2 – 0,76)	0,0026
CD3 x HLA	0,2 (-0,2 – 0,54)	0,31
CD3 x ICAM	0,12 (-0,27 – 0,48)	0,52
CD3 x ADV	0,07 (-0,32 – 0,44)	0,72
CD3 x HS1	-0,22 (-0,62 – 0,27)	0,36
CD3 x HS2	0,06 (-0,42 – 0,5)	0,81
CD3 x EBV	-0,01 (-0,4 – 0,39)	0,95
CD3 x PB19	0,14 (-0,25 – 0,5)	0,46
CD3 x Entero	-0,07 (-0,44 – 0,32)	0,72
CD3 x HHV6	-0,23 (-0,56 – 0,17)	0,24
CD3 x HBs	0,18 (-0,22 – 0,54)	0,35
CD3 x HBc	-0,06 (-0,43 – 0,33)	0,75
CD3 x HCV	0,11 (-0,43 – 0,6)	0,68
CD3 x CP	0,24 (-0,16 – 0,57)	0,22
CD3 x MP	-0,1 (-0,53 – 0,36)	0,65
CD3 x Bor	-0,22 (-0,56 – 0,17)	0,25

ADV: adenovírus; HS1: herpes simplex 1; HS2: herpes simplex 2; EBV: Epstein-Barr vírus; PB19: parvovírus B19; Entero: enterovírus; HHV6: herpes vírus 6; HBs: antígeno de superfície vírus B; HBc: antígeno nuclear vírus B; HCV: vírus hepatite C; CP: *Chlamydia pneumoniae*; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; Bor: Borrelia

**Tabela 27.**  
**Doadores: Macrófagos (CD68) x Outras Células, HLA, ICAM e**  
**Microorganismos**

Correlação Spearman	Valor de r	p
CD68 x CD3	0,38 (0,01 – 0,66)	0,04
CD68 x CD20	-0,004 (-0,38 – 0,37)	0,98
CD68 x CD45	0,28 (-0,1 – 0,6)	0,14
CD68 x HLA	0,18 (-0,22 – 0,52)	0,37
CD68 x ICAM	0,21 (-0,19 – 0,55)	0,29
CD68 x ADV	0,1 (-0,3 - 0,47)	0,62
CD68 x HS1	-0,35 (-0,7 - 0,13)	0,14
CD68 x HS2	-0,01 (-0,47 – 0,45)	0,96
CD68 x EBV	-0,05 (-0,44 – 0,35)	0,82
CD68 x PB19	0,47 (0,1 – 0,72)	0,012
CD68 x Entero	-0,17 (-0,52 – 0,22)	0,37
CD68 x HHV6	0,07 (-0,32 – 0,44)	0,72
CD68 x HBs	0,07 (-0,32 – 0,45)	0,71
CD68 x HBc	-0,18 (-0,52 – 0,22)	0,36
CD68 x HCV	-0,3 (-0,72 – 0,26)	0,26
CD68 x CP	0,3 (-0,09 – 0,61)	0,12
CD68 x MP	-0,08 (-0,52 – 0,39)	0,73
CD68 x Bor	-0,03 (-0,41 – 0,35)	0,85

ADV: adenovírus; HS1: herpes simplex 1; HS2: herpes simplex 2; EBV: Epstein-Barr vírus; PB19: parvovírus B19; Entero: enterovírus; HHV6: herpes vírus 6; HBs: antígeno de superfície vírus B; HBc: antígeno nuclear vírus B; HCV: vírus hepatite C; CP: *Chlamydia pneumoniae*; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; Bor: Borrelia

**Tabela 28.**  
**Miocardiópatas: Linfócitos T (CD3) x Outras células, HLA, ICAM e Microorganismos**

Correlação Spearman	Valor de r	p
CD3 x CD68	0,58 (0,35 – 0,74)	< 0,0001
CD3 x CD20	0,6 (0,38 – 0,75)	< 0,0001
CD3 x CD45	0,65 (0,45 – 0,79)	< 0,0001
CD3 x HLA	0,32 (0,04 – 0,55)	0,02
CD3 x ICAM	0,28 (-0,02 – 0,53)	0,06
CD3 x ADV	-0,1 (-0,38 – 0,18)	0,46
CD3 x HS1	0,008 (-0,3 – 0,3)	0,95
CD3 x HS2	-0,17 (-0,45 – 0,15)	0,27
CD3 x EBV	-0,12 (-0,39 – 0,16)	0,39
CD3 x PB19	0,036 (-0,32 – 0,39)	0,84
CD3 x Entero	0,20 (-0,09 – 0,48)	0,16
CD3 x HHV6	0,004 (-0,3 – 0,3)	0,98
CD3 x HBs	-0,12 (-0,39 – 0,16)	0,38
CD3 x HBc	-0,2 (-0,45 – 0,08)	0,15
CD3 x HCV	-0,16 (-0,43 – 0,13)	0,26
CD3 x CP	0,03 (-0,25 – 0,3)	0,83
CD3 x MP	- 0,03 (-0,31 – 0,25)	0,82
CD3 x Bor	0,05 (-0,23 – 0,33)	0,7

ADV: adenovírus; HS1: herpes simplex 1; HS2: herpes simplex 2; EBV: Epstein-Barr vírus; PB19: parvovírus B19; Entero: enterovírus; HHV6: herpes vírus 6; HBs: antígeno de superfície vírus B; HBc: antígeno nuclear vírus B; HCV: vírus hepatite C; CP: *Chlamydia pneumoniae*; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; Bor: Borrelia

**Tabela 29.**  
**Miocardiópatas: Macrófagos (CD68) x Outras células, HLA, ICAM e Microorganismos**

Correlação Spearman	Valor de r	p
CD68 x CD3	0,58 (0,35 – 0,74)	< 0,0001
CD68 x CD20	0,38 (0,11 – 0,56)	0,0057
CD68 x CD45	0,60 (0,39 – 0,76)	< 0,0001
CD68 x HLA	0,27 (-0,01 – 0,51)	0,052
CD68 x ICAM	0,23 (-0,07 – 0,5)	0,12
CD68 x ADV	-0,15 (-0,4 – 0,14)	0,3
CD68 x HS1	0,05 (-0,26 – 0,35)	0,75
CD68 x HS2	-0,05 (-0,36 – 0,26)	0,73
CD68 x EBV	0,2 (-0,21 – 0,55)	0,33
CD68 x PB19	-0,22 (-0,47 – 0,06)	0,11
CD68 x Entero	0,001 (-0,3 – 0,3)	0,99
CD68 x HHV6	-0,09 (-0,39 – 0,21)	0,53
CD68 x HBs	-0,22 (-0,47 – 0,06)	0,12
CD68 x HBc	-0,19 (-0,45 – 0,09)	0,17
CD68 x HCV	-0,05 (-0,34 – 0,24)	0,7
CD68 x CP	-0,007 (-0,28 – 0,27)	0,96
CD68 x MP	0,06 (-0,22 – 0,34)	0,65
CD68 x Bor	-0,2 (-0,45 – 0,08)	0,15

ADV: adenovírus; HS1: herpes simplex 1; HS2: herpes simplex 2; EBV: Epstein-Barr vírus; PB19: parvovírus B19; Entero: enterovírus; HHV6: herpes vírus 6; HBs: antígeno de superfície vírus B; HBc: antígeno nuclear vírus B; HCV: vírus hepatite C; CP: *Chlamydia pneumoniae*; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; Bor: Borrelia



## **5.5 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular**

### **5.5.1 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular: Doadores**

Todos os doadores apresentaram positividade para genoma de algum vírus estudado e na grande maioria houve associação de microorganismos. O genoma bacteriano esteve ausente em 78% dos casos. A positividade do genoma para os microorganismos estudados nos doadores foi de 83,3% para adenovírus, 33,3% para EBV, 0 para CMV, 84,6% para HHV6, 92% para PB19, 20,8% para micoplasma, 4,2% para clamídia e 0 para borrelia (tabela 30, gráficos 8 e 9).

**Tabela 30.**  
**Pesquisa de Agentes Infecciosos por Biologia Molecular: Doadores**

DO	ADV	EBV	CMV	HHV6	PB19	MP	CP	Bor	CD3	CD68	HLA	ICAM	Vírus	Bact
1	N	N	N	N	P	N	N	N	0,77	2,34	0,87	1,98	PB19	0
2	N	N	N	P	P	N	N	N	2,03	35,86	1,45	nr	HHV6 + PB19	0
3	nr	nr	N	P	P	nr	nr	nr	0,50	32,74	nr	0,9	HHV6 + PB19	0
4	P	N	N	P	P	N	N	N	6,3	6,2	1,24	1,32	ADV + PB19 + HHV6	0
5	N	N	N	N	P	N	N	N	0,51	26,76	0,51	0,99	PB19	0
6	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	0,36	81,08	1,38	11,5	nr	nr
7	P	N	N	P	nr	N	N	N	4,42	18,2	0,65	10,9	ADV + HHV6	0
8	P	N	N	P	nr	P	N	N	11,7	22,87	1,01	4,76	ADV + HHV6	MP
9	P	P	N	P	P	N	N	N	9,62	60,73	1,42	11,1	ADV+EBV+HHV6+PB19	0
10	N	N	N	P	P	N	N	N	17,7	55	0,74	1,57	HHV6 + PB19	0
11	nr	nr	N	N	P	nr	nr	nr	15,4	113,8	1,32	1,24	PB19	0
12	P	N	N	P	P	N	N	N	1,41	12,3	1,12	0,28	ADV+HHV6+PB19	0
13	P	N	N	P	P	P	N	N	0,99	0,32	1,07	1,86	ADV+HHV6+PB19	MP
14	P	P	N	P	P	N	N	N	2,23	10,8	5,58	0,17	ADV+EBV+HHV6+PB19	0
15	P	P	N	P	P	P	N	N	10,8	27,82	2,49	1,49	ADV+EBV+HHV6+PB19	MP

16	P	P	N	P	P	P	N	N	6,86	26,24	3,55	5,95	ADV+EBV+HHV6+PB19	MP
17	P	N	N	P	P	P	N	N	9,09	41,32	3,5	1,29	ADV+HHV6+PB19	MP
18	P	N	N	P	P	N	N	N	5,3	43,7	0,45	3,45	ADV+HHV6+PB19	0
19	P	N	N	P	P	N	N	N	1,1	10,7	0,3	4,9	ADV+HHV6+PB19	0
20	P	N	N	P	P	N	N	N	8,4	33,3	2,87	7,35	ADV+HHV6+PB19	0
21	P	N	N	N	P	N	N	N	1,86	19,18	0,56	1,08	ADV + PB19	0
22	P	N	N	P	P	N	N	N	2,69	29,35	0,34	0,41	ADV+HHV6+PB19	0
23	P	P	N	P	P	N	N	N	7,43	16,77	0,43	0,47	ADV+EBV+HHV6+PB19	0
24	P	P	N	P	N	N	P	N	7,3	27,8	1,35	0,85	ADV+EBV+HHV6	CP
25	P	N	N	P	P	N	N	N	5,09	28,84	3,43	0,47	ADV+HHV6+PB19	0
26	P	N	N	P	P	N	N	N	6,2	30,85	2,17	4,95	ADV+HHV6+PB19	0
27	P	N	N	P	N	N	N	N	0,6	8,17	2,1	2,76	ADV + HHV6	0
28	nr	nr	nr	nr	P	nr	nr	nr	2,87	17,63	2,76	0,62	PB19	0
29	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	3,01	30,13	1,35	0,65	nr	nr

DO: doador; ADV: adenovírus; EBV: Epstein-Barr vírus; CMV: citomegalovírus; HHV6: herpes vírus 6; PB19: parvovírus B19; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; CP: *Chlamydia pneumoniae*; Bor: Borrelia; Bact: bactérias; N: negativo; P: positivo; nr: não realizado

## Doadores n=27 Genoma Viral

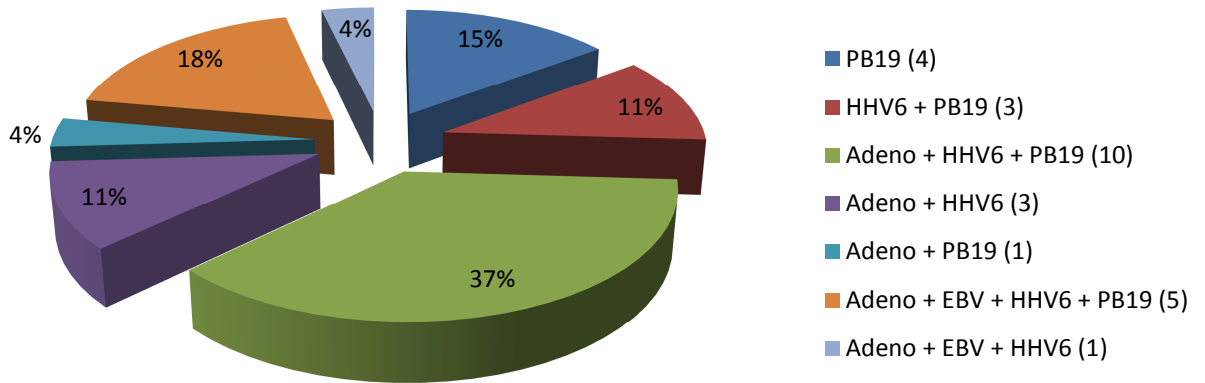


Gráfico 8. Genoma Viral: Doadores

## Doadores n=27 Genoma Bacteriano

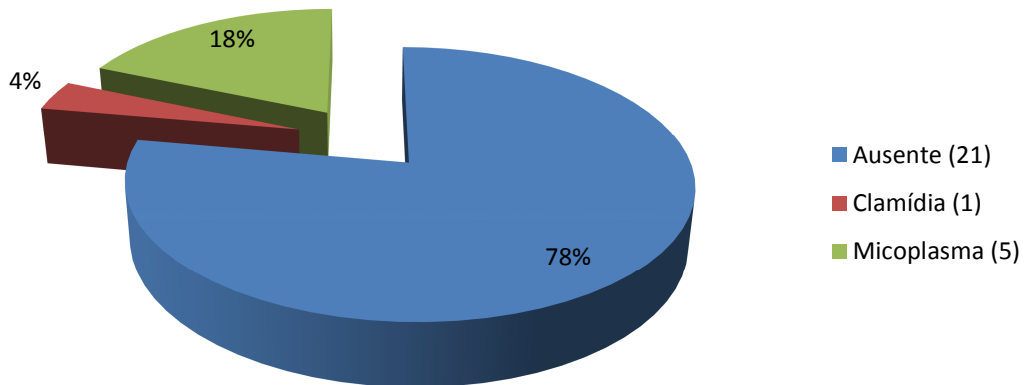


Gráfico 9. Genoma Bacteriano: Doadores

### **5.5.2 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular: Miocardiopatia Idiopática**

Nos pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática a presença de genoma viral esteve ausente em apenas 2 casos (7%) e isso pode ter sido devido ao fato de que em ambos não foi possível a pesquisa de PB19 (escassez de material). Na maioria dos casos houve associação de genoma viral. Genoma bacteriano esteve ausente em 58% dos casos.

A positividade do genoma para os microorganismos estudados nos idiopáticos foi de 51,7% para adenovírus, 33,3% para EBV, 0 para CMV, 30% para HHV6, 95,8% para PB19, 37,9% para micoplasma, 17,2% para clamídia e 3,3% para borrelia (tabela 31, gráficos 10 e 11).

**Tabela 31.**  
**Pesquisa de Agentes Infecciosos por Biologia Molecular: Miocardiopatia Idiopática**

ID	ADV	EBV	CMV	HHV6	PB19	MP	CP	Bor	CD3	CD68	HLA	ICAM	Vírus	Bact
1	P	P	N	N	P	N	N	N	29,46	28,84	0,23	nr	ADV+EBV+PB19	0
2	N	P	N	N	P	N	N	N	8,58	17,7	0,19	1,85	EBV+PB19	0
3	N	N	N	P	P	N	N	N	3,11	9,2	0,05	0,18	HHV6+PB19	0
4	N	N	N	P	P	N	N	N	16,63	12	1,07	nr	HHV6+PB19	0
5	N	N	N	N	P	N	N	N	2,97	20,79	3,12	nr	PB19	0
6	N	N	N	N	nr	N	N	N	4,68	3,79	1,14	2,11	0	0
7	N	N	N	P	P	N	N	N	7,43	26,36	1,37	0,93	HHV6+PB19	0
8	N	P	N	N	P	N	N	N	3,9	12,7	0,21	2,07	EBV+PB19	0
9	N	P	N	N	P	N	N	N	20,11	8,1	0,33	4,45	EBV+PB19	0
10	nr	P	nr	nr	nr	nr	nr	nr	9,6	15,85	0,09	1,46	EBV	0
11	N	N	N	P	P	P	N	N	5,97	16,7	0,12	0,2	HHV6+PB19	MP
12	P	P	N	P	P	P	P	N	33,5	29,37	1,15	4,13	ADV+EBV+HHV6+PB19	MP+CP
13	N	N	N	P	P	P	P	N	9,24	23,39	0,12	0,67	HHV6 + PB19	MP+CP
14	N	P	N	P	P	P	N	N	15,33	31,42	1,11	2,57	EBV+HHV6+PB19	MP
15	P	P	N	N	P	P	N	N	6,67	20,53	0,57	1,47	ADV+EBV+PB19	MP
16	P	N	N	P	N	P	N	P	6,23	10,4	0,68	0,65	ADV+HHV6	MP+Bor
17	P	N	N	N	P	N	P	N	8,67	12,34	nr	0,43	ADV+PB19	CP
18	P	N	N	N	P	N	N	N	3,48	20,32	0,70	2,5	ADV+PB19	0

19	P	N	N	N	P	N	N	N	1,92	13,88	0,72	2,08	ADV+PB19	0
20	P	N	N	N	P	N	N	N	4,77	16	2,9	2,09	ADV+PB19	0
21	N	P	N	N	P	P	N	N	16,98	27,98	2,12	0,55	EBV+PB19	MP
22	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	12,31	1,58	4,68	3,63	nr	nr
23	P	N	N	N	P	N	N	N	12,83	18,97	1,02	1,76	ADV+PB19	0
24	N	N	N	P	P	N	N	N	7,38	19,38	0,95	nr	HHV6+PB19	0
25	P	N	N	N	P	N	N	N	5,2	8,68	2,65	nr	ADV+PB19	0
26	P	N	N	N	nr	P	P	N	7,01	9,67	0,8	nr	ADV	MP + CP
27	P	N	N	N	P	P	N	N	0,7	16,93	2,28	0,56	ADV+PB19	MP
28	P	N	N	N	nr	P	N	N	10,39	33,78	0,53	2,8	ADV	MP
29	nr	nr	nr	N	nr	nr	nr	N	9,23	23,58	0,44	nr	0	0
30	P	P	N	N	nr	P	N	N	25,85	36,41	0,21	11,25	ADV+EBV	MP
31	P	N	N	N	nr	N	P	N	4,57	11,15	1,08	0,87	ADV	CP
32	N	N	N	N	P	N	N	N	18,19	21,82	0,94	6,43	PB19	0

