

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências
Cardiovasculares

**Avaliação Prognóstica de Polimorfismos Genéticos dos Receptores Beta-
Adrenérgicos em Coorte de Pacientes Ambulatoriais
com Insuficiência Cardíaca**

Autor: Roberto Gabriel Salvaro

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Kátia Gonçalves dos Santos

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, março de 2009

Este trabalho foi desenvolvido no Ambulatório de Insuficiência Cardíaca e Transplante e no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o auxílio financeiro do CNPq e FIPE-HCPA.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é o produto de muitas mentes. Sua base foi iniciada pela doutora Andréia Biolo e a partir daquela semente plantada que perfilhou surge esta dissertação. Sou grato a ela e profundamente grato ao professor doutor Luis Eduardo Paim Rohde, pela confiança, paciência, compreensão, ensinamentos, disponibilidade, dedicação e principalmente pelo exemplo. Da mesma forma, e não menos intensamente, sou grato à professora Doutora Kátia Gonçalves dos Santos. Sem a competência, dedicação, paciência e carinho da professora, eu nunca teria terminado este trabalho.

Pelo desenvolvimento e produção deste trabalho sou também imensamente grato a todas as pessoas que contribuíram de várias maneiras, principalmente:

Mestrandas Daiane Silvello, Nidiane Martinelli e Carolina Cohen pelo árduo e incansável trabalho no laboratório.

Médicos Residentes Aníbal Borges e Rafael Seewald, doutorandos Pedro Píccaro e Alberto Treiguer, acadêmicos Jerônimo Oliveira e Fabian Berth. Cada um de vocês sabe o quanto foi importante nesta construção.

Doutor Fábio Michalski Velho, colega de residência, de mestrado e amigo, pela parceria de sempre.

Alunas de iniciação científica e bolsistas de apoio técnico do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do HCPA, Vanessa La Porta, Paula Marson, Alice Ribeiro e Daniela Fraga. A dedicação e paciência de vocês também foram fundamentais.

Graziella Aliti, Daniela Rivera Domingues e demais enfermeiras do Grupo de Insuficiência Cardíaca do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela dedicação na coleta do sangue e pela parceria no atendimento dos pacientes.

Acadêmicos e preceptores do Ambulatório de Insuficiência Cardíaca do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela compreensão nas interrupções dos atendimentos para a coleta de dados.

Professores, doutora Nadine Clausell e doutor Flávio Dani Fuchs, pelo exemplo de mestres e pelo constante estímulo à pós-graduação.

Pacientes que aceitaram participar da pesquisa, oferecendo-se para contribuir na construção do conhecimento.

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por oferecem uma oportunidade ímpar de crescimento profissional e pessoal.

Deus que sempre está presente nas grandes decisões e dificuldades da minha vida.

Meus pais, a origem de tudo, pelo apoio incansável e principalmente pelo estímulo inicial. Sem isso eu jamais chegaria aqui.

Meus familiares que, mesmo distantes, sempre demonstraram confiança e admiração.

Mais importante que o aprendizado técnico-científico proporcionado pela pós-graduação, foi entender que a interdependência é um valor mais forte que a independência e foi perceber que ter amigos é só alegria.

ÍNDICE

1. Marco Teórico.....	6
1.1. Introdução.....	6
1.2. Preditores Prognósticos na Insuficiência Cardíaca.....	7
1.3. Sistema Adrenérgico e Insuficiência Cardíaca.....	9
1.4. Polimorfismos dos Receptores Adrenérgicos β_1 e β_2	13
2. Racionalização do Estudo.....	21
3. Objetivos.....	24
4. Referências.....	25
5. Artigo Original	
5.1 Abstract.....	35
5.2 Introduction.....	37
5.3 Methods.....	38
5.4 Results.....	40
5.5 Discussion.....	43
5.6 References.....	48
5.6 Figure Legends.....	53
5.7 Tables and Figures.....	54
6. Anexos.....	67

1. Marco Teórico

1.1. Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica que resulta da deterioração da função cardíaca, a qual gera uma série de alterações hemodinâmicas e neuro-humorais secundárias e compensatórias. Tais alterações manifestam-se freqüentemente por dispnéia e fadiga, com redução da capacidade funcional, e por retenção de líquidos, com conseqüente congestão pulmonar e edema periférico (1,2).

Do ponto de vista epidemiológico, a IC representa uma das principais causas de mortalidade no Brasil, sendo também responsável por um número elevado de admissões hospitalares (3). Nos últimos anos, o número de hospitalizações e de mortes por IC nos Estados Unidos aumentou, apesar dos avanços em seu tratamento (4). Em parte, este fenômeno se deve ao aumento da expectativa de vida e ao aumento na incidência e prevalência de pacientes com IC, fato decorrente do melhor tratamento de pacientes com cardiopatia isquêmica (5).

A história natural da IC foi inicialmente descrita no estudo de Framingham, sendo que a taxa de sobrevivência em cinco anos foi de 25% para homens e 38% para mulheres (6). Além disso, mesmo nos ensaios clínicos contemporâneos que, habitualmente excluem os pacientes mais graves, selecionando aqueles com menos co-morbidades, a mortalidade é surpreendentemente alta (7,8). Indubitavelmente diversos avanços terapêuticos têm melhorado o prognóstico de pacientes com IC; porém, a mortalidade anual dos pacientes em classe funcional

III-IV encontra-se em torno de 10-15%, mesmo após o tratamento otimizado (9,10).

1.2. Preditores Prognósticos na Insuficiência Cardíaca

Neste contexto, o entendimento dos aspectos prognósticos da IC sempre foi motivo de intensa investigação científica (11-13). Isto se baseia no conceito lógico e intuitivo, embora pouco comprovado, de que o conhecimento da história natural e dos potenciais fatores de risco relacionados com sua morbi-letalidade seja fundamental para o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas e para priorização de estratégias de tratamento comprovadamente benéficas. Dessa forma, a literatura científica está repleta de estudos observacionais de cunho prognóstico, alguns bem planejados e delineados, outros nem tanto, que oferecem inúmeros preditores clínicos e laboratoriais de risco, presumivelmente de forma independente (11-14). A compilação destas informações, entretanto, por vezes gera mais confusão do que esclarecimento para o cardiologista clínico que simplesmente busca identificar qual paciente terá de fato pior evolução clínica. Uma análise mais detalhada dos diversos estudos prognósticos demonstra resultados habitualmente não consensuais e, algumas vezes, até contraditórios (11,12). As explicações para esta aparente inconsistência são múltiplas. Primeiramente, a complexidade fisiopatológica da síndrome e a profunda inter-relação entre os diversos sistemas regulatórios permitem que inúmeras características clínicas e laboratoriais tenham a capacidade de predizer risco quando analisadas individualmente (11,12). A determinação de quais destes fatores se associam de forma independente com o prognóstico é tarefa complexa

do ponto de vista estatístico, em parte, pela intensa colinearidade entre as diferentes variáveis. Além disso, muitos estudos carecem de poder estatístico adequado e/ou realizam análises retrospectivas de bancos de dados incompletos ou pouco confiáveis, ficando limitados à seleção e identificação dos potenciais preditores de risco. Ainda, a análise retrospectiva de dados derivados de grandes ensaios clínicos, uma estratégia freqüente nesta área de investigação, muitas vezes não traduz de forma fiel a gravidade e as reais características dos pacientes que são atendidos na prática clínica diária.

Análises multivariadas de variáveis clínicas têm ajudado a identificar os preditores mais significantes de sobrevida e modelos prognósticos têm sido desenvolvidos e validados. Até o momento, os preditores independentes mais poderosos do prognóstico de pacientes com IC identificados são a reduzida fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), classe funcional avançada de acordo com a classificação da *New York Heart Association* (NYHA), o consumo máximo de oxigênio (VO_2) diminuído e os elevados níveis plasmáticos de peptídeo natriurético do tipo B (BNP) (11,12,14). Além destes, a hipotensão crônica, taquicardia em repouso, sobrecarga de volume refratária, presença de terceira bulha, grau de turgência venosa jugular, intolerância à terapia farmacológica convencional, grau de hiponatremia, anemia, insuficiência renal e duração do QRS no ECG de 12 derivações também são todos reconhecidos como parâmetros prognósticos (1).