ID: idiopática; ADV: adenovírus; EBV: Epstein-Barr vírus; CMV: citomegalovírus; HHV6: herpes vírus 6; PB19: parvovírus B19; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; CP: *Chlamydia pneumoniae*; Bor: Borrelia; Bact: bactérias; N: negativo; P: positivo; nr: não realizado

## Miocardiopatia Idiopática n=31 Genoma Viral

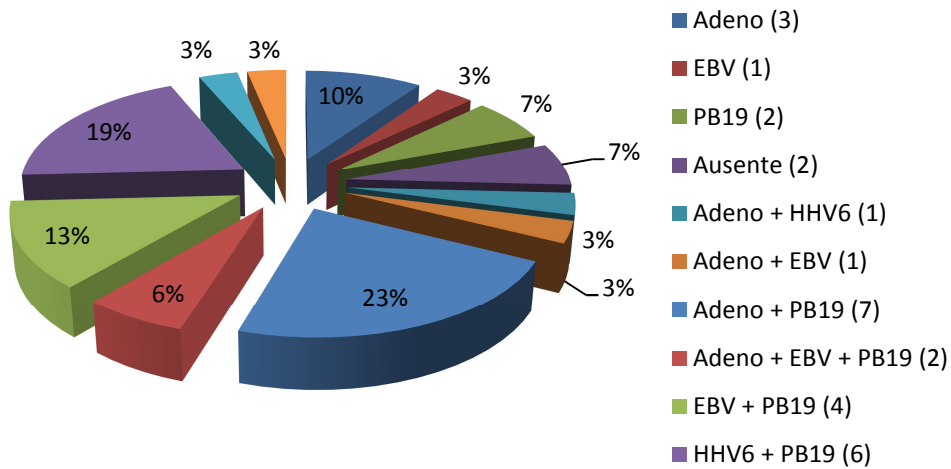


Gráfico 10. Genoma Viral: Miocardiopatia Idiopática

## Miocardiopatia Idiopática n=31 Genoma Bacteriano

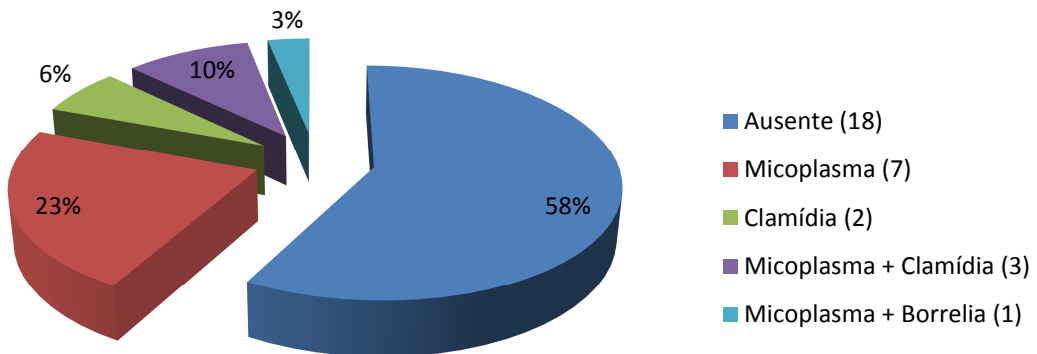


Gráfico 11. Genoma Bacteriano: Miocardiopatia Idiopática



### **5.5.3 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular:**

#### **Miocardiopatia Chagásica**

Na miocardiopatia chagásica a presença de genoma viral esteve documentada em todos os pacientes. Devido à escassez de material, alguns casos não foram realizados. Na maioria dos casos houve associação de genoma viral. Genoma bacteriano esteve ausente em 80% dos casos.

A positividade do genoma para os microorganismos estudados nos chagásicos foi de 55,5% para adenovírus, 40% para EBV, 20% para CMV, 75% para HHV6, 57,14% para PB19, 20% para micoplasma, 20% para clamídia e 0 para borrelia (tabela 32, gráficos 12 e 13).

**Tabela 32.**  
**Pesquisa de Agentes Infecciosos por Biologia Molecular: Miocardiopatia Chagásica**

CH	ADV	EBV	CMV	HHV6	PB19	MP	CP	Bor	CD3	CD68	HLA	ICAM	Vírus	Bact
1	nr	nr	nr	N	P	nr	nr	nr	nr	104,1	12,74	0,72	PB19	nr
2	nr	nr	nr	P	P	nr	nr	nr	78,22	61,33	3,82	1,92	HHV6+PB19	nr
3	N	N	P	N	N	N	N	N	53,28	86,54	1,19	1,43	CMV	0
4	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	166	77,45	1,35	0,62	nr	nr
5	nr	nr	nr	P	P	nr	nr	nr	157,4	74,8	5,6	6,16	HHV6+PB19	nr
6	N	P	N	P	P	P	P	N	76,92	54,57	3,38	5,49	EBV+HHV6+PB19	MP+CP
7	P	N	N	P	N	N	N	N	269,2	75,04	11,62	8,01	ADV+HHV6	0
8	P	P	N	P	N	N	N	N	56,91	33,64	1	0,95	ADV+EBV+HHV6	0
9	P	N	N	P	nr	N	N	N	25,15	23,8	3,24	3,4	ADV+HHV6	0

CH: chagásica; ADV: adenovírus; EBV: Epstein-Barr vírus; CMV: citomegalovírus; HHV6: herpes vírus 6; PB19: parvovírus B19; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; CP: *Chlamydia pneumoniae*; Bor: Borrelia; Bact: bactérias; N: negativo; P: positivo; nr: não realizado

## Miocardopatía Chagásica n=8 Genoma Viral

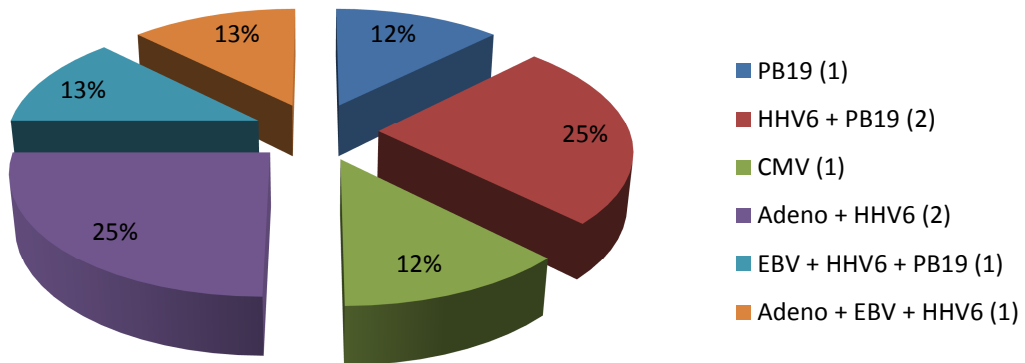


Gráfico 12. Genoma Viral: Miocardopatía Chagásica

## Miocardopatía Chagásica n=5 Genoma Bacteriano

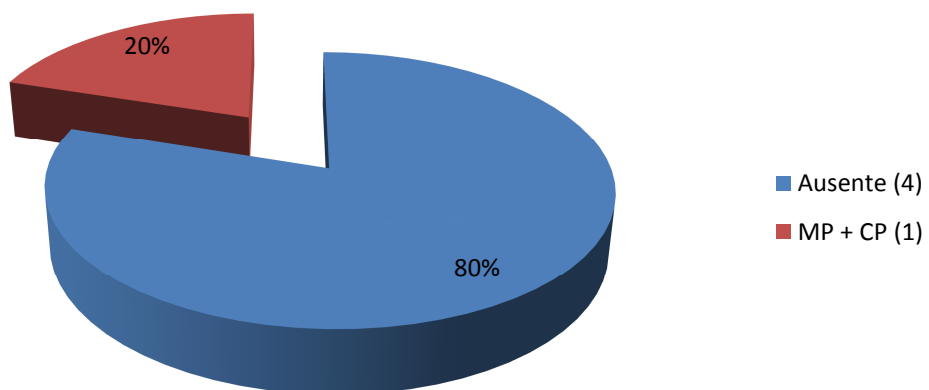


Gráfico 13. Genoma Bacteriano: Miocardopatía Chagásica

#### **5.5.4 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular:**

##### **Miocardioptia Isquêmica**

Na miocardioptia isquêmica a presença de genoma viral esteve documentada em todos os pacientes, também ocorrendo associação de microorganismos. Genoma bacteriano esteve presente em 67% dos casos sendo todos de micoplasma.

A positividade do genoma para os microorganismos estudados nos isquêmicos foi de 66,7% para adenovírus, 0 para EBV, 16,7% para CMV, 66,7% para HHV6, 50% para PB19, 0 para clamídia e 0 para borrelia (tabela 33, gráficos 14 e 15).

**Tabela 33.**

**Pesquisa de Agentes Infeciosos por Biologia Molecular: Miocardiopatia Isquêmica**

IS	ADV	EBV	CMV	HHV6	PB19	MP	CP	Bor	CD3	CD68	HLA	ICAM	Vírus	Bact
1	N	N	N	N	P	N	N	N	3,64	0	0,95	1,38	PB19	0
2	P	N	N	N	P	P	N	N	49,37	50,5	1,61	0,79	ADV+PB19	MP
3	P	N	N	P	P	P	N	N	26,6	36,35	1,08	0,71	ADV+HHV6+PB19	MP
4	N	N	N	P	N	P	N	N	16,87	5,76	1,08	0,19	HHV6	MP
5	P	N	N	P	N	P	N	N	2	43	0,015	0,89	ADV+HHV6	MP
6	P	N	P	P	N	N	N	N	11,15	22,3	0,67	0,63	ADV+CMV+HHV6	0

IS: isquêmica; ADV: adenovírus; EBV: Epstein-Barr vírus; CMV: citomegalovírus; HHV6: herpes vírus 6; PB19: parvovírus B19; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; CP: *Chlamydia pneumoniae*; Bor: Borrelia; Bact: bactérias; N: negativo; P: positivo; nr: não realizado

## MiocardioPatia Isquêmica n= 6 Genoma Viral

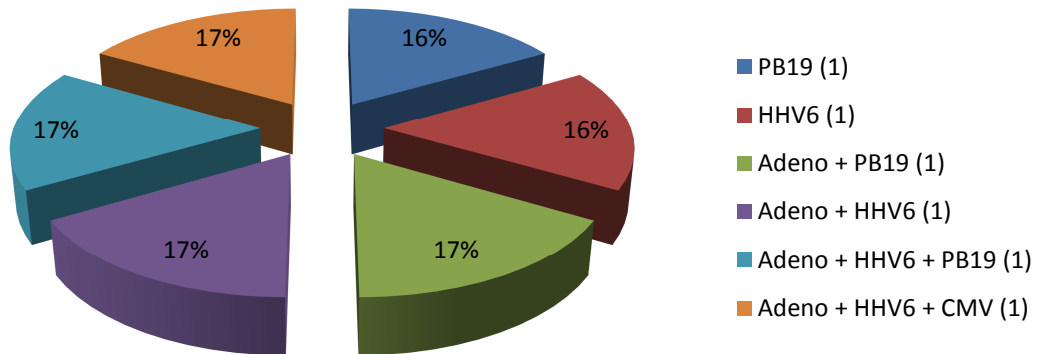


Gráfico 14. Genoma Viral: MiocardioPatia Isquêmica

## MiocardioPatia Isquêmica n=6 Genoma Bacteriano

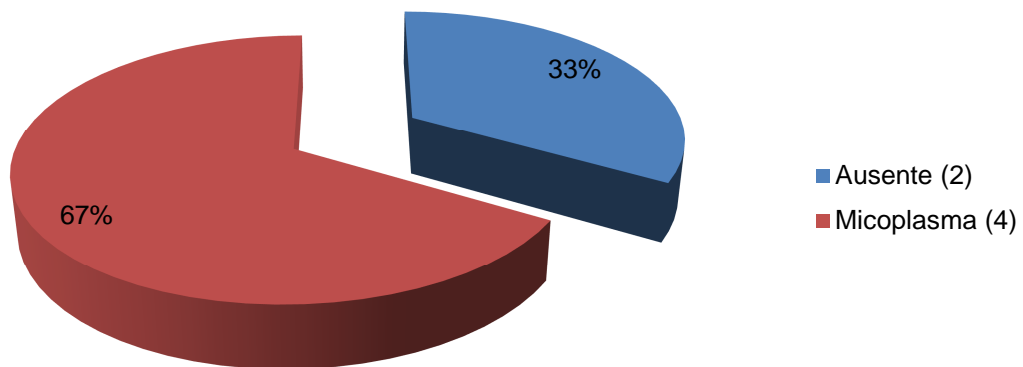


Gráfico 15. Genoma Bacteriano: MiocardioPatia Isquêmica

### **5.5.5 Pesquisa de Microorganismos por Biologia Molecular: Outras Miocardiopatias**

No conjunto das outras miocardiopatias, a presença de genoma viral esteve evidenciada em todos os pacientes, também com predomínio de associações. Genoma bacteriano de micoplasma esteve presente em 50% dos casos.

A positividade do genoma para os microorganismos estudados no conjunto das outras miocardiopatias foi de 62,5% para adenovírus, 0 para EBV, 12,5% para CMV, 71,4% para HHV6, 57,1% para PB19, 50% para micoplasma, 0 para clamídia e 0 para borrelia (tabela 34 e gráficos 16 e 17).

**Tabela 34.**  
**Pesquisa de Agentes Infecciosos por Biologia Molecular: Outras Miocardiopatias**

OU	ADV	EBV	CMV	HHV6	PB19	MP	CP	Bor	CD3	CD68	HLA	ICAM	Vírus	Bact
HAS	P	N	N	N	P	P	N	N	3,17	14,13	0,02	1,94	ADV+PB19	MP
Muco	P	N	N	N	P	N	N	N	22,08	65,74	1,78	0,82	ADV+PB19	0
Taqui	P	N	N	P	P	N	N	N	5,8	36,5	1,23	5,600	ADV+HHV6+PB19	0
NC	N	N	N	nr	P	N	N	N	10,64	17,08	0,19	7,315	PB19	0
Alc	N	N	N	P	nr	P	N	N	9,42	25,37	0,38	0,603	HHV6	MP
Valv	N	N	P	P	N	P	N	N	4,68	17,15	0,24	0,192	CMV+HHV6	MP
QT	P	N	N	P	N	P	N	N	6,85	22,98	5,75	0,84	ADV+HHV6	MP
NC	P	N	N	P	N	N	N	N	17,15	14,15	2,09	0,55	ADV+HHV6	0

OU: outras etiologias; HAS: hipertensiva; Muco: mucopolissacaridose; Taqui: taquicardiomiopatia; NC: miocárdio não-compactado; Alc: alcoólica; Valv: valvar; QT: pós-quimioterapia; ADV: adenovírus; EBV: Epstein-Barr vírus; CMV: citomegalovírus; HHV6: herpes vírus 6; PB19: parvovírus B19; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; CP: *Chlamydia pneumoniae*; Bor: Borrelia; Bact: bactérias; N: negativo; P: positivo; nr: não realizado



## Outras Miocardiopatias n=8 Genoma Viral

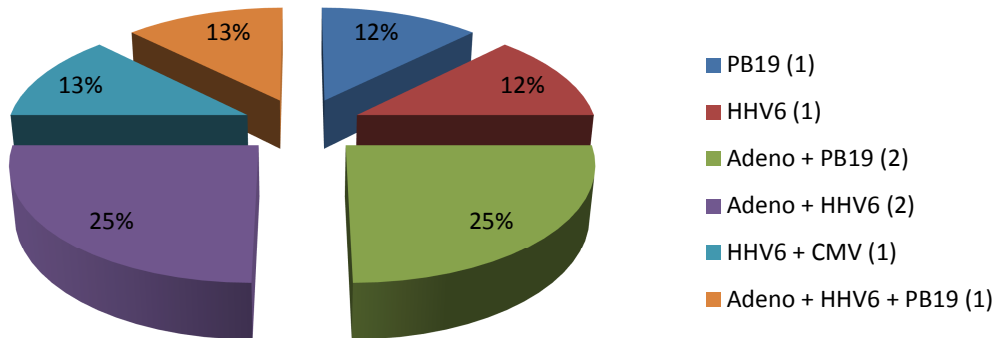


Gráfico 16. Genoma Viral: Outras Miocardiopatias

## Outras Miocardiopatias n=8 Genoma Bacteriano

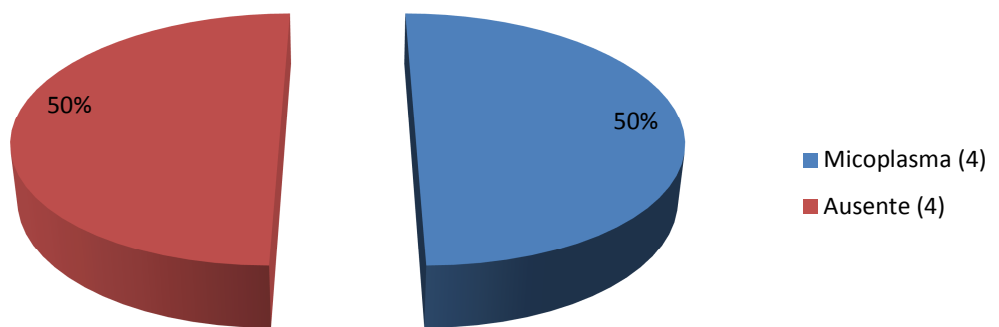


Gráfico 17. Genoma Bacteriano: Outras miocardiopatias

### 5.5.6 Doadores x Miocardiopatia Dilatada: Microorganismos

Na comparação entre doadores e miocardiopatas, em relação aos agentes infecciosos estudados por biologia molecular, houve um predomínio de adenovírus e HHV6 nos doadores (tabela 35). Quando comparados os doadores com cada etiologia específica se manteve a significância para o HHV6, o mesmo não ocorrendo para o adenovírus (tabela 36).

**Tabela 35.**  
**Pesquisa de Vírus e Bactérias por Biologia Molecular**

	<b>Doadores (27)</b>	<b>Miocardiopatia (53)</b>	<b>p</b>
ADV n(%)	20 (83,3)	27 (58,7)	0,035
EBV n(%)	6 (33,3)	12 (25,5)	0,84
CMV n(%)	0	2 (4,3)	0,53
HHV6 n(%)	22 (86,4)	24 (49)	0,0015
PB19 n(%)	23 (92)	33 (75)	0,11

ADV: adenovírus; EBV: Epstein-Barr vírus; CMV: citomegalovírus; HHV6: herpes vírus 6; PB19: parvovírus B19

	<b>Doadores (27)</b>	<b>Miocardiopatia (50)</b>	<b>p</b>
MP n (%)	5 (20,8)	20 (46,5)	0,12
CP n (%)	1 (4,2)	6 (14)	0,41
Bor n (%)	0	1 (2,3)	1

MP: *Mycoplasma pneumoniae*; CP: *Chlamydia pneumoniae*; Bor: *Borrelia*

**Tabela 36.**  
**Pesquisa de Vírus e Bactérias: doadores e miocardiopatias**

	<b>DO (27)</b>	<b>ID (31)</b>	<b>CH (8)</b>	<b>IS (6)</b>	<b>OU (8)</b>	<b>p</b>
ADV n (%)	20 (83,3)	15 (51,7)	3 (55,5)	4 (66,7)	5 (62,5)	0,21
EBV n (%)	6 (33,3)	10 (33,3)	2 (40)	0	0	0,17
CMV n (%)	0	0	1 (20)	1 (16,7)	1 (12,5)	*
HHV6 n (%)	22 (86,4)	9 (30)	6 (75)	4 (66,7)	5 (71,4)	0,0008
PB19 n (%)	23 (92)	23 (95,8)	4 (57,1)	3 (50)	4 (57,1)	*

DO: doador; ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras etiologias; ADV: adenovírus; EBV: Epstein-Barr vírus; CMV: citomegalovírus; HHV6: herpes vírus 6; PB19: parvovírus B19

\* Análise estatística inválida devido ao número reduzido de casos e impossibilidade de realização do teste exato de Fischer comparando múltiplas situações

	DO (27)	ID (31)	CH (5)	IS (6)	OU (8)	p
MP n (%)	5 (20,8)	11 (37,9)	1 (20)	4 (66,7)	4 (50)	0,19
CP n (%)	1 (4,2)	5 (17,2)	1 (20)	0	0	*
Bor n (%)	0	1 (3,3)	0	0	0	*

DO: doador; ID: idiopática; CH: chagásica; IS: isquêmica; OU: outras etiologias; MP: *Mycoplasma pneumoniae*; CP: *Chlamydia pneumoniae*; Bor: Borrelia

\* Análise estatística inválida devido ao número reduzido de casos e impossibilidade de realização do teste exato de Fischer comparando múltiplas situações

### 5.5.7 Inflamação x Microorganismos por Biologia Molecular

Não houve correlação entre o número de microorganismos encontrados e o desenvolvimento de inflamação quer seja por celularidade, expressão de HLA ou ICAM (tabela 37).

**Tabela 37.**  
**Inflamação x Número de Microorganismos**

Doadores	Ausente	1 agente (4)	2 agentes (6)	3 ou mais (17)	p
CD3 (céls/mm <sup>2</sup> )	0	1,82 (0,57 – 12,3)	1,94 (0,6 – 7,7)	6,3 (2,5 – 8,7)	0,21
CD68 (céls/mm <sup>2</sup> )	0	22,2 (6,16 – 92)	26 (15,7 – 40,6)	27,8 (11,5 – 32,1)	0,88
HLA (% área)	0	1,1 (0,6 – 2,4)	0,74 (0,6 – 1,8)	1,35 (0,73 – 3,1)	0,66
ICAM (% área)	0	1,11 (0,7– 1,8)	1,57 (1 – 6,8)	1,49 (0,47 – 4,9)	0,68

Mioc Idiopática	Ausente (2)	1 agente (3)	2 agentes (13)	3 ou mais (12)	p
CD3 (céls/mm <sup>2</sup> )	6,95 (4,7 – 9,2)	9,6 (2,97 – 18,2)	5,2 (3,7 – 10,7)	8,95 (6,34 – 23,6)	0,37
CD68 (céls/mm <sup>2</sup> )	13,7 (3,8 – 23,6)	20,8 (15,8 – 21,8)	13,9 (10,2– 19,2)	21,9 (13,4 – 29,2)	0,16
HLA (% área)	0,79 (0,4 – 1,14)	0,94 (0,09 – 3,12)	0,95 (0,27 – 1,23)	0,68 (0,21 – 1,15)	0,97
ICAM (% área)	2,1	3,94 (1,46 – 6,43)	1,96 (0,91 – 2,19)	0,66 (0,52 – 3)	0,53

Mioc Chagásica	Ausente (0)	1 agente (1)	2 agentes (5)	3 ou mais (2)	p
CD3 (céls/mm <sup>2</sup> )	0	nr	78,2 (39,2 – 213,3)	66,9 (56,9 – 76,9)	
CD68 (céls/mm <sup>2</sup> )	0	104,1	74,8 (42,6 – 80,8)	44,1 (33,6 – 54,6)	
HLA (% área)	0	12,74	3,82 (2,21 – 8,6)	2,2 (1 – 3,4)	
ICAM (% área)	0	0,72	3,4 (1,67 – 7,1)	3,2 (0,95 – 5,5)	

Análise estatística impossibilitada pelo número reduzido de casos sem agentes, com 1 agente e 3 ou mais agentes

Mioc Isquêmica	Ausente (0)	1 agente (1)	2 agentes (1)	3 ou mais (4)	p
CD3 (céls/mm <sup>2</sup> )	0	3,64	16,8	18,9 (4,3 – 43,7)	
CD68 (céls/mm <sup>2</sup> )	0	nr	5,8	39,7 (25,8 – 48,6)	
HLA (% área)	0	0,95	1,08	0,87 (0,18 – 1,48)	
ICAM (% área)	0	1,38	0,19	0,75 (0,65 – 0,86)	

Análise estatística impossibilitada pelo número reduzido de casos sem agentes, com 1 agente e 2 agentes

Outras Etiologias	Ausente (0)	1 agente (1)	2 agentes (3)	3 ou mais (4)	p
CD3 (céls/mm <sup>2</sup> )	0	10,64	17,1 (9,4 – 22,1)	5,2 (3,5 – 6,6)	
CD68 (céls/mm <sup>2</sup> )	0	17,1	25,4 (14,1 – 65,7)	20,1 (14,9 – 33,1)	
HLA (% área)	0	0,19	1,78 (0,38 – 2,1)	0,74 (0,08 – 4,6)	
ICAM (% área)	0	7,3	0,6 (0,55 – 0,82)	1,4 (0,3 – 4,7)	

Análise estatística impossibilitada pelo número reduzido de casos sem agentes, com 1 agente e 2 agentes.

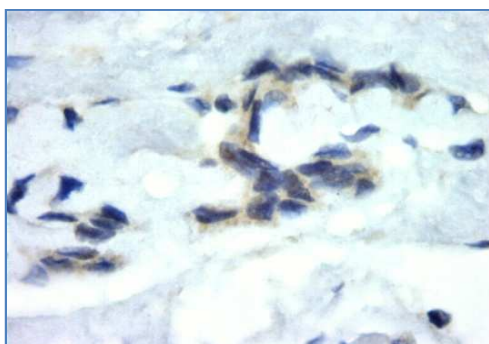
### 5.6 Pesquisa de PB19 por Hibridização *in situ*

De maneira preliminar, alguns casos com positividade elevada para PB19 pela imunohistoquímica foram estudados por hibridização *in situ*. Conforme observado nas figuras abaixo, houve positividade na mesma localização e intensidade através das 2 técnicas (fotos 12 e 13).

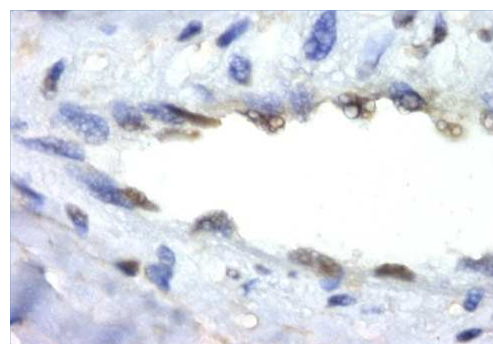
#### Fotos 12 e 13

#### Imunohistoquímica e Hibridização *in situ* PB19 em Mioc. idiopática

12



13



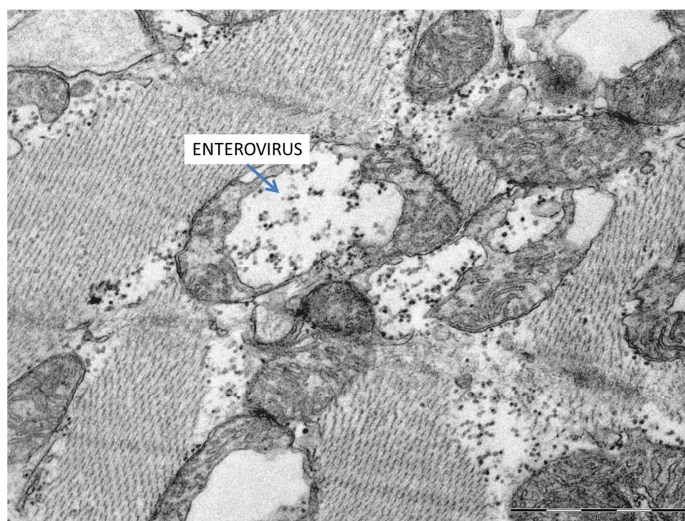
Fotomicrografias de imunohistoquímica (12) e hibridização *in situ* (13) para PB19 em fragmento de biópsia endomiocárdica de caso de miocardiopatia idiopática (100x). Positividade em endotélio.

## 5.7 Pesquisa de Microorganismos por Microscopia Eletrônica

De maneira preliminar, alguns casos com grande expressão de antígenos de microorganismos por imunohistoquímica foram avaliados por microscopia eletrônica.

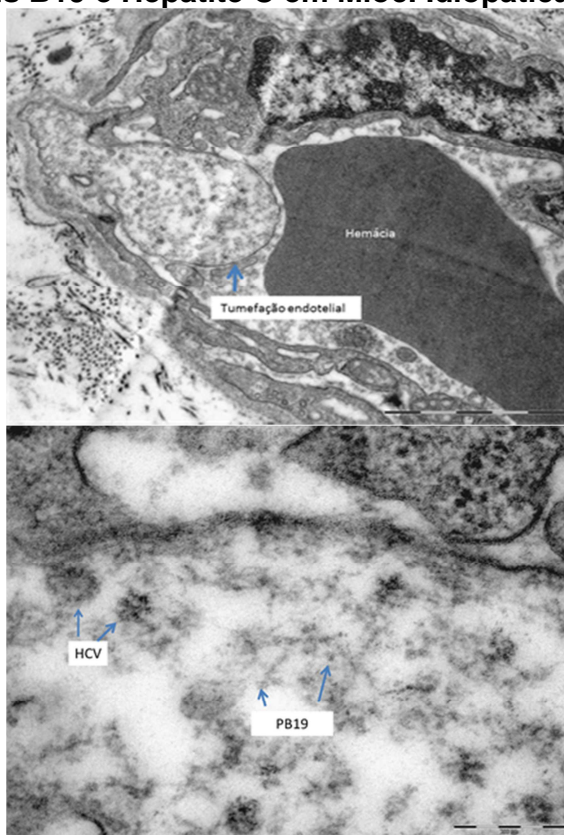
Com base nestas análises iniciais, o achado de estruturas virais favorece a correlação com os dados de imunohistoquímica, conforme imagens abaixo, evidenciando morfologias que podem ser consideradas enterovírus em 1 caso de doador e em casos de miocardiopatia dilatada idiopática PB19, Hepatite C, Hepatite B, HHV6 e borrelia.

### Foto 14. Enterovírus em Doador



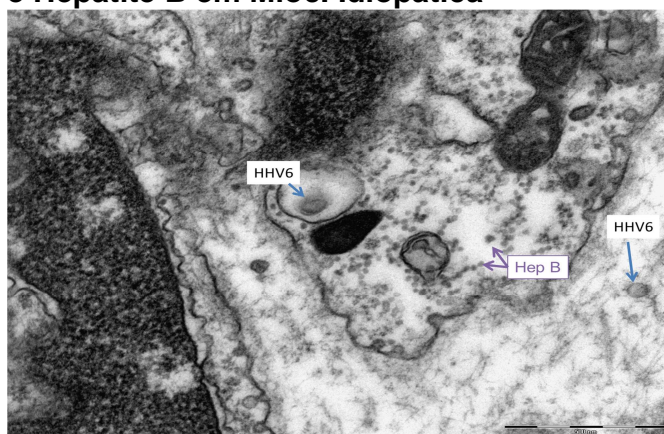
Aspecto ultraestrutural de miocárdio de doador com numerosas partículas sugestivas de enterovírus no citoplasma e interior de mitocôndrias. À imunohistoquímica havia grande positividade para enterovírus.

### Foto 15. Parvovirus B19 e Hepatite C em Mioc. Idiopática



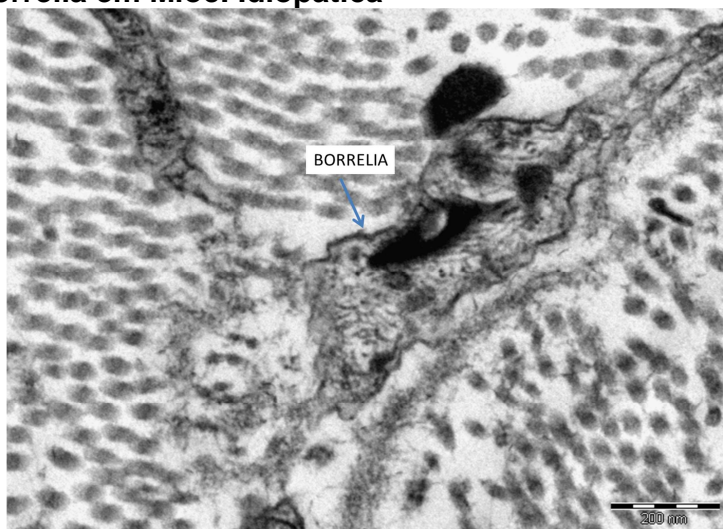
Ultraestrutura de miocárdio de paciente com Miocardiopatia Dilatada Idiopática exibindo tumefação da célula endotelial (acima). Grande aumento dessa região, no quadro inferior, revela numerosas partículas sugestivas de PB19 e Hepatite C. O caso mostrou alta positividade para antígenos destes agentes.

### Foto 16. HHV6 e Hepatite B em Mioc. Idiopática



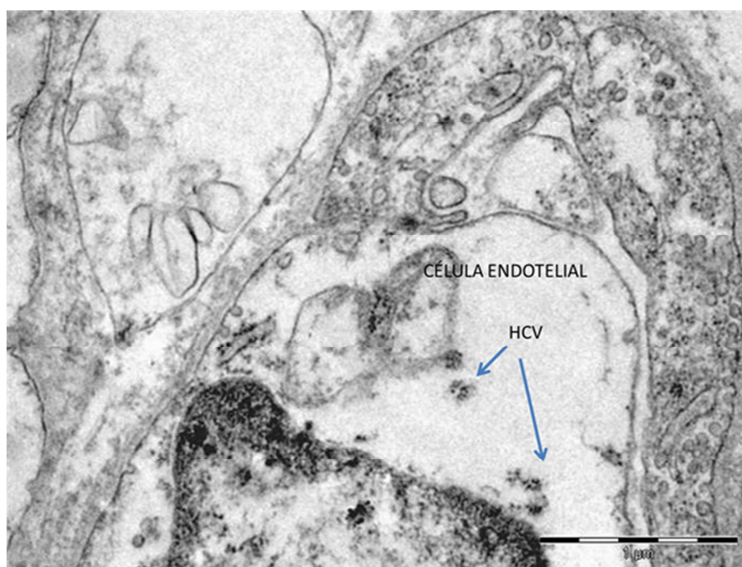
Caso de Miocardiopatia Dilatada Idiopática com alta positividade de antígenos HHV6 e Hepatite B. O aspecto ultraestrutural mostra alta positividade de partículas compatíveis com esses vírus em células endoteliais (foto) e na fibra cardíaca.

### Foto 17. Borrelia em Mioc. Idiopática



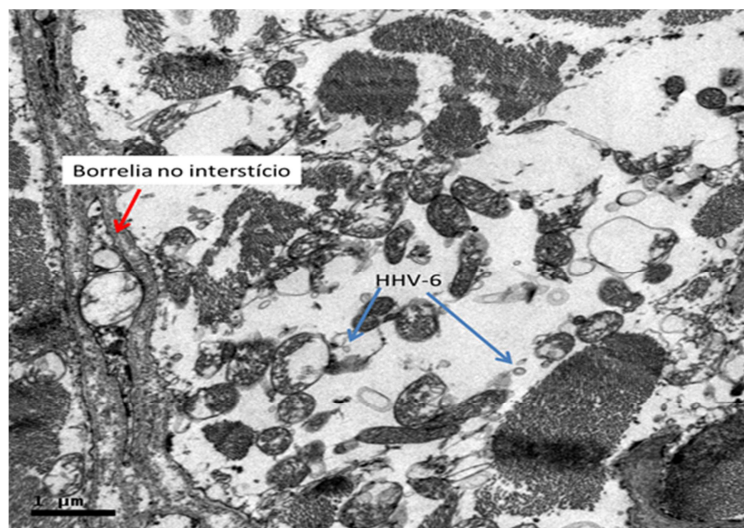
Caso de Miocardiopatia Dilatada Idiopática com alta positividade para antígenos de *Borrelia burgdorferi*. A microscopia eletrônica confirmou a presença de estruturas onduladas contendo filamentos, sugestivas de borrelia, no interstício.

### Foto 18. Hepatite C em Mioc. Chagásica



Caso de paciente com Miocardiopatia Chagásica e alta positividade de antígenos HCV. O aspecto ultraestrutural mostra alta positividade de partículas compatíveis com esse vírus em células endoteliais (foto) e na fibra cardíaca.

### Foto 19. HHV6 e Borrelia em Mioc. Chagásica



Miocárdio de chagásico revelando partículas virais no interior de mitocôndrias com cristólise e entre miofilamentos, em áreas de miocitólise, e forma fusiforme sugestiva de borrelia no interstício.



## ***Discussão***

## 6. Discussão

Que seja do nosso conhecimento, este estudo é pioneiro ao demonstrar em fragmentos de biopsia endomiocárdica a presença de vírus em miocardiopatia chagásica e aumento da expressão de HLA de classe II, ICAM-I e do número de macrófagos em doadores, tal como nas miocardiopatias. Também encontramos maior celularidade inflamatória na doença de Chagas e elevada frequência de agentes infecciosos nos doadores e nas diferentes miocardiopatias, utilizando diferentes técnicas de detecção de microorganismos.

### 6.1 Vírus na Miocardiopatia Chagásica

Nosso estudo demonstrou, de maneira inédita, a presença de vírus no tecido miocárdico de pacientes com miocardiopatia chagásica.

Na literatura, em relação à presença de microorganismos no tecido miocárdico de chagásicos, apenas estudo nacional de Higuchi havia demonstrado a presença de bactérias<sup>121</sup>. Comparando chagásicos na forma indeterminada e na forma de miocardiopatia, Higuchi demonstrou a presença de antígenos de micoplasma e clamídia no tecido cardíaco, em maior quantidade nos pacientes da forma indeterminada em comparação aos miocardiopatas, e aventou uma hipótese de simbiose entre microorganismos que poderia ser protetora ou mesmo patogênica, dependendo da evolução de suas próprias interações, bem como com outros microorganismos (arquéia) e o sistema imune<sup>121</sup>. Mais recentemente, Corrêa demonstrou uma associação entre a presença de genoma da bactéria *Bartonella spp* no sangue e a miocardiopatia chagásica<sup>122</sup>. A presença de vírus no tecido miocárdico não havia sido descrita na miocardiopatia chagásica, porém o mesmo raciocínio proposto acima poderia ser aplicado aos vírus.

Evidências sugerem que as interações entre microorganismos e entre o hospedeiro e microorganismos podem ser muito mais complexas<sup>123,124,125</sup>. Mutações simples do genoma de uma espécie podem promover adaptação à outra espécie estabilizando a relação entre elas, provocando alterações na natureza simbiótica e afetando a função do meio em que estão inseridas<sup>126</sup>. As mitocôndrias, por exemplo, são endosimbiontes evolutivamente relacionados às bactérias e recentemente, demonstrou-se que DNA mitocondrial não fagocitado causa

inflamação no tecido cardíaco<sup>127</sup>. Na pele, nas mucosas e no sistema digestivo a presença e interação de microorganismos, em contato com o sistema imune, mantém o equilíbrio do ecossistema, controlando o desenvolvimento de infecções<sup>128</sup>.

De uma maneira geral, em nossa casuística, a expressão de antígenos virais, por imunohistoquímica, foi menor nos chagásicos em relação às outras miocardiopatias (havendo significância para HHV6 e HBs, tendência para PB19 e enterovírus), com exceção ao vírus da hepatite C (em que houve semelhança em relação aos idiopáticos). Pela biologia molecular, para os microorganismos estudados, houve predomínio de adenovírus e HHV6 nos doadores em relação aos idiopáticos, sendo o HHV6 o microorganismo mais frequente nos chagásicos. Além de questões técnicas inerentes aos métodos, como justificativa para esta diferença de resultados, podemos considerar que foram utilizados fragmentos distintos para a imunohistoquímica e para biologia molecular<sup>90</sup>.

A alta prevalência de agentes infecciosos em nosso estudo, de maneira indistinta, nos diferentes grupos, pode sugerir que os microorganismos não tenham papel preponderante no desenvolvimento das miocardiopatias e que seriam apenas “observadores” não patogênicos, no entanto, utilizando como base os achados de imunohistoquímica aliados ao raciocínio proposto por Higuchi, a diminuição ou aumento de diferentes microorganismos no tecido miocárdico poderia denotar um desequilíbrio do ecossistema, sendo assim, um possível gatilho para o desenvolvimento da miocardiopatia chagásica e da mesma forma, de outras miocardiopatias.

A aplicação deste conceito de simbiose entre agentes e o hospedeiro na miocardiopatia dilatada, em especial na doença de Chagas, abre uma grande perspectiva de pesquisa.

## **6.2 Inflamação nos Doadores**

Nosso estudo, de forma inédita na literatura, realizou análise quantitativa de células inflamatórias, HLA de classe II e ICAM-I no tecido miocárdico de doadores e demonstrou um padrão inflamatório semelhante aos miocardiopatas, exceto pela menor intensidade do infiltrado de linfócitos.

Estudos histológicos de doadores são escassos e descreveram a presença de apoptose, necrose em bandas de contração e pequenos infiltrados inflamatórios de padrão mononuclear, incluindo linfócitos e macrófagos<sup>129,130,131</sup>. Donoso-Mantke<sup>76</sup> observou em alguns doadores infiltrados celulares de linfócitos e macrófagos mais expressivos. Entretanto, diferentemente do nosso estudo, a análise de celularidade foi sempre realizada de maneira qualitativa.

A hipótese mais aceita para o achado de inflamação no tecido miocárdico de doadores é a lesão induzida pela morte encefálica. Esta situação clínica é responsável por uma série de alterações neuro-endócrinas e hemodinâmicas, especialmente, através da ativação intensa do sistema simpático<sup>132</sup>. A tempestade adrenérgica, também descrita em outras situações como miocardiopatia de Tako-Tsubo, feocromocitoma e uso de agentes simpatomiméticos pode levar à lesão miocárdica, incluindo a infiltração de células inflamatórias, podendo comprometer a função do coração tanto antes como após o transplante<sup>132</sup>. Alternativamente, a presença de microorganismos poderia ser outro fator para geração de inflamação, conforme demonstrado por Donoso-Mantke<sup>76</sup>, no entanto, em nosso estudo, como demonstrado por Kühl<sup>34</sup> e Kindermman<sup>39</sup>, a presença de microorganismos pode não ter correlação com inflamação.

Outra questão que merece ser debatida é a divergência entre o infiltrado de linfócitos e macrófagos nos doadores em relação aos miocardiopatas, conforme demonstrado pela correlação limítrofe entre as células. Além do possível mecanismo inerente da morte encefálica, caracterizada pelo predomínio de macrófagos em relação aos linfócitos, o curto espaço de tempo entre a morte encefálica e o processo de doação poderia ser uma justificativa, uma vez que não haveria tempo para uma resposta imune mais específica, caracterizada pelo infiltrado linfocitário. Além disso, os protocolos de cuidado de potenciais doadores com morte encefálica contemplam o uso de corticosteróides em doses elevadas<sup>133</sup>, o que também poderia influenciar na intensidade do infiltrado linfocitário dos doadores.

Em relação à expressão de HLA e moléculas de adesão, em alguns estudos em transplante renal e hepático, a comparação entre doadores vivos e falecidos revelou um aumento na expressão de HLA e moléculas de adesão nestes tecidos,

nos doadores falecidos<sup>134,135,136</sup>, evidenciando o papel da morte encefálica na ativação inflamatória dos doadores de múltiplos órgãos<sup>131</sup>. Estudo em doadores de coração demonstrou aumento da expressão de DR7, um determinante polimórfico do *locus* de classe II DR, em tecido cardíaco de doadores e no seguimento pós-transplante cardíaco<sup>137</sup>. Outro estudo demonstrou uma menor expressão de ICAM nos doadores, em comparação aos fragmentos de biopsias de seguimento pós-transplante cardíaco<sup>138</sup>.

Na literatura, o aumento na expressão de HLA e moléculas de adesão no tecido miocárdico foram demonstrados em diferentes situações como na miocardiopatia dilatada idiopática<sup>49,108</sup>, pós-transplante cardíaco<sup>138,139</sup>, miocardiopatia isquêmica<sup>140</sup> e chagásica<sup>99,141</sup>. O interessante em nossa casuística é que os doadores apresentaram perfil semelhante de expressão de HLA e moléculas de adesão em relação aos miocardiopatas.

Apesar de não ter havido em nosso estudo uma correlação entre a celularidade e a expressão de HLA e moléculas de adesão, como demonstrado por Kühl<sup>54</sup> e Noutsias<sup>47</sup>, a presença destes marcadores, de maneira difusa e em todas as populações, sugere que existe inflamação nos doadores e miocardiopatas desta casuística, independentemente da etiologia, a despeito da ausência de infiltrado linfocitário ou de macrófagos. A análise quantitativa por nós empregada e a questão geográfica podem justificar as diferenças de resultado em relação à literatura.

Como implicação clínica, os linfócitos são células importantes na imunidade adquirida, já os macrófagos tanto na resposta imune inata quanto no desenvolvimento da imunidade adquirida e, no caso dos corações doados<sup>142,143</sup>, ambas as células podem estar relacionadas ao desenvolvimento de eventos no pós-transplante como a disfunção do enxerto<sup>132</sup>, rejeição celular<sup>144</sup>, humoral<sup>145</sup> e doença vascular do enxerto<sup>146</sup>. Da mesma forma, a expressão de moléculas de adesão e HLA podem estar associadas ao desenvolvimento de rejeição<sup>138,139,147</sup> e doença vascular do enxerto<sup>148</sup>.

No Brasil, os resultados do transplante cardíaco são inferiores na comparação com os dados do registro internacional, e dentre as causas aventadas estão aspectos relacionados ao doador<sup>149</sup>. Estes achados de infiltração de

macrófagos, expressão de HLA e ICAM devem ser estudados de maneira mais aprofundada, em especial sobre os desfechos no seguimento pós-transplante cardíaco.

### **6.3- Celularidade inflamatória na doença de Chagas e diferentes miocardiopatias**

Na doença de Chagas é bem estabelecido que a intensidade da inflamação está relacionada ao desenvolvimento da miocardiopatia<sup>150,151,152</sup>. Em nosso estudo, quando analisamos a celularidade inflamatória das diferentes etiologias, a intensidade do infiltrado foi muito maior nos chagásicos, confirmando a natureza altamente inflamatória desta miocardiopatia<sup>153</sup> e justificando, do ponto de vista histopatológico, a razão para que seja a etiologia de pior prognóstico<sup>2</sup>.

Quando analisamos nossos dados em relação à literatura, observamos que a prevalência de inflamação celular nos idiopáticos foi semelhante ao estudo nacional de Montera<sup>105</sup>, porém superior aos achados internacionais. Em estudo de miocardiopatia dilatada idiopática crônica, Kühl<sup>34</sup> demonstrou a presença de inflamação por linfócitos T em 8% e por macrófagos em 13% dos casos (acima de 7 céls/mm<sup>2</sup>). Kindermman<sup>39</sup>, estudando pacientes com suspeita de miocardite, observou a presença de inflamação por linfócitos T e macrófagos em 50% dos casos (acima de 14 céls/mm<sup>2</sup>). Questões geográficas e o momento evolutivo da avaliação podem justificar as diferenças de resultados.

Apesar da ausência de significância estatística em comparação aos doadores, na nossa casuística, as etiologias consideradas primariamente não-inflamatórias como isquêmica e o grupo de outras etiologias (mucopolissacaridose, hipertensiva, miocárdio não-compactado, taquicardiomiopatia, valvar, alcoólica, pós-quimioterapia) também chamaram atenção pela presença de linfócitos e macrófagos. Como justificativas para este achado, podemos considerar o momento evolutivo da IC desta população, a maioria em uso de drogas vasoativas<sup>154</sup> e a associação de inflamação piorando a evolução da etiologia específica. Frangogiannis demonstrou a presença de inflamação no miocárdio hibernado<sup>155</sup>, já Frustaci descreveu a presença de miocardite em número expressivo de pacientes

com doença coronária grave e disfunção biventricular<sup>156</sup> e também em pacientes com miocardiopatia secundária à hipertensão arterial sistêmica<sup>157</sup>.

## **6.4 Elevada frequência de microorganismos nos doadores e nas miocardiopatias**

### **6.4.1 Parvovírus B19**

Em nossa casuística, a positividade de genoma de PB19 foi expressiva em todos os grupos.

Estudo de Schenck demonstrou a presença de genoma de PB19 em tecido cardíaco em mais de 90% dos casos com sorologia positiva<sup>80</sup>. Em nosso estudo, não foram pesquisadas sorologias, mas na literatura, inclusive nacional, a positividade sorológica para PB19 é elevada<sup>73</sup>.

Da mesma forma que na biologia molecular, a presença de antígenos de PB19 no tecido, por imunohistoquímica, foi também expressiva, sem diferença entre os grupos. Escher demonstrou uma positividade de PB19 de 80% por imunohistoquímica, tendo como padrão-ouro a biologia molecular<sup>93</sup>.

O mecanismo de lesão cardíaca induzida por este microorganismo ainda é incerto e parece ter relação com o sistema hematopoiético e sua entrada no tecido cardíaco pelas células endoteliais. Após a infecção primária, seu DNA persiste nos tecidos como uma molécula intacta sem mutações e com um mecanismo de armazenamento com capacidade de longa persistência<sup>158</sup>. Em nossa casuística a positividade de antígenos deste microorganismo ocorreu nas células endoteliais, inflamatórias e também nas fibras cardíacas.

A presença do PB19 de forma indistinta nos diferentes grupos parece tornar improvável sua relação com o desenvolvimento de miocardiopatia em nossa casuística, porém a complexidade desta questão parece maior e é motivo de debate. Dennert demonstrou que a quantificação de cópias do PB19 pode trazer uma luz para esta discussão. Grupo de pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e maior número de cópias de PB19, em comparação a grupo controle sem cardiopatia e número menor de cópias, apresentou melhora de função ventricular com o uso de imunoglobulina<sup>94</sup>. Em outro estudo de pacientes com miocardiopatia relacionada a doenças inflamatórias o número de cópias de PB19

foi menor, em comparação aos indivíduos com miocardiopatia dilatada idiopática<sup>159</sup>. Já Moimas não observou esta diferença no número de cópias em miocardiopatas e grupo controle<sup>160</sup>. De maneira inicial, a técnica de hibridização *in situ* confirmou os achados de imunohistoquímica e a microscopia eletrônica também demonstrou a presença de estruturas virais sugestivas de PB19.

Mais estudos são necessários para que se estabeleça o real papel deste agente no desenvolvimento de miocardiopatia.

#### **6.4.2 Enterovírus**

Com base em nossos achados de imunohistoquímica a relação entre o desenvolvimento de miocardiopatia e a presença de enterovírus não se mostra evidente. Na literatura, entretanto, encontramos algumas divergências em relação aos nossos dados. Andréoletti realizou vários estudos envolvendo a pesquisa de enterovírus em miocardiopatias incluindo análise por imunohistoquímica e também biologia molecular. Na maior casuística incluindo miocardiopatia dilatada idiopática, miocardiopatia isquêmica e doadores de transplante cardíaco sem evidência de cardiopatia<sup>161</sup>, diferentemente do encontrado em nosso estudo, nenhum doador apresentou positividade para antígeno de enterovírus; em 35,7% dos idiopáticos e 32,8% dos isquêmicos havia evidência de enterovírus por imunohistoquímica ou biologia molecular. Em outro estudo, que avaliou corações doados para transplante e o seguimento pós-transplante cardíaco<sup>162</sup>, também em dissonância aos nossos achados, não observou positividade de enterovírus em nenhum doador utilizado. Li<sup>92</sup> e Zhang<sup>91</sup> demonstraram, por imunohistoquímica, a presença de enterovírus no miocárdio de pacientes com miocardite e miocardiopatia dilatada idopática. No primeiro, não houve positividade no grupo controle, constituído de falecidos por trauma, contra 75% de positividade para enterovírus nos idiopáticos e 81,8% na miocardite; no segundo estudo, 8,1% dos doadores de transplante apresentaram positividade para o antígeno de enterovírus no miocárdio contra 52,8% dos pacientes com miocardite ou miocardiopatia dilatada idiopática.

Diferenças técnicas, geográficas e temporais podem justificar os achados conflitantes em relação à literatura<sup>163,164</sup>. Em nossa casuística a avaliação por imunohistoquímica não envolveu um grupo controle com tecido miocárdico



sabidamente negativo, foi realizada de maneira quantitativa, estudou uma série de microorganismos e não se buscou a determinação de positividade em nível individual, mas sim a comparação entre os doadores e as diferentes miocardiopatias. Estudo de Klingel reportou reação cruzada inespecífica, em células miocárdicas, do anticorpo utilizado em nosso estudo em um caso de miocardiopatia dilatada<sup>165</sup>. No entanto, em nossa casuística, apesar de termos apresentado em cada grupo um valor de mediana de expressão de antígenos para enterovírus, ocorreu uma grande variação interquartil, reforçando assim a especificidade do anticorpo.

Por questões técnicas relacionadas à limitação de amostras e dificuldade para padronização da pesquisa por biologia molecular de vírus de RNA, não foi possível a pesquisa por PCR de enterovírus em nossa casuística. No entanto, a análise inicial pela microscopia eletrônica parece corroborar os achados de imunohistoquímica.

Os enterovírus constituem um gênero da família picornavírus com grande variabilidade genética, incluindo 10 espécies diferentes e mais de 250 sorotipos. Assim, apesar da mesma raiz genômica, apresentam enorme diversidade fenotípica e dessa forma, cepas com diferentes capacidades patogênicas<sup>166</sup>.

Para justificar a presença de enterovírus em grande quantidade nos doadores, o estresse hemodinâmico e metabólico gerado pela morte encefálica poderia favorecer uma alteração na homeostase do sistema digestivo culminando em translocação de microorganismos<sup>167,168</sup>.

O impacto deste achado sobre os doadores deve ser estudado com mais profundidade, levando-se em consideração a evolução após transplante.

#### **6.4.3 Hepatites B e C**

A maior frequência de antígenos de hepatite C e de superfície de hepatite B nos miocardiopatas, em especial nos idiopáticos em relação aos doadores, suscita a possibilidade de uma relação causal entre estes microorganismos e a miocardiopatia dilatada idiopática nesta população. Na literatura, Frustaci demonstrou a presença de antígenos de hepatite C no tecido miocárdico em uma série de 3 pacientes com sorologia positiva e IC<sup>169</sup>. Matsumori, em alguns estudos

na população japonesa<sup>170,171,172</sup>, demonstrou uma maior frequência de vírus da hepatite C em pacientes com miocardiopatia dilatada e cardiomiopatia hipertrófica, porém, outra casuística não obteve o mesmo resultado<sup>173</sup>, sugerindo assim a possibilidade de uma influência geográfica ou técnica para estes achados.

A pesquisa de hepatite B em miocardiopatias não é habitual. Entretanto, estudo de Rong<sup>174</sup> demonstrou a possibilidade de acometimento de tecidos extra-cardíacos, incluindo o coração, mediante células progenitoras infectadas com o vírus da hepatite B. Relato de caso de Ursell<sup>175</sup> demonstrou por imunohistoquímica a presença de antígeno de superfície de hepatite B em vasos intramiocárdicos em paciente que apresentou hepatite fulminante e faleceu em decorrência à infecção pelo vírus da hepatite B.

Em nossa casuística, apesar da presença de antígenos de vírus das hepatites B e C no miocárdio, em nenhum dos casos havia sorologia positiva para estas hepatites. Estudo de Mahfoud<sup>176</sup> demonstrou uma baixa sensibilidade das sorologias virais tendo como padrão-ouro a pesquisa destes agentes por biologia molecular no tecido miocárdico, porém, neste estudo não foram pesquisadas hepatites. Como não utilizamos grupo controle sabidamente negativo não se pode afastar a possibilidade de reações falso-positivas. No entanto, os achados preliminares de microscopia eletrônica demonstram a presença de estruturas virais que podem ser compatíveis com as informações obtidas pela imunohistoquímica.

Por questões técnicas relacionadas à limitação de amostras e dificuldade para padronização da pesquisa por biologia molecular de vírus de RNA (hepatite C), não foi possível a pesquisa por PCR de hepatite B e C em nossa casuística.

#### **6.4.4 - Borrelia**

O achado de maior expressão de antígeno de borrelia nos idiopáticos em relação aos doadores abre um questionamento sobre a possibilidade do envolvimento deste microorganismo na patogênese da miocardiopatia idiopática em nossa casuística. Apenas Bartunek demonstrou, em um caso na literatura, a presença de antígeno de borrelia em tecido miocárdico<sup>177</sup>. Mesmo por biologia molecular as informações na literatura são escassas. Palecek em uma série de 39 casos de miocardiopatia dilatada idiopática, na República Tcheca, observou a

presença de genoma de borrelia em 8 deles, não havendo correlação com sorologia e ocorreu melhora da função ventricular com antibioticoterapia<sup>84</sup>. Leeuw<sup>178</sup> estudou uma série de parasitas e bactérias como agentes potencialmente envolvidos no desenvolvimento de miocardiopatia dilatada, incluindo borrelia, porém não observou tais microorganismos no tecido miocárdico.

A doença de Lyme é uma zoonose frequente no hemisfério norte, transmitida por carrapatos e causada pela espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, porém, apesar deste microorganismo não ter sido demonstrado no Brasil, uma forma atípica e latente da espiroqueta produzindo sintomas semelhantes foi descrita por Yoshinari<sup>179,180</sup> e pode estar relacionada aos nossos resultados. Por biologia molecular, houve positividade para *Borrelia burgdorferi* em apenas 1 de nossos casos de miocardiopatia idiopática. Esta discrepância entre os achados de antígeno por imunohistoquímica e sequência gênica da bactéria por biologia molecular reforça a possibilidade de que sejam microorganismos geneticamente distintos com semelhanças estruturais. A análise inicial de microscopia eletrônica demonstrou a presença de estruturas sugestivas de borrelia, sugerindo a confirmação dos achados de imunohistoquímica.

#### **6.4.5 Clamídia e Micoplasma**

Em relação aos antígenos de clamídia e micoplasma não houve diferença entre doadores e miocardiopatas por ambas as técnicas. A presença destes agentes, no entanto, pode denotar outros aspectos mais complexos envolvendo microorganismos.

As clamídias são um grupo de patógenos intracelulares obrigatórios que se replicam em células eucariontes. Song<sup>85</sup>, por sorologia, descreveu a possibilidade de associação entre miocardiopatia dilatada idiopática e clamídia. Bachmaier, em estudo experimental com ratos, demonstrou haver uma semelhança genética entre uma proteína de membrana externa da clamídia com peptídeos da cadeia pesada da  $\alpha$ -miosina; a inoculação desta proteína de membrana da bactéria promove a produção de autoanticorpos dirigidos contra a cadeia pesada da  $\alpha$ -miosina levando à lesão miocárdica<sup>181</sup>. Wang, em estudo experimental, demonstrou a associação entre os diferentes tipos de clamídia e infecção miocárdica<sup>182</sup>.

Davydova<sup>90</sup> demonstrou por imunohistoquímica a presença de antígenos de clamídia no tecido miocárdico e sua boa correlação com sorologia, porém, ausência de correlação com a pesquisa por biologia molecular. Estudo grego recente, em pacientes com miocardite, descreveu a presença de genoma de clamídia no tecido miocárdico, por biologia molecular, em 23 de 50 pacientes estudados<sup>183</sup>.

Alguns relatos de casos sugerem a associação de micoplasma com o desenvolvimento de lesão miocárdica<sup>86,184</sup>. Os micoplasmas são um grupo de microorganismos com as menores dimensões que ainda mantém a capacidade de auto-replicação<sup>185</sup>. Em nossa casuística, apesar da ausência de significância estatística, nos isquêmicos e no conjunto das outras etiologias, houve positividade de micoplasma em pelo menos 50% dos casos, e em nenhum caso houve positividade para clamídia. Higuchi demonstrou a presença de clamídia e micoplasma no tecido miocárdico de chagásicos, conforme discussão prévia, e, além disso, descreveu a presença de ambas as bactérias em placas ateroscleróticas relacionadas à isquemia coronariana aguda<sup>186</sup>. O papel destes microorganismos nas miocardiopatias precisa ser estudado com mais profundidade.

#### **6.4.6 A relação causal entre a presença de microorganismos no tecido miocárdico e o desenvolvimento de miocardiopatia**

Em nossa casuística, o achado frequente de microorganismos nos doadores e nas diferentes miocardiopatias parece tornar improvável a relação causal entre a presença de microorganismo e o desenvolvimento de miocardiopatia.

Na literatura, diversos estudos corroboram este raciocínio. Donoso-Mantke descreveu a presença de genoma viral em 47% dos corações explantados de diferentes etiologias e em 60% dos doadores<sup>76</sup>. Analisando tecido cardíaco em autopsias de indivíduos sem miocardiopatia, Schenk observou a presença de genoma de PB19 em 46 de 48 casos com sorologia positiva para PB19 e em nenhum de 21 casos com sorologia negativa<sup>80</sup>. Moimas, em estudo recente com técnica de PCR *real time*, observou a presença de PB19 em 38% dos pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e 40% de pacientes cirúrgicos valvares e

isquêmicos<sup>160</sup>. Por outro lado, modelos animais e estudos clínicos sustentam esta associação. Aspectos técnicos, geográficos e temporais podem influenciar e reforçar as diferenças de resultados.

Em nossa casuística, a porcentagem de positividade para os agentes infecciosos no tecido miocárdico foi superior aos resultados da literatura. Pela técnica de biologia molecular a sensibilidade de detecção de genomas específicos é muito elevada e o percentual de falso-positividade pode variar entre 9 e 57%<sup>187</sup>. Envolve todo o processo de manipulação do material, incluindo reagentes, frascos, meios de conservação, ambiente da coleta e da manipulação do material, qualidade do controle positivo e negativo<sup>187</sup>. Em nossa casuística não foi utilizada técnica de *nested* PCR que pode reduzir a probabilidade de falso-positivo por aumentar a especificidade da reação<sup>188</sup>. No entanto, em consonância aos achados de biologia molecular, as análises por imunohistoquímica, hibridização *in situ* e microscopia eletrônica também demonstraram uma elevada frequência de microorganismos. Apesar de ter ocorrido diferença nos achados de um mesmo microorganismo por imunohistoquímica e biologia molecular, como no caso de adenovírus, a utilização de fragmentos distintos para cada método pode justificar esta diferença, já que a presença do microorganismo no tecido miocárdico pode ter caráter focal<sup>90</sup>. Além disso, as particularidades das técnicas também podem justificar esta discrepância. Uma vez que a sensibilidade da biologia molecular convencional é muito elevada, uma pequena quantidade do genoma do agente pode significar positividade, já pela imunohistoquímica, quanto maior a quantidade de proteína específica do agente, mais evidente a reação.

Em relação à questão geográfica, em estudo alemão de prevalência de agentes infecciosos, a positividade de genoma viral foi de 70% com predomínio de PB19 e HHV6<sup>34</sup>, em contrapartida, estudo norte-americano demonstrou genoma viral em 38% dos casos com predomínio de enterovírus e adenovírus<sup>36</sup>. No Brasil, o estudo de Montera, que não envolveu grupo controle sem evidência de cardiopatia, observou positividade de genoma viral em apenas 20% de 159 pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática (PB19 e adenovírus foram os mais frequentes)<sup>105</sup>; Em pediatria, Camargo encontrou positividade para CMV, *herpes simplex* I e II,

adenovírus e enterovírus em 40% dos casos, independentemente da presença de inflamação pelos critérios de Dallas<sup>104</sup>.

Estudo de Kühn<sup>58</sup> demonstrou que a persistência viral foi preponderante na evolução para miocardiopatia, já Kindermman<sup>39</sup> e Kuethe<sup>164</sup> demonstraram não haver valor prognóstico para a presença de microorganismos nos pacientes com disfunção miocárdica. Uma das diferenças entre os estudos, além do método, foi o momento da avaliação. No primeiro estudo a pesquisa incluiu pacientes com mais de 6 meses de história de IC, já nos outros os pacientes apresentavam menos tempo de história. Nossa casuística teve predominantemente pacientes acima de 6 meses de evolução, e boa parte em estágio final de IC e que inclusive foram transplantados, não sendo possível uma avaliação prognóstica da presença destes agentes infecciosos.

#### **6.4.7 Agentes infecciosos no miocárdio de doadores**

Da mesma forma que se pergunta sobre o real papel da presença de agentes infecciosos nos miocardiopatas, os achados de microorganismos no tecido miocárdico de doadores trazem à tona a discussão sobre o papel destes agentes na evolução pós-transplante cardíaco. Como referido anteriormente, no Brasil, os resultados do transplante cardíaco são inferiores em relação aos dados internacionais, e dentre as causas aventadas estão aspectos relacionados ao doador. O uso de imunossupressão no pós-transplante poderia favorecer a proliferação de microorganismos pré-existentes, comprometendo o enxerto na evolução.

Em nossa casuística, genoma viral de adenovírus, PB19 e HHV6 foram muito frequentes nos doadores, inclusive em associação. Houve diferença com significância estatística de HHV6 e adenovírus nos doadores em comparação aos miocardiopatas. Por imunohistoquímica, houve predomínio de enterovírus nos doadores.

Na literatura, em transplante cardíaco pediátrico, Shirali observou que a presença de genoma viral no tecido miocárdico do enxerto esteve relacionada a uma pior evolução em relação à disfunção e doença vascular, em especial, na presença de adenovírus<sup>189</sup>. PB19 como agente de miocardite pós-transplante

também foi descrito<sup>190</sup>. Estudo nacional de doadores de fígado demonstrou uma positividade de HHV6 no tecido hepático de 36,6%<sup>191</sup>; já em transplante renal uma positividade de HHV6 em sorologia de 54,8% com aumento de incidência de infecção por fungos e bactérias no seguimento pós-transplante. Este vírus é um cofator de outros microorganismos, especialmente em imunossuprimidos<sup>82</sup>. Em doadores de transplante cardíaco, a prevalência e o impacto da presença do HHV6 não foram descritos previamente.

Nossos achados iniciais necessitam estudos mais aprofundados, em especial no seguimento pós-transplante, para melhor esclarecimento do papel de agentes infecciosos no tecido miocárdico de doadores.

#### **6.4.8 Considerações sobre as técnicas de detecção de microorganismos**

Utilizamos 4 técnicas distintas para detecção de microorganismos em tecido miocárdico de doadores e de diferentes miocardiopatias. Dessa forma, agregando as vantagens e limitações de cada técnica, foi possível interpretar com mais profundidade as dificuldades existentes nesta área do conhecimento.

A imunohistoquímica, detectando a estrutura protéica dos microorganismos, tem a vantagem de tornar possível visualizar a localização e quantificação de antígenos no tecido. Tem a desvantagem de não ser tão específica, podendo apresentar reação cruzada com outras estruturas e *background*, sendo fundamental a utilização de controles positivos e negativos<sup>192</sup>. A hibridização *in situ* é mais específica e detecta a presença do genoma no tecido. No presente trabalho realizamos em casos de alta positividade de antígenos para PB19 a reação de hibridização *in situ* que mostrou positividade semelhante tanto em localização quanto em quantidade. Assim, com estes resultados preliminares sugerindo a confirmação da imunohistoquímica pela hibridização *in situ*, pretendemos no futuro a continuação desta pesquisa com novas sondas apropriadas para cada um dos microorganismos estudados pela imunohistoquímica, testando assim sua especificidade.

A técnica de biologia molecular, PCR convencional, detectando positividade ou negatividade de uma determinada sequência genômica de microorganismo, tem como vantagem a alta sensibilidade, porém não fornece quantidade de agentes,

que é possível apenas com a técnica de PCR *real time*. A maioria dos trabalhos da literatura para detecção de microorganismos na miocardiopatia dilatada tem utilizado a PCR convencional, que na área de agentes infecciosos pode não ser o melhor método. Muitas vezes, os microorganismos podem permanecer no hospedeiro por muito tempo, de forma quiescente, não sendo causadores de lesão tecidual e isto pode tornar o resultado conflitante, induzindo a erro de interpretação<sup>193,194</sup>. Nas hepatites virais e HIV o conhecimento da carga viral tem sido fundamental para o prognóstico da doença, determinando o grau de virulência, indicações e resposta ao tratamento<sup>195,196</sup>. No entanto, a padronização para o uso da PCR *real time* depende de um trabalho exaustivo de reconhecimento do *primer* exato para detecção e quantificação do tipo de microorganismo presente na lesão e que usualmente apresentam diferentes sequências genômicas, dependendo da cepa, como no caso dos enterovírus<sup>166</sup>.

A microscopia eletrônica foi o método que originou a descoberta dos vírus e faz parte da rotina diagnóstica de muitas doenças tipicamente virais. No entanto, existe uma limitação do método quando a quantidade de microorganismo é pequena, além disso, o tempo consumido tanto no preparo das amostras quanto na procura pelo observador de formas compatíveis com microorganismos, fez com que a técnica entrasse em desuso, sendo progressivamente substituída pela biologia molecular. Apesar disso, a microscopia eletrônica continua sendo padrão-ouro para detecção de grande quantidade de microorganismos, pois a presença dos mesmos não tem contestação de falso-positividade que os outros métodos podem apresentar. No presente trabalho, de maneira preliminar, utilizamos a microscopia eletrônica para avaliar o grau de confiabilidade da reação de imunohistoquímica. Fizemos a pesquisa pela microscopia eletrônica, de alguns casos intensamente positivos para os vírus que foram significativamente diferentes, em quantidade, entre doadores e miocardiopatias. A microscopia eletrônica demonstrou que os casos com intensa positividade de antígenos pela imunohistoquímica, apresentaram também grande quantidade de formas sugestivas de vírus, tornando-se assim, de maneira preliminar um método diagnóstico potencialmente útil para reforçar as demais técnicas. Outra vantagem da microscopia eletrônica é a sua capacidade de direcionar a pesquisa por outras



técnicas. Assim, a detecção de vírus entre 20 e 25 nm agrupa PB19, hepatite B e enterovírus, já vírus maiores entre 40 e 100 nm, hepatite C, HHV6 e adenovírus.

Em nossa casuística, a positividade de genoma de adenovírus para doadores foi elevada pela biologia molecular, porém a expressão de antígenos muito baixa pela imunohistoquímica. Com a microscopia eletrônica, não se observou a presença de estruturas virais sugestivas de adenovírus, reforçando preliminarmente os achados da imunohistoquímica. Neste contexto, a PCR *real time* poderia ser útil, questionando assim o valor da positividade da PCR convencional.

Com base nestes dados iniciais interessantes, nossa intenção é de dar prosseguimento ao estudo desta casuística com a microscopia eletrônica. Além disso, buscar a padronização da PCR *real time* para os diferentes microorganismos.

## ***Limitações do Estudo***

## 7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Trata-se de um estudo unicêntrico, com amostra reduzida, apesar de ter utilizado grupo controle e incluído outras etiologias, além da miocardiopatia dilatada idiopática.

A dificuldade para inclusão de pacientes, em especial idiopáticos, visando a realização de biopsia endomiocárdica, proporciona um viés de seleção, não sendo possível estabelecer prevalência de agentes infecciosos nesta casuística. No entanto, mesmo grandes estudos apresentam dificuldades para inclusão de pacientes.

O grupo controle constituído por doadores de transplante cardíaco foi considerado sem cardiopatia estrutural, porém algumas ressalvas são importantes. A avaliação realizada pela equipe de transplante cardíaco no momento da captação do órgão, visando afastar comprometimento anatômico e funcional do coração, é subjetiva e leva em consideração dados clínicos, hemodinâmicos, antecedentes, eletrocardiograma, radiografia de tórax e exames laboratoriais, não sendo utilizados métodos objetivos como ecocardiograma e cineangiocoronariografia. Além disso, a tempestade adrenérgica relacionada à morte encefálica pode comprometer a função cardíaca e levar a alterações histopatológicas. Entretanto, o material obtido dos doadores pode ser considerado o mais próximo da normalidade uma vez que no Brasil, de maneira geral, os doadores são jovens, com poucas comorbidades.

A análise por imunohistoquímica de inflamação e de agentes infecciosos foi realizada de forma quantitativa, porém dada a ausência de grupo controle sabidamente negativo, esta avaliação pode ter limitação. Apesar disso, a variabilidade dos resultados de imunohistoquímica para cada parâmetro, nos diferentes grupos, minimiza a possibilidade de falso-positividade, e também, os achados preliminares de hibridização *in situ* e microscopia eletrônica parecem reforçar os resultados da imunohistoquímica.

Devido à dificuldade para padronização da pesquisa de vírus de RNA por biologia molecular e à escassez de material disponível frente à grande quantidade de reações por diferentes técnicas, não foram estudados simultaneamente por

biologia molecular e imunohistoquímica, microorganismos potencialmente envolvidos na patogênese da miocardiopatia dilatada como os enterovírus, *herpes simplex* 1,2 e os vírus das hepatites B e C (estudados apenas por imunohistoquímica), citomegalovírus (estudados apenas por biologia molecular). Entretanto, a escassez é inerente à limitação de fragmentos de miocárdio obtidos por biopsia endomiocárdica.

Por ser uma análise preliminar, não incluindo todos os casos, os resultados de hibridização *in situ* para PB19 e de microscopia eletrônica devem ser avaliados com cautela, no entanto, as correlações iniciais com os achados de imunohistoquímica são auspiciosas.

## ***Conclusão***

## **8. CONCLUSÃO**

A presença de inflamação e de agentes infecciosos no miocárdio de pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática é frequente, e da mesma forma, em doadores de transplante cardíaco e miocardiopatias de outras etiologias.

***Implicação  
Clínica***

## **9. IMPLICAÇÃO CLÍNICA**

Com base nos resultados deste estudo a relação causal entre a presença de agentes infecciosos no tecido cardíaco e o desenvolvimento de miocardiopatia torna-se polêmica. Novos estudos envolvendo a quantificação de cópias de microorganismos, utilização de diferentes técnicas simultaneamente, sequenciamento de cepas patogênicas, simbiose entre agentes e o hospedeiro, produção de autoanticorpos mediada por microorganismos e predisposição genética do hospedeiro devem ser realizados visando estabelecer o real papel de agentes infecciosos no desenvolvimento das miocardiopatias. Os achados de inflamação e microorganismos, em doadores de coração, devem ser estudados em relação à evolução pós-transplante cardíaco.



# ***Anexos***

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**  
DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Instruções para preenchimento no verso)

---

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE :.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M F  
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE.....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M F  
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE.....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD .....

---

**II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA  
AGENTES INFECCIOSOS EM MIOCÁRDIO DE PACIENTES COM MIOCARDIOPATIA DILATADA.
2. PESQUISADOR: Sandrigo Mangini
3. CARGO: Médico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 101951
4. UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Insuficiência Cardíaca e Transplante  
Cardíaco do InCor HCFMUSP
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- |             |   |             |
|-------------|---|-------------|
| SEM RISCO   | RISCO MÍNIMO                                    | RISCO MÉDIO |
| RISCO BAIXO | <input checked="" type="checkbox"/> RISCO MAIOR |             |
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

---

**III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:**

## **1. Justificativa e os objetivos da pesquisa.**

Estamos avaliando pacientes que, como o(a) senhor(a), são portadores de insuficiência cardíaca e para os quais está sendo avaliado o transplante de coração, pois o tratamento com medicamentos chegou ao limite.

Nossa pesquisa é baseada nos resultados de estudos recentes que mostraram que microorganismos (vírus ou bactérias) podem ser encontrados no músculo do coração de alguns pacientes com a doença semelhante à do(a) senhor(a). Estes estudos indicam que a presença destes microorganismos pode ser prejudicial. Além disso, há indícios que o tratamento destes microorganismos com antibióticos pode levar a melhora da falta de ar e melhora do funcionamento do coração quando estes microorganismos são eliminados. Apesar dos resultados serem promissores, os estudos existentes até o momento são iniciais e não deram ainda uma resposta definitiva a esta questão.

Por isso, pretendemos estudar a importância de microorganismos existentes no coração de pacientes com doença cardíaca semelhante à do(a) senhor(a), para os quais o transplante cardíaco foi considerado. Queremos saber se tais microorganismos existem realmente, quais são estes microorganismos e se eles têm alguma importância ou não para os pacientes.

## **2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais.**

O senhor(a) passará por uma avaliação do seu estado de saúde e do funcionamento do coração antes e após a realização do estudo. Esta avaliação incluirá: consulta médica, realização de exames de sangue, eletrocardiograma, ecocardiograma (ultrassom do coração) e teste ergométrico (teste de esteira). Estes exames são os mesmos que são feitos de rotina para sua avaliação para transplante de coração.

Também será realizada uma biópsia do coração. Como não foi estabelecida causa para explicar sua doença, este procedimento poderá ajudar a esclarecer

esta dúvida, poderá estimar a gravidade da doença e poderá orientar outros tratamentos (além do que o senhor(a) já vem recebendo). Na biópsia são retirados pequenos fragmentos do coração; parte dos fragmentos obtidos será utilizada no nosso estudo para se pesquisar a existência tanto de inflamação no coração, como de microorganismos (vírus e bactérias). Outras doenças como sarcoidose, amiloidose, hemocromatose, entre outras poderão ser diagnosticadas com a biópsia.

De acordo com os resultados obtidos pela biópsia e havendo disponibilidade de medicações específicas poderá ser proposto outro tratamento associado ao que o senhor(a) já vem recebendo. As possibilidades de medicação incluem antiinflamatórios/imunossupressores (prednisona, mofetil, azatioprina), interferon, antibióticos (azitromicina) ou placebo (pílulas semelhantes aos medicamentos, mas sem nenhum efeito sobre o organismo humano - servindo como grupo de controle). A divisão entre os grupos será feita por sorteio.

Caso o senhor(a) receba algum destes tratamentos, será necessário realizar uma nova biópsia ao final, para que se possa comprovar que o tratamento foi eficaz, ou não.

### **3. Desconfortos e riscos esperados.**

Os desconfortos e riscos existentes são considerados baixos e se devem principalmente à realização da biópsia e às medicações que poderão ser utilizadas.

#### *Biópsia*

A biópsia pode ser feita em pacientes que estão em avaliação para receberem transplante de coração. O objetivo é ter certeza de que existe segurança para a realização do transplante (dependendo da causa pode haver contra-indicação) e de que todas as formas possíveis de tratamento foram feitas antes do transplante. Além disto, durante a biópsia, são feitas medidas de pressões de dentro do coração e dos pulmões, que também são muito importantes para se saber se o transplante pode ser feito com segurança. A biópsia é feita por um cirurgião cardíaco com experiência, através de uma veia do pescoço. Apesar de ser segura,

podem ocorrer complicações durante a biópsia. Estudos demonstram risco de complicações da ordem de 1 a 6%, com mortalidade de 0,03%.

As complicações mais comuns são a formação de hematoma (mancha roxa) no local onde é pega a veia no pescoço e o aparecimento de arritmias transitórias enquanto é feita a biópsia. Estas ocorrências não necessitam de tratamento específico ou de internação. Apesar de raras, complicações graves podem ocorrer, às vezes com necessidade de internação, e incluem lesão de artéria do pescoço (carótida), lesão do pulmão (pneumotórax), arritmias, lesão da válvula do coração e perfuração do coração. A perfuração do coração, apesar de rara, é a complicação mais grave, pois há risco de vida. Sempre é necessária internação em UTI e pode ser necessária operação cardíaca para se corrigir a lesão.

### *Medicamentos*

Dependendo do resultado encontrado na biópsia e da disponibilidade dos medicamentos, o senhor poderá receber um dos tratamentos abaixo ou outros que poderão ser desenvolvidos. Não é possível saber previamente qual deles o senhor poderá vir a tomar. Eles **NÃO PODEM** ser usados em mulheres grávidas, que pretendam engravidar, ou que estejam amamentando. As medicações e seus efeitos colaterais são:

**Interferon** – é uma medicação já usada rotineiramente para tratar infecções como a hepatite C. É administrada por injeção subcutânea (abaixo da pele) uma vez por semana. No início do tratamento são comuns sintomas semelhantes aos de uma gripe: mal estar, indisposição, dor pelo corpo e febre baixa. Este sintomas são transitórios e tendem a melhorar com o passar do tratamento. Podem ocorrer reações no local da injeção como vermelhidão e inchaço, que costumam desaparecer com o passar do tratamento.

Ocasionalmente podem ocorrer náuseas e vômitos e raramente foi relatada perda de cabelos. Raramente ocorre ansiedade, depressão, falta de ar, dor no peito, taquicardia e inflamação do pâncreas. É necessário o controle através de exames de sangue periodicamente.

**Prednisona** – É uma medicação usada habitualmente para tratar uma série de doenças inflamatórias e algumas infecções. É uma das medicações que serão

usadas após o transplante de coração. Pode levar a aumento da pressão arterial, do açúcar no sangue, aumento do peso, surgimento de acne e estrias, maior risco de infecções. Esses efeitos são transitórios e regridem com a suspensão do remédio.

**Mofetil / Azatioprina** - em geral são medicações bem toleradas, tomadas por boca. São também usadas após o transplante de coração. No início do tratamento pode haver empachamento, náuseas e diarreia. Pode reduzir o número de glóbulos brancos no sangue e aumentar o risco de infecções, por isso exames serão feitos periodicamente.

**Azitromicina** – é um antibiótico usado freqüentemente para tratar sinusites e pneumonias, e em geral é medicação bem tolerada. O seu uso pode causar dor de estômago, empachamento, náuseas, diarreia e arritmias.

#### **4. Benefícios que poderão ser obtidos.**

Os resultados da biópsia poderão dar informação sobre a causa de sua doença do coração e desta maneira auxiliar na estimativa de seu risco (inclusive fortalecendo a necessidade de transplante) e orientar tratamentos além dos quais o senhor(a) já vem recebendo. Caso haja disponibilidade das medicações mencionadas acima, de acordo com o resultado da biópsia (como demonstram estudos anteriores), pode ocorrer melhora do funcionamento do seu coração, aumento da resistência física e melhora da falta de ar. Tais estudos não mostraram piora dos pacientes com estes tratamentos.

#### **5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.**

Assim como o(a) senhor(a), todos os pacientes incluídos no estudo estarão em avaliação para transplante cardíaco, podendo inclusive já estar na fila. A participação no estudo não irá interferir de nenhuma maneira na decisão de realizar-se ou não o transplante, nem na rapidez com que o transplante será realizado. O(a) senhor(a) continuará a receber todo o tratamento recomendado para a sua doença durante o período do estudo.

---

—

#### **IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:**

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

O pacientes e seus representantes terão a qualquer tempo do estudo e mesmo após sua realização acesso a plenas informações sobre procedimentos que serão realizados, bem como os riscos e benefícios relacionados à pesquisa.

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

A qualquer momento e sem prévio aviso o paciente ou seu representante poderão se retirar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo ao seu tratamento, incluindo o transplante cardíaco, continuando a ter pleno acesso à assistência à sua saúde.

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Todas as informações obtidas com este estudo serão guardadas confidencialmente, com sigilo e privacidade, de acordo com o código de ética médica.

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Na eventualidade danos à sua saúde decorrentes da pesquisa, os pacientes receberão assistência no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Não existem indenizações por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

---

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

**Prof. Dr. Edimar Alcides Bocchi**

**Dr. Sandrigo Mangini**

Rua Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 44, 1º andar, Laboratório de Insuficiência Cardíaca

CEP: 05403-900 Telefone: 11 3069 5307 / 3069 5419 / 3069 5019

---

**VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES**

---

**VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo,                      de                      de                      .

---

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

assinatura do pesquisador (carimbo ou nome Legível)



**INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO**  
**(Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)**

1. Este termo conterà o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**  
DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Instruções para preenchimento no verso )

**I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME PACIENTE.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N.º:.....SEXO: M F  
DATA DE NASCIMENTO:...../...../.....  
ENDEREÇO:.....N.º:.....APTO:..  
BAIRRO:.....CIDADE:.....  
CEP:.....TELEFONE:  
DDD(.....).....
2. RESPONSÁVEL LEGAL.....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador,etc).....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M F  
DATA DE NASCIMENTO:...../...../.....  
ENDEREÇO: :.....N.º:.....APTO:..  
BAIRRO:.....CIDADE:.....  
CEP:.....TELEFONE:  
DDD(.....).....

**II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA  
AGENTES INFECCIOSOS EM MIOCÁRDIO DE PACIENTES COM MIOCARDIOPATIA DILATADA.
  2. PESQUISADOR: Sandrigo Mangini
  3. CARGO: Médico                    INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 101951
  4. UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Insuficiência Cardíaca e Transplante Cardíaco do InCor HCFMUSP
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:  
SEM RISCO                    RISCO MÍNIMO                    RISCO MÉDIO  
RISCO BAIXO    X    RISCO MAIOR
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
- 4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

### **III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL**

**Ao paciente será explicado:** O senhor tem uma doença muito grave chamada insuficiência cardíaca que é devido ao enfraquecimento do funcionamento do coração, onde existe a indicação de transplante cardíaco. Após o transplante o seu coração é inutilizado.

Solicitamos a autorização para que o Prof. Dr. Edimar Alcides Bocchi ou Dr. Sandrigo Manginni ou Fatima D. Cruz possam realizar estudos no coração retirado e no coração a ser recebido. Serão retirados pequenos fragmentos do coração a ser recebido que não comprometem a sua função. Também solicitamos autorização para que estes materiais obtidos possam ser armazenados para estudos futuros.

O senhor terá acesso a qualquer tempo às informações relacionados aos estudos, inclusive para dirimir eventuais dúvidas; terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo a continuidade da assistência; salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade; terá a disponibilidade de assistência. O estudo não determina danos a sua saúde.

### **IV – ESCLARECIMENTOS SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO AO ESTUDO:**

**Como acima descrito será esclarecido ao paciente as garantias referentes ao estudo.**

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre o estudo.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

### **V – INFORMAÇÕES SOBRE O ACOMPANHAMENTO ESTUDO**

Equipe de Insuficiência Cardíaca e Transplante Cardíaco

Endereço: Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, Nº 44 – São Paulo – Brasil.

### **VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do estudo.

São Paulo,

de

de 2009

---

Assinatura do sujeito do estudo ou responsável legal

Assinatura dos responsáveis pelo estudo  
Prof. Dr. Edimar Alcides Bocchi  
Dr. Sandrigo Manginni  
Enfª. Fátima das Dores Cruz

### **INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO**

( Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 de Outubro 1996)

1. Este termo conterà o registro das informações que o (os) responsáveis pelo estudo fornecerão ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser anexada ao prontuário do paciente.

Data de Nascimento	Local de Nascimento
Procedência	Endereço
Telefone	
Profissão	
Termo de Consentimento - data	

Dados:

Raça:	<input type="checkbox"/> Branca	<input type="checkbox"/> Negra	<input type="checkbox"/> Asiático	<input type="checkbox"/> _____
Estadio	<input type="checkbox"/> B	<input type="checkbox"/> C	<input type="checkbox"/> D	<input type="checkbox"/> _____
Classe Funcional:	<input type="checkbox"/> I	<input type="checkbox"/> II	<input type="checkbox"/> III	<input type="checkbox"/> IV
Inícios dos sintomas: <input type="checkbox"/> > 6 meses <input type="checkbox"/> < 6meses	Piora clínica:			

Sintomas

Dispnéia <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Palpitação <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Empachamento <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Tosse <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Síncope <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Febre precedendo <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Dor torácica: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Edema MMII <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	IVAS precedendo <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
DPN <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Ortopnéia <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	GECA precedendo <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não

Antecedentes / Hábitos Pessoais:

<input type="checkbox"/> HAS	<input type="checkbox"/> TVP / TEP	<input type="checkbox"/> AIT	<input type="checkbox"/> Disfunção tireoidiana: <input type="checkbox"/> Hipotireoidismo <input type="checkbox"/> Hipertireoidismo
<input type="checkbox"/> DM	<input type="checkbox"/> Alergia	<input type="checkbox"/> AVC	<input type="checkbox"/> Insuficiência Renal: <input type="checkbox"/> Dialítica <input type="checkbox"/> Não dialítica
<input type="checkbox"/> DLP	<input type="checkbox"/> Drogadição	<input type="checkbox"/> Tabagismo: <input type="checkbox"/> Ex-tabagista <input type="checkbox"/> Atual	
<input type="checkbox"/> DPOC: <input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderada <input type="checkbox"/> Severa		<input type="checkbox"/> Etilismo	
<input type="checkbox"/> HF miocardiopatia ou MS <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		Obs	

Antecedentes Cirúrgicos:

<input type="checkbox"/> Marcapasso AV	<input type="checkbox"/> Outros
<input type="checkbox"/> Marcapasso ABiv	Obs.:
<input type="checkbox"/> CDI	
<input type="checkbox"/> CDI ABiv	

Medicação em Uso:

Nome	Dose	Nome	Dose	Nome	Dose

Exame Físico:

FC:	PA:	Peso:	Altura:	Sat. O <sub>2</sub> :
B3: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	EC: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	RHJ: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	TJ: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não cm	Ascite: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Hepatomegalia: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não cm		Edema MMII: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> leve <input type="checkbox"/> moderado <input type="checkbox"/> grave		
T enchimento.capilar: <input type="checkbox"/> < 3s <input type="checkbox"/> 3-5s <input type="checkbox"/> >5s		Perfil hemodinâmico:		
Ictus				

Exame Físico na Hemodinâmica:

FC:	PA:	Peso:	Altura:	Sat. O <sub>2</sub> :
B3: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	EC: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	RHJ: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	TJ: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não cm	Ascite: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Hepatomegalia: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não cm		Edema MMII: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> leve <input type="checkbox"/> moderado <input type="checkbox"/> grave		
T enchimento.capilar: <input type="checkbox"/> < 3s <input type="checkbox"/> 3-5s <input type="checkbox"/> >5s		Perfil hemodinamico:		
Ictus				

Exames:

ECG		RX Tórax		ECO 3D data:
Ritmo	Bloqueio de ramo	<input type="checkbox"/> Cardiomegalia / ICT		ECO 3D segundo:
<input type="checkbox"/> Sinusal <input type="checkbox"/> FA	<input type="checkbox"/> BRE <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sinais de congestão pulmonar		Cate E Data:
<input type="checkbox"/> MP <input type="checkbox"/> Outra <input type="checkbox"/> ND	<input type="checkbox"/> BRD <input type="checkbox"/> ND	Ergoespiro data Slope	VO2	RNM Data:

CATE D	Basal	Vasodilatador	ECO	Basal
PA			AE	
FC			VE	
AD			FE	
VD			VD	
PAP			PSVD	
PCP			Biopsias	Formol
GTP			RNA later	Glutaraldeido
RVP			Complicações	

***Referências  
Bibliográficas***

---

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> DATASUS [base de dados na internet]. Brasil: Ministério da Saúde. [acesso em 04 mar 2012]. Disponível em: [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)
- <sup>2</sup> Bocchi EA, Guimarães G, Tarasoutshi F, Spina G, Mangini S, Bacal F. Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America. *Heart*. 2009; 95: 181-9.
- <sup>3</sup> Bocchi EA, Cruz F, Guimarães G, Pinho Moreira LF, Issa VS, Ayub Ferreira SM, Chizzola PR, Souza GE, Brandão S, Bacal F. Long-term prospective, randomized, controlled study using repetitive education at six-month intervals and monitoring for adherence in heart failure outpatients: the REMADHE trial. *Circ Heart Fail*. 2008; 1: 115-24.
- <sup>4</sup> Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying Causes and Long-Term Survival in Patients with Initially Unexplained Cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000; 342: 1077-84.
- <sup>5</sup> Freitas HF, Chizzola PR, Paes AT, Lima AC, Mansur AJ. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*. 2005; 102: 239-47.
- <sup>6</sup> Dally JF. Life and Times of Jean Nicolas Corvisart (1755-1821): (Section of the History of Medicine). *Proc R Soc Med*. 1941; 34: 239-46.
- <sup>7</sup> Olsen EG. The problem of viral heart disease. How often do we miss it? *Postgrad Med J*. 1985; 61: 479-80.
- <sup>8</sup> Abelmann WH. Classification and natural history of primary myocardial disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 1984; 27: 73-94.



---

<sup>9</sup> Virchow RLK. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Berlin, A. Hirschwald, 1958.

<sup>10</sup> Khrel L: Breitrag zur Kentniss der idiopathischen Herz-muskelerkrankungen. Dtsch Arch Klin Med. 1891; 48: 414-31.

<sup>11</sup> Josserand E, Gallavardin L. De l'asystolie progressive des jeunes sujets par myocardite subaigue primitive. Arch Gen Me. 1901; 6: 684-704.

<sup>12</sup> Warren S. The pathology of chronic myocarditis. N Engl J Med. 1933; 208: 573.

<sup>13</sup> Christian HA. Clinically the myocardium. AMA Arch Intern Med. 1950; 86: 491-97.

<sup>14</sup> Brigden W. Uncommon myocardial diseases. The non-coronary cardiomyopathies. Lancet. 1957; 270: 1243-49.

<sup>15</sup> Idiopathic cardiomegaly. Bull World Health Organ. 1968; 38: 979-92.

<sup>16</sup> Goodwin JF, Oakley CM. The cardiomyopathies. Br Heart J. 1972; 34: 545-52.

<sup>17</sup> Report of the WHO/ISFC Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. Br Heart J. 1980; 44: 672-73.

<sup>18</sup> Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report on the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. Circulation 1996; 93: 841-42.

---

<sup>19</sup> Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008; 29: 270–76.

<sup>20</sup> Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006; 113: 1807–16.

<sup>21</sup> Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 2010; 375: 752-62.

<sup>22</sup> Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *JAMA*. 2006; 296: 1867–76.

<sup>23</sup> Taylor MR, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis*. 2006; 1: 27.

<sup>24</sup> Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45: 969-8.

<sup>25</sup> Michels VV, Moll PP, Miller FA, et al. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1992; 326: 77–82.

<sup>26</sup> Towbin JA, Bowles NE. The failing heart. *Nature*. 2002; 415: 227–33.

<sup>27</sup> Hershberger RE, Lindenfeld J, Mestroni L, Seidman CE, Taylor MR, Towbin JA. Genetic evaluation of cardiomyopathy—a Heart Failure Society of America practice guideline. *J Card Fail*. 2009; 15: 83–97.

---

<sup>28</sup> Towbin JA, Bowles NE. Genetic abnormalities responsible for dilated cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep.* 2000; 2: 475-80.

<sup>29</sup> Maisch B, Richter A, Sandmüller A, Portig I, Pankuweit S. Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMI). *Herz.* 2005; 30: 535-44.

<sup>30</sup> Herskowitz A, Ahmed-Ansari A, Neumann DA, et al. Induction of Major Histocompatibility Complex antigens within the myocardium of patients with active myocarditis: a nonhistologic marker of myocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 1990; 15: 624-32.

<sup>31</sup> Caforio ALP, Bonifacio E, Stewart JT, et al. Novel organ-specific circulating autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1990; 15: 1527-34.

<sup>32</sup> Dörner A, Kallwellis-Opara A, Pauschinger M, Kühl U, Schultheiss HP. Cardiac autoantibodies in viral myocarditis. *Heart Fail Clin.* 2005; 1: 333-43.

<sup>33</sup> Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left-ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2003; 107: 2793-98.

<sup>34</sup> Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left-ventricular dysfunction. *Circulation.* 2005; 111: 887-93.

<sup>35</sup> Why HJF, Meany BT, Richardson PJ, Olsen AGJ, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Archard LC. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1994; 89: 2582-89.

- 
- <sup>36</sup> Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42: 466-72.
- <sup>37</sup> Calabrese F, Thiene G. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects. *Cardiovasc Res*. 2003; 60:11-25.
- <sup>38</sup> Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res*. 2003; 60: 5-10.
- <sup>39</sup> Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bültmann B, Müller T, Lindinger A, Böhm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation*. 2008; 118: 639-48.
- <sup>40</sup> Weinberg M, Fell EH, Lynfield J. Diagnostic biopsy of the pericardium and myocardium. *AMA Arch Surg*. 1958; 76: 825-29.
- <sup>41</sup> Holzmann M, Nicko A, Kühl U, Noutsias M, Poller W, Hoffmann W, Morguet A, Witzenbichler B, Tschöpe C, Schultheiss HP, Pauschinger M. Complication rate of right ventricular endomyocardial biopsy via the femoral approach: a retrospective and prospective study analyzing 3048 diagnostic procedures over an 11-year period. *Circulation*. 2008; 118: 1722-28.
- <sup>42</sup> Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R; American Heart Association; American College of Cardiology; European Society of Cardiology. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. *Circulation*. 2007; 116: 2216-33.

---

<sup>43</sup> Calabrese F, Angelini A, Carturan E, Thiene G. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: histomorphological diagnosis. Ernst Schering Res Found Workshop. 2006; 55: 305-21.

<sup>44</sup> Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. Hum Pathol. 1987; 18: 619-24.

<sup>45</sup> Chow LH, Radio SJ, Sears TD, McManus BM: Insensitivity of right ventricular endomyocardial biopsy in the diagnosis of myocarditis. J Am Coll Cardiol. 1989; 14: 915-20.

<sup>46</sup> Baughman KL: Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. Circulation. 2006; 113: 593-95.

<sup>47</sup> Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss H, Kuhl U. Phenotypic characterization of infiltrates in dilated cardiomyopathy - diagnostic significance of T-lymphocytes and macrophages in inflammatory cardiomyopathy. Med Sci Monit. 2002; 8: 478-87.

<sup>48</sup> Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wodniecki J, Szczurek-Katański K, Nożyński J, Zembala M, Rozek MM. Immunohistological diagnosis of myocarditis: potential role of sarcolemmal induction of the MHC and ICAM-1 in the detection of autoimmune mediated myocyte injury. Eur Heart J. 1998; 19: 1564-72.

<sup>49</sup> Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kuhl U. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. Circulation. 1999; 99: 2124-31.

<sup>50</sup> Edwards WD, Holmes DR, Reeder GS. Diagnosis of active lymphocytic myocarditis by endomyocardial biopsy: quantitative criteria for light microscopy. Mayo Clin Proc . 1982; 57:419-25.

---

<sup>51</sup> Linder J, Cassling RS, Rogler WC, Wilson JE, Markin RS, Sears TD, McManus BM. Immunohistochemical characterization of lymphocytes in uninflamed ventricular myocardium. Implications for myocarditis. *Arch Pathol Lab Med.* 1985; 109: 917–20.

<sup>52</sup> Schnitt SJ, Ciano PS, Schoen FJ. Quantitation of lymphocytes in endomyocardial biopsies: use and limitations of antibodies to leukocyte common antigen. *Hum Pathol.* 1987; 18: 796-800.

<sup>53</sup> Azzawi M, Hasleton PS, Kan SW, Hillier VF, Quigley A, Hutchinson IV. Distribution of myocardial macrophages in the normal human heart. *J Anat.* 1997; 191: 417-23.

<sup>54</sup> Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP. Immunological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart.* 1996; 75: 295–300.

<sup>55</sup> Tazelaar HD, Billingham ME. Myocardial lymphocytes. Fact, fancy or myocarditis? *Am J Cardiovasc Pathol.* 1987; 1: 47–50.

<sup>56</sup> Maisch B, Bultman B, Factor S. World Heart Federation consensus conference's definition on inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): report from two expert committees on histology and viral cardiomyopathy. *Heartbeat* 1999; 4: 3-4.

<sup>57</sup> Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur Heart J.* 2009; 30: 1995-2002.

- 
- <sup>58</sup> Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation*. 2005; 112: 1965-70.
- <sup>59</sup> Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, Wu L, Ong S, Quader F, Chen P, Zheng D, Caturegli P, Rose NR, Ciháková D. Macrophages participate in IL-17-mediated inflammation. *Eur J Immunol*. 2012; 42: 726-36.
- <sup>60</sup> Streuli M, Morimoto C, Schrieber M, Schlossman SF, Saito H. Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leukocyte common antigens. *J Immunol*. 1988; 141: 3910-4.
- <sup>61</sup> Rose NR. Critical cytokine pathways to cardiac inflammation. *J Interferon Cytokine Res*. 2011; 31: 705-10.
- <sup>62</sup> Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990; 346: 425-34.
- <sup>63</sup> Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation*. 1999; 99:1091-100.
- <sup>64</sup> Maisch B, Noutsias M, Ruppert V, Richter A, Pankuweit S. Cardiomyopathies: classification, diagnosis, and treatment. *Heart Fail Clin*. 2012; 8: 53-78.
- <sup>65</sup> Blauwet LA, Cooper LT. Myocarditis. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010; 52: 274-88.
- <sup>66</sup> D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, Sinagra G, Di Lenarda A, Silvestri F, Di Sciascio G. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart*. 2001;85: 499 –504.

---

<sup>67</sup> Freimuth P, Philipson L, Carson SD. The coxsackievirus and adenovirus receptor. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 323: 67– 87.

<sup>68</sup> Shi Y, Chen C, Lisewski U, Wrackmeyer U, Radke M, Westermann D, Sauter M, Tschöpe C, Poller W, Klingel K, Gotthardt M. Cardiac deletion of the Coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53:1219-26.

<sup>69</sup> Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper LT, Böhm M. Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 59: 779-92.

<sup>70</sup> Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation*. 2001; 104: 1076–82.

<sup>71</sup> Young NS, Brown KE. Mechanisms of disease. Parvovirus B19. *N Engl J Med*. 2004; 350: 586–97.

<sup>72</sup> Bock CT, Klingel K, Kandolf R. Human parvovirus B19-associated myocarditis. *N Engl J Med*. 2010; 362: 213–4.

<sup>73</sup> Huatuco EM, Durigon EL, Lebrun FL, Passos SD, Gazeta RE, Azevedo Neto RS, Massad E. Seroprevalence of human parvovirus B19 in a suburban population in São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2008; 42: 443-9.

<sup>74</sup> Hokynar K, Norja P, Hedman K, Soderlund-Venermo M. Tissue persistence and prevalence of B19 virus types 1-3. *Future Virology* 2007; 2: 377-88.

<sup>75</sup> Pankuweit S, Moll R, Baandrup U, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum Pathol*. 2003; 34: 497-503.

<sup>76</sup> Donoso-Mantke O, Meyer R, Prösch S, Nitsche A, Leitmeyer K, Kallies R, Niedrig M. High prevalence of cardiotropic viruses in myocardial tissue from



---

explanted hearts of heart transplant recipients and heart donors: a 3-year retrospective study from a German patients' pool. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24: 1632-8.

<sup>77</sup> Koepsell SA, Anderson DR, Radio SJ. Parvovirus B19 is a bystander in adult myocarditis. *Cardiovasc Pathol.* 2012; 21: 476-81.

<sup>78</sup> Kuethe F, Lindner J, Matschke K, Wenzel JJ, Norja P, Ploetze K, Schaal S, Kamvissi V, Bornstein SR, Schwanebeck U, Modrow S. Prevalence of parvovirus B19 and human bocavirus DNA in the heart of patients with no evidence of dilated cardiomyopathy or myocarditis. *Clin Infect Dis.* 2009; 49: 1660-6.

<sup>79</sup> Lotze U, Egerer R, Glück B, Zell R, Sigusch H, Erhardt C, Heim A, Kandolf R, Bock T, Wutzler P, Figulla HR. Low level myocardial parvovirus B19 persistence is a frequent finding in patients with heart disease but unrelated to ongoing myocardial injury. *J Med Virol.* 2010; 82: 1449-57.

<sup>80</sup> Schenk T, Enders M, Pollak S, Hahn R, Huzly D. High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without myocarditis or dilative cardiomyopathy. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:106-10.

<sup>81</sup> Salahuddin SZ. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science.* 1986; 234: 596–601.

<sup>82</sup> Krueger GR, Ablashi DV. Human herpesvirus-6: a short review of its biological behavior. *Intervirology.* 2003; 46: 257-69.

<sup>83</sup> Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippon J, Bock CT, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation.* 2006; 114: 1581-90.

---

<sup>84</sup> Palecek T, Kuchynka P, Hulinska D, Schramlova J, Hrbackova H, Vitkova I, Simek S, Horak J, Louch WE, Linhart A. Presence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies in patients with new-onset unexplained dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol*. 2010; 199: 139-43.

<sup>85</sup> Song H, Tasaki H, Yashiro A, Yamashita K, Toyokawa T, Nagai Y, Takatsu H, Taniguchi H, Nakashima Y. Dilated cardiomyopathy and *Chlamydia pneumoniae* infection. *Heart*. 2001; 86: 456-8.

<sup>86</sup> Paz A, Potasman I. *Mycoplasma*-associated carditis. Case reports and review. *Cardiology*. 2002; 97: 83-8.

<sup>87</sup> Geluk CA, Otterspoor IC, de Boeck B, Gevers RM, Velthuis BK, Cramer MJ. Magnetic resonance imaging in acute myocarditis: a case report and a review of literature. *Neth J Med*. 2002; 60: 223-7.

<sup>88</sup> Palomino SA, Aiello VD, Higuchi ML. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000; 94: 571-9.

<sup>89</sup> Benvenuti LA, Roggério A, Freitas HF, Mansur AJ, Fiorelli A, Higuchi ML. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008; 102: 481-7.

<sup>90</sup> Davydova J, Pankuweit S, Crombach M, Eckhardt H, Strache D, Faulhammer P, Maisch B. Detection of viral and bacterial protein in endomyocardial biopsies of patients with inflammatory heart muscle disease? *Herz*. 2000; 25: 233-9.

<sup>91</sup> Zhang H, Li Y, McClean DR, Richardson PJ, Florio R, Sheppard M, Morrison K, Latif N, Dunn MJ, Archard LC. Detection of enterovirus capsid protein VP1 in myocardium from cases of myocarditis or dilated cardiomyopathy by

---

immunohistochemistry: further evidence of enterovirus persistence in myocytes. *Med Microbiol Immunol.* 2004; 193: 109-14.

<sup>92</sup> Li Y, Bourlet T, Andreoletti L, Mosnier JF, Peng T, Yang Y, Archard LC, Pozzetto B, Zhang H. Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2000;101: 231-4.

<sup>93</sup> Escher F, Kuhl U, Sabi T, Suckau L, Lassner D, Poller W, Schultheiss HP, Noutsias M. Immunohistological detection of Parvovirus B19 capsid proteins in endomyocardial biopsies from dilated cardiomyopathy patients. *Med Sci Monit.* 2008; 14: CR333-38.

<sup>94</sup> Dennert R, Velthuis S, Schalla S, Eurlings L, van Suylen RJ, van Paassen P, Tervaert JW, Wolffs P, Goossens VJ, Bruggeman C, Waltenberger J, Crijns HJ, Heymans S. Intravenous immunoglobulin therapy for patients with idiopathic cardiomyopathy and endomyocardial biopsy-proven high PVB19 viral load. *Antivir Ther.*2010; 15: 193-201.

<sup>95</sup> Pauschinger M, Kallwellis-Opara A. *Frontiers in viral diagnostics.* Ernst Schering Res Found Workshop. 2006; 55: 39-54.

<sup>96</sup> She RC, Hammond EH. Utility of immunofluorescence and electron microscopy in endomyocardial biopsies from patients with unexplained heart failure. *Cardiovasc Pathol.* 2010; 19: e99-105.

<sup>97</sup> Bellotti G, Bocchi EA, de Moraes AV, Higuchi M L, Barbero-Marcial M, Sosa E, Esteves-Filho A, Kalil R, Weiss R, Jatene A, Pileggi F. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J.*1996; 131: 301-7. Erratum in: *Am Heart J.* 1998; 135: 550.

<sup>98</sup> Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of

---

Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg.* 1997; 56: 485-9.

<sup>99</sup> Benvenuti LA, Higuchi ML, Reis MM. Upregulation of adhesion molecules and class I HLA in the myocardium of chronic chagasic cardiomyopathy and heart allograft rejection, but not in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol.* 2000; 9: 111-7.

<sup>100</sup> Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial Trypanosoma cruzi antigens. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997; 83: 165-72.

<sup>101</sup> Mady C, Pereira Barretto AC, Bellotti G, Stolf NA, Higuchi ML, Ianni BM, Arteaga-Fernández E, Vianna Cde B, Lomelino SM, Pileggi F. Active lymphocyte infiltrate in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 1986; 47: 243-6.

<sup>102</sup> Arteaga-Fernández E, Barretto AC, Mady C, Higuchi ML, Fiorelli AI, Bellotti G, Jatene AD, Pileggi F. Lymphocytic myocarditis. Response to treatment with immunosuppressive drugs. *Arq Bras Cardiol.* 1990; 55: 161-5.

<sup>103</sup> Gomes M de L, Kopecka H, Ferreira Júnior AG, Ferreira SM, Maneschy LA, Linhares AC. Detection of enteroviral sequence in endomyocardial tissues from patients with cardiac diseases in northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31: 487-90.

<sup>104</sup> Camargo PR, Okay TS, Yamamoto L, Del Negro GM, Lopes AA.. Myocarditis in children and detection of viruses in myocardial tissue: implications for immunosuppressive therapy. *Int J Cardiol.* 2011; 148: 204-8.

---

<sup>105</sup> Montera MW, Pereira Y, Silva EL, Takiya C, Mesquita ET. Accuracy of non-invasive methods to diagnose chronic myocarditis in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2011; 13(10): S162–S165.

<sup>106</sup> Parrillo JE, Cunnion RE, Epstein SE, Parker MM, Suffredini AF, Brenner M, Schaer GL, Palmeri ST, Cannon RO 3rd, Alling D, et al. A prospective, randomized, controlled trial of prednisone for dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1989; 321:1061–8.

<sup>107</sup> Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME, Moon TE, for the Myocarditis Treatment Trial Investigators. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. *N Engl J Med.* 1995; 333: 269 –75.

<sup>108</sup> Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek MM, Wodniecki J. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation.* 2001; 104: 39–45.

<sup>109</sup> Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation.* 2003; 107: 857–63.

<sup>110</sup> McNamara DM, Holubkov R, Starling RC, Dec GW, Loh E, Torre-Amione G, Gass A, Janosko K, Tokarczyk T, Kessler P, Mann DL, Feldman AM. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2001; 103: 2254 –9.

<sup>111</sup> Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schonian U, Maisch B. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz.* 2000; 25: 279–85.

---

<sup>112</sup> Felix SB, Staudt A, Landsberger M, Grosse Y, Stangl V, Spielhagen T, Wallukat G, Wernecke KD, Baumann G, Stangl K. Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoabsorption. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 646–52.

<sup>113</sup> Doesch AO, Konstandin M, Celik S, Kristen A, Frankenstein L, Hardt S, Goeser S, Kaya Z, Katus HA, Dengler TJ. Effects of protein A immunoabsorption in patients with advanced chronic dilated cardiomyopathy. *J Clin Apher.* 2009; 24:141–9.

<sup>114</sup> McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med.* 1971; 285: 1441-6.

<sup>115</sup> McDonough M, Kew O, Hierholzer J. PCR Detection of Human Adenoviruses. In: *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.* ed. Rochester: Mayo Foundation. 1993: 389-93.

<sup>116</sup> Espy MJ, Smith TF, Persing DH. Dependence of polymerase chain reaction product inactivation protocols on amplicon length and sequence composition. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 2361-5.

<sup>117</sup> Telenti A. PCR Detection of Typing of Epstein-Barr Virus. In: *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.* ed. Rochester: Mayo Foundation. 1993: 344-49.

<sup>118</sup> Canto CL, Sumita LM, Machado AF, Tateno A, Cunha EV, Machado CM. Optimization of the Sybr Green real time PCR for the detection of Human Herpes Virus type 6 (HHV-6). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008; 50: 61-3.

<sup>119</sup> Persing DH et al. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. In Campbell, LA. PCR detection of *Chlamydia pneumoniae*. ASM Press. 1993: 247-52.

- 
- <sup>120</sup> Richter D, Matuschka FR. Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 4627-32.
- <sup>121</sup> Higuchi M de L, Kawakami J, Ikegami R, Clementino MB, Kawamoto FM, Reis MM, Bocchi E. Do Archaea and bacteria co-infection have a role in the pathogenesis of chronic chagasic cardiopathy? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 Suppl 1: 199-207.
- <sup>122</sup> Corrêa FG, Pontes CL, Verzola RM, Mateos JC, Velho PE, Schijman AG, Selistre-de-Araujo HS. Association of *Bartonella* spp bacteremia with Chagas cardiomyopathy, endocarditis and arrhythmias in patients from South America. *Braz J Med Biol Res.* 2012; 45: 644-51.
- <sup>123</sup> Roossinck MJ. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9: 99-108.
- <sup>124</sup> Roossinck MJ. Changes in population dynamics in mutualistic versus pathogenic viruses. *Viruses.* 2011; 3: 12-19.
- <sup>125</sup> Fukuyo M, Sasaki A, Kobayashi I. Success of a suicidal defense strategy against infection in a structured habitat. *Sci Rep.* 2012; 2: 238.
- <sup>126</sup> Hansen SK, Rainey PB, Haagensen JA, Molin S. Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature.* 2007; 445: 533-6.
- <sup>127</sup> Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Akira S, Yamamoto A, Komuro I, Otsu K. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature.* 2012; 485: 251-5.
- <sup>128</sup> Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science.* 2012; 336: 1268-73.

---

<sup>129</sup> Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, Tjandra-Maga TB, Borgers M, Plets C, Flameng W. Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circulation*. 1993; 87: 230-9.

<sup>130</sup> Baroldi G, Di Pasquale G, Silver MD, Pinelli G, Lusa AM, Fineschi V. Type and extent of myocardial injury related to brain damage and its significance in heart transplantation: a morphometric study. *J Heart Lung Transplant*. 1997;16: 994-1000.

<sup>131</sup> Pérez López S, Otero Hernández J, Vázquez Moreno N, Escudero Augusto D, Alvarez Menéndez F, Astudillo González A. Brain death effects on catecholamine levels and subsequent cardiac damage assessed in organ donors. *J Heart Lung Transplant*. 2009; 28: 815-20.

<sup>132</sup> Berman M, Ali A, Ashley E, Freed D, Clarke K, Tsui S, Parameshwar J, Large S. Is stress cardiomyopathy the underlying cause of ventricular dysfunction associated with brain death? *J Heart Lung Transplant*. 2010; 29: 957-65.

<sup>133</sup> Michelena JC, Chamorro C, Falcón JA, Garcés S. Hormone modulation of organ donor. Utility of the steroids. *Med Intensiva*. 2009; 33: 251-5.

<sup>134</sup> Nyhof E, Wiehl S, Steinhoff J, Krüger S, Mueller-Steinhardt M, Fricke L. Relationship between donor factors, immunogenic up-regulation, and outcome after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2005; 37: 1605-7.

<sup>135</sup> Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int*. 1999; 56: 1551-9.

<sup>136</sup> Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, Rela M, Heaton ND, Fuggle SV. Leukocyte infiltration and inflammatory antigen expression in cadaveric and living-donor livers before transplant. *Transplantation*. 2003; 75: 2001-7.



- 
- <sup>137</sup> Rose M, Navarette C, Yacoub M, Festenstein H. Persistence of donor-specific class II antigens in allografted human heart two years after transplantation. *Hum Immunol.* 1988; 23: 179-90.
- <sup>138</sup> Herskowitz A, Mayne AE, Willoughby SB, Kanter K, Ansari AA. Patterns of myocardial cell adhesion molecule expression in human endomyocardial biopsies after cardiac transplantation. Induced ICAM-1 and VCAM-1 related to implantation and rejection. *Am J Pathol.* 1994; 145: 1082-94.
- <sup>139</sup> Zembala M, Wojnicz R, Zakliczyński M, Wojarski J, Nozyński J, Knapik P, Białkowski J, Foremny J, Rozek M. Cellular adhesion molecules changes in myocardium during first year post heart transplant. *Ann Transplant.* 1997; 2: 16-9.
- <sup>140</sup> Devaux B, Scholz D, Hirche A, Klövekorn WP, Schaper J. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *Eur Heart J.* 1997; 18: 470-9.
- <sup>141</sup> Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 49: 192-200.
- <sup>142</sup> Brown K, Sacks SH, Wong W. Extensive and bidirectional transfer of major histocompatibility complex class II molecules between donor and recipient cells in vivo following solid organ transplantation. *FASEB J.* 2008; 22: 3776-84.
- <sup>143</sup> Atkinson C, Varela JC, Tomlinson S. Complement-dependent inflammation and injury in a murine model of brain dead donor hearts. *Circ Res.* 2009; 105: 1094-101.
- <sup>144</sup> Ozdemir BH, Sezgin A, Haberal M. Apoptosis and proliferation of cardiomyocytes and interstitial mononuclear cells: association with rejection and macrophage infiltration. *Transplant Proc.* 2009; 41: 2890-2.

- 
- <sup>145</sup> Fishbein GA, Fishbein MC. Morphologic and immunohistochemical findings in antibody-mediated rejection of the cardiac allograft. *Hum Immunol.* 2012; 73: 1213-7.
- <sup>146</sup> Wu GW, Kobashigawa JA, Fishbein MC, Patel JK, Kittleson MM, Reed EF, Kiyosaki KK, Ardehali A. Asymptomatic antibody-mediated rejection after heart transplantation predicts poor outcomes. *J Heart Lung Transplant.* 2009; 28: 417-22.
- <sup>147</sup> Tanio JW, Basu CB, Albelda SM, Eisen HJ. Differential expression of the cell adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin in normal and posttransplantation myocardium. Cell adhesion molecule expression in human cardiac allografts. *Circulation.* 1994; 89: 1760-8.
- <sup>148</sup> Hosenpud JD, Shipley GD, Mauck KA, Morris TE, Wagner CR. Temporal reduction in acute rejection after heart transplantation is not associated with a reduction in cell-mediated responses to donor-specific vascular endothelium. *J Heart Lung Transplant.* 1995; 14: 926-37.
- <sup>149</sup> Bocchi EA, Fiorelli A. The Brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report. *J Heart Lung Transplant.* 2001; 20: 637-45.
- <sup>150</sup> Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, Pileggi F. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol.* 1987; 10: 665-70.
- <sup>151</sup> Cabral HR, Novak IT, Glocker TM, Castro Viera GA. Chagas cardiopathy: identification and quantification of infiltrating cells in the hearts of cardiac death patients of different ages. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 2002; 59: 83-9.
- <sup>152</sup> Acosta Rodriguez EV, Zuniga EI, Montes CL, Merino MC, Bermejo DA, Amezcua Vesely MC, Motran CC, Gruppi A. Trypanosoma cruzi infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first? *Scand J Immunol.* 2007; 66: 137-42.

---

<sup>153</sup> Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993; 423: 157-60.

<sup>154</sup> Burniston JG, Ellison GM, Clark WA, Goldspink DF, Tan LB. Relative toxicity of cardiotoxic agents: some induce more cardiac and skeletal myocyte apoptosis and necrosis in vivo than others. *Cardiovasc Toxicol.* 2005; 5: 355-64.

<sup>155</sup> Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Shan K, Aggeli C, Reardon MJ, Letsou GV, Espada R, Ramchandani M, Entman ML, Zoghbi WA. Evidence for an active inflammatory process in the hibernating human myocardium. *Am J Pathol.* 2002; 160: 1425-33.

<sup>156</sup> Frustaci A, Chimenti C, Maseri A. Global biventricular dysfunction in patients with asymptomatic coronary artery disease may be caused by myocarditis. *Circulation.* 1999; 99: 1295-9.

<sup>157</sup> Frustaci A, Francone M, Petrosillo N, Chimenti C. High prevalence of myocarditis in patients with hypertensive heart disease and cardiac deterioration. *Eur J Heart Fail.* 2012 Oct 30. [Epub ahead of print]

<sup>158</sup> Hokynar K, Norja P, Hedman K, Soderlund-Venermo M. Tissue persistence and prevalence of B19 virus types 1-3. *Future Virology* 2007; 2: 377–88.

<sup>159</sup> Dennert R, van Paassen P, Wolffs P, Bruggeman C, Velthuis S, Felix S, van Suylen RJ, Crijns HJ, Cohen Tervaert JW, Heymans S. Differences in virus prevalence and load in the hearts of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy with and without immune-mediated inflammatory diseases. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19: 1182-7.

<sup>160</sup> Moimas S, Zacchigna S, Merlo M, Buiatti A, Anzini M, Dreas L, Salvi A, Di Lenarda A, Giacca M, Sinagra G. Idiopathic dilated cardiomyopathy and persistent

---

viral infection: Lack of association in a controlled study using a quantitative assay. *Heart Lung Circ.* 2012; 21: 787-93.

<sup>161</sup> Andréoletti L, Bourlet T, Moukassa D, Rey L, Hot D, Li Y, Lambert V, Gosselin B, Mosnier JF, Stankowiak C, Wattré P. Enteroviruses can persist with or without active viral replication in cardiac tissue of patients with end-stage ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2000; 182: 1222-7.

<sup>162</sup> Douche-Aourik F, Bourlet T, Mosnier JF, Jacques J, Decoene C, Stankowiak C, Pozzetto B, Andréoletti L. Association between enterovirus endomyocardial infection and late severe cardiac events in some adult patients receiving heart transplants. *J Med Virol.* 2005; 75: 47-53.

<sup>163</sup> Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. A geographical mystery: do cardiotropic viruses respect national borders? *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52: 82; author reply 82-3.

<sup>164</sup> Kuethe F, Sigusch HH, Hilbig K, Tresselt C, Glück B, Egerer R, Figulla HR. Detection of viral genome in the myocardium: lack of prognostic and functional relevance in patients with acute dilated cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2007; 153: 850-8.

<sup>165</sup> Klingel K, Sauter M, Bock CT, Szalay G, Schnorr JJ, Kandolf R. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol.* 2004; 193: 101-7.

<sup>166</sup> Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol.* 2012. S1567-1348: 349-8.

<sup>167</sup> Ott L, McClain CJ, Gillespie M, Young B. Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. *Neurotrauma.* 1994; 11: 447-72.

<sup>168</sup> Koudstaal LG, Ottens PJ, Uges DR, Ploeg RJ, van Goor H, Leuvenink HG. Increased intestinal permeability in deceased brain dead rats. *Transplantation.* 2009; 88: 444-6.

- 
- <sup>169</sup> Frustaci A, Calabrese F, Chimenti C, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Lone hepatitis C virus myocarditis responsive to immunosuppressive therapy. *Chest*. 2002; 122: 1348-56.
- <sup>170</sup> Matsumori A, Matoba Y, Sasayama S. Dilated cardiomyopathy associated with hepatitis C virus infection. *Circulation*. 1995; 92: 2519-25.
- <sup>171</sup> Matsumori A, Matoba Y, Nishio R, Shioi T, Ono K, Sasayama S. Detection of hepatitis C virus RNA from the heart of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 222: 678-82.
- <sup>172</sup> Matsumori A, Yutani C, Ikeda Y, Kawai S, Sasayama S. Hepatitis C virus from the hearts of patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Lab Invest*. 2000; 80: 1137-42.
- <sup>173</sup> Grumbach IM, Heermann K, Figulla HR. Low prevalence of hepatitis C virus antibodies and RNA in patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Cardiology*. 1998; 90: 75-8.
- <sup>174</sup> Rong Q, Huang J, Su E, Li J, Li J, Zhang L, Cao K. Infection of hepatitis B virus in extrahepatic endothelial tissues mediated by endothelial progenitor cells. *Virology*. 2007; 4: 36.
- <sup>175</sup> Ursell PC, Habib A, Sharma P, Mesa-Tejada R, Lefkowitz JH, Fenoglio JJ Jr. Hepatitis B virus and myocarditis. *Hum Pathol*. 1984; 15: 481-4.
- <sup>176</sup> Mahfoud F, Gärtner B, Kindermann M, Ukena C, Gadomski K, Klingel K, Kandolf R, Böhm M, Kindermann I. Virus serology in patients with suspected myocarditis: utility or futility? *Eur Heart J*. 2011; 32: 897-903.
- <sup>177</sup> Bartunek P, Gorican K, Mrázek V, Varejka P, Veiser T, Hercogová J, Hulínská D, Janovská D. Lyme borreliosis infection as a cause of dilated cardiomyopathy. *Prague Med Rep*. 2006; 107: 213-26.

---

<sup>178</sup> de Leeuw N, Melchers WJ, Balk AH, de Jonge N, Galama JM. Study on microbial persistence in end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.* 1999; 29: 522-5.

<sup>179</sup> Yoshinari NH, Mantovani E, Bonoldi VLN, Marangoni RG, Gauditano G. Doença de Lyme-Símile Brasileira ou Síndrome de Baggio-Yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56: 363-9.

<sup>180</sup> Mantovani E, Costa IP, Gauditano G, Bonoldi VL, Higuchi ML, Yoshinari NH. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40: 443-56.

<sup>181</sup> Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, Hessel A, Penninger JM. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science.* 1999; 283: 1335-9.

<sup>182</sup> Wang G, Burczynski F, Hasinoff B, Zhong G. Infection of myocytes with chlamydiae. *Microbiology.* 2002; 148: 3955-9.

<sup>183</sup> Mavrogeni S, Spargias C, Bratis C, Kolovou G, Markussis V, Papadopoulou E, Constadoulakis P, Papadimitropoulos M, Douskou M, Pavlides G, Cokkinos D. Myocarditis as a precipitating factor for heart failure: evaluation and 1-year follow-up using cardiovascular magnetic resonance and endomyocardial biopsy. *Eur J Heart Fail.* 2011; 13: 830-7.

<sup>184</sup> Berger K, Héroult MC, Danel V, Vincent F, Jacquot C. Cardiogenic shock after ingestion of amphetamines on a ground of *Mycoplasma myocarditis*. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2008; 27: 256-60.

<sup>185</sup> Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17: 697-728.

<sup>186</sup> Higuchi Mde L, Reis MM, Sambiase NV, Palomino SA, Castelli JB, Gutierrez PS, Aiello VD, Ramires JA. Coinfection with *Mycoplasma pneumoniae* and

---

*Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2003; 81: 12-22, 1-11.

<sup>187</sup> Borst A, Box AT, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23: 289-99.

<sup>188</sup> Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. Molecular diagnosis of medical viruses. *Curr Issues Mol Biol.* 2007; 9: 87-102.

<sup>189</sup> Shirali GS, Ni J, Chinnock RE, Johnston JK, Rosenthal GL, Bowles NE, Towbin JA. Association of viral genome with graft loss in children after cardiac transplantation. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1498-503.

<sup>190</sup> Schowengerdt KO, Ni J, Denfield SW, Gajarski RJ, Bowles NE, Rosenthal G, Kearney DL, Price JK, Rogers BB, Schauer GM, Chinnock RE, Towbin JA. Association of parvovirus B19 genome in children with myocarditis and cardiac allograft rejection: diagnosis using the polymerase chain reaction. *Circulation.* 1997; 96: 3549-54.

<sup>191</sup> Guardia AC, Stucchi RS, Sampaio AM, Milan A, Costa SC, Pavan CR, Boin Ide F. Human herpesvirus 6 in donor biopsies associated with the incidence of clinical cytomegalovirus disease and hepatitis C virus recurrence. *Int J Infect Dis.* 2012; 16: e124-9.

<sup>192</sup> Ramos-Vara JA. Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2011; 691: 83-96.

<sup>193</sup> Bonvicini F, Manaresi E, Di Furio F, De Falco L, Gallinella G. Parvovirus b19 DNA CpG dinucleotide methylation and epigenetic regulation of viral expression. *PLoS One.* 2012; 7: e33316.

<sup>194</sup> Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hübinger AM, Schneider B, Fischer HP, Tolba R, Vapalahti O, Vaheeri A, Söderlund-Venermo M, Hedman K. Bioportfolio: lifelong

---

persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103: 7450-3.

<sup>195</sup> Alvarez M, Chueca N, Guillot V, Bernal Mdel C, García F. Improving Clinical Laboratory Efficiency: Introduction of Systems for the Diagnosis and Monitoring of HIV Infection. Open Virol J. 2012; 6:135-43.

<sup>196</sup> Paraskevis D, Beloukas A, Haida C, Katsoulidou A, Moschidis Z, Hatzitheodorou H, Varaklioti A, Sypsa V, Hatzakis A. Development of a new ultra sensitive real-time PCR assay (ultra sensitive RTQ-PCR) for the quantification of HBV-DNA. Virol J. 2010; 7: 57-62.