Por fim, nos últimos anos, diversos investigadores têm explorado a instigante possibilidade de que aspectos genéticos poderiam influenciar de forma decisiva no prognóstico da síndrome (15-18). Desta forma, o reconhecimento de

características genéticas associadas a determinadas doenças cardiovasculares tem procurado explicar, em parte, a heterogeneidade observada na manifestação clínica e no comportamento destas doenças (19,20). Particularmente em relação à IC, diversos polimorfismos genéticos têm sido identificados (15-18,21,22).

Os polimorfismos genéticos são mutações que ocorrem com uma frequência maior que 1% na população. Eles podem ter significado funcional ou atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles (ligação). Assim, se um gene próximo a um marcador causa uma doença, todos os indivíduos afetados recebem tanto o gene causador da doença como o marcador (23). Os polimorfismos também são responsáveis pela diversidade humana. Diferentes fenótipos são decorrentes de diferentes alelos do mesmo gene, como, por exemplo, o sistema sangüíneo ABO (24).

A associação de vários polimorfismos com o risco de desenvolvimento, progressão, resposta ao exercício e prognóstico de pacientes com IC tem sido bastante investigada, com resultados não consensuais (15-18).

1.3. Sistema Adrenérgico e Insuficiência Cardíaca

A ativação do sistema adrenérgico tem importância fundamental na gênese e progressão da IC, influenciando no remodelamento cardíaco, no inotropismo e cronotropismo, e estando associada a arritmias ventriculares e morte súbita (25-28). Os níveis de norepinefrina circulante também estão aumentados em pacientes com IC, refletindo a ativação do sistema adrenérgico, que resulta de liberação aumentada e captação reduzida de norepinefrina na fenda sináptica.

Conseqüentemente, em situações crônicas, uma resposta inicialmente adaptativa do sistema adrenérgico torna-se inadequada ou mesmo prejudicial (29, 30). De fato, níveis aumentados de norepinefrina no plasma são associados com gravidade e pior prognóstico na IC (31,32). Para evitar esta situação, mecanismos adaptativos são desenvolvidos para tentar atenuar a resposta adrenérgica. Os receptores adrenérgicos (AR) são a chave para a regulação do sistema adrenérgico e, em situações patológicas, sua função e distribuição são dramaticamente alteradas (25,28). A dessensibilização e *down-regulation* dos AR são os principais mecanismos adaptativos observados na IC. Além disso, a importância clínica da função destes receptores é demonstrada pela resposta terapêutica aos betabloqueadores em pacientes com insuficiência cardíaca (10,30, 33-36).

Existem dois tipos principais de AR: α e β (**Figura 1**). Estes receptores localizam-se na fenda sináptica, tendo posições e funções diferentes. O α_2 -AR, por exemplo, situa-se na região pré-sináptica, isto é, no nervo simpático, e controla a liberação de norepinefrina na fenda (37). Depois de ser liberada, a norepinefrina ativa os β -AR, que estão localizados no cardiomiócito. Os β -AR são receptores transmembrana acoplados à proteína G intracelular. A ligação com as proteínas G estimulatórias (G_s) ativa a adenilato ciclase e com as proteínas G inibitórias (G_i) reduz a sua atividade. Isso modula moléculas responsáveis pela regulação da contração e hipertrofia do cardiomiócito (17,38).

Os β -AR são classicamente divididos em três subtipos (β_1 , β_2 e β_3), existindo um quarto subtipo que não tem sido bem caracterizado. O β_1 -AR é o subtipo dominante em corações normais, representando 70-80% dos β -AR

(16,39,40). Ambos β 1-AR e β 2-AR são acoplados à proteína G estimulatória (G_s) intracelular. A proteína G_s interage com os domínios intracelulares do receptor que, sob ação agonista, dissociam-se do mesmo e estimulam a adenilato ciclase para gerar AMP cíclico. O AMP cíclico ativa vários processos intracelulares incluindo o influxo de cálcio, através dos canais de cálcio tipo L, resultando no aumento do inotropismo e cronotropismo cardíacos (25, 38).

Contudo, diferentemente dos β 1-AR, os β 2-AR acoplam-se a outras vias sinalizadoras além das vias dependentes da proteína G_s . Os β 2-AR podem ligar-se à proteína G inibitória (G_i), com efeito inotrópico negativo, preferencialmente na sua forma fosforilada. Além disso, os β 2-AR parecem modular vários tipos de sinalizações independentes da proteína G e também tem sido descrita a sua associação com um papel anti-apoptótico (38).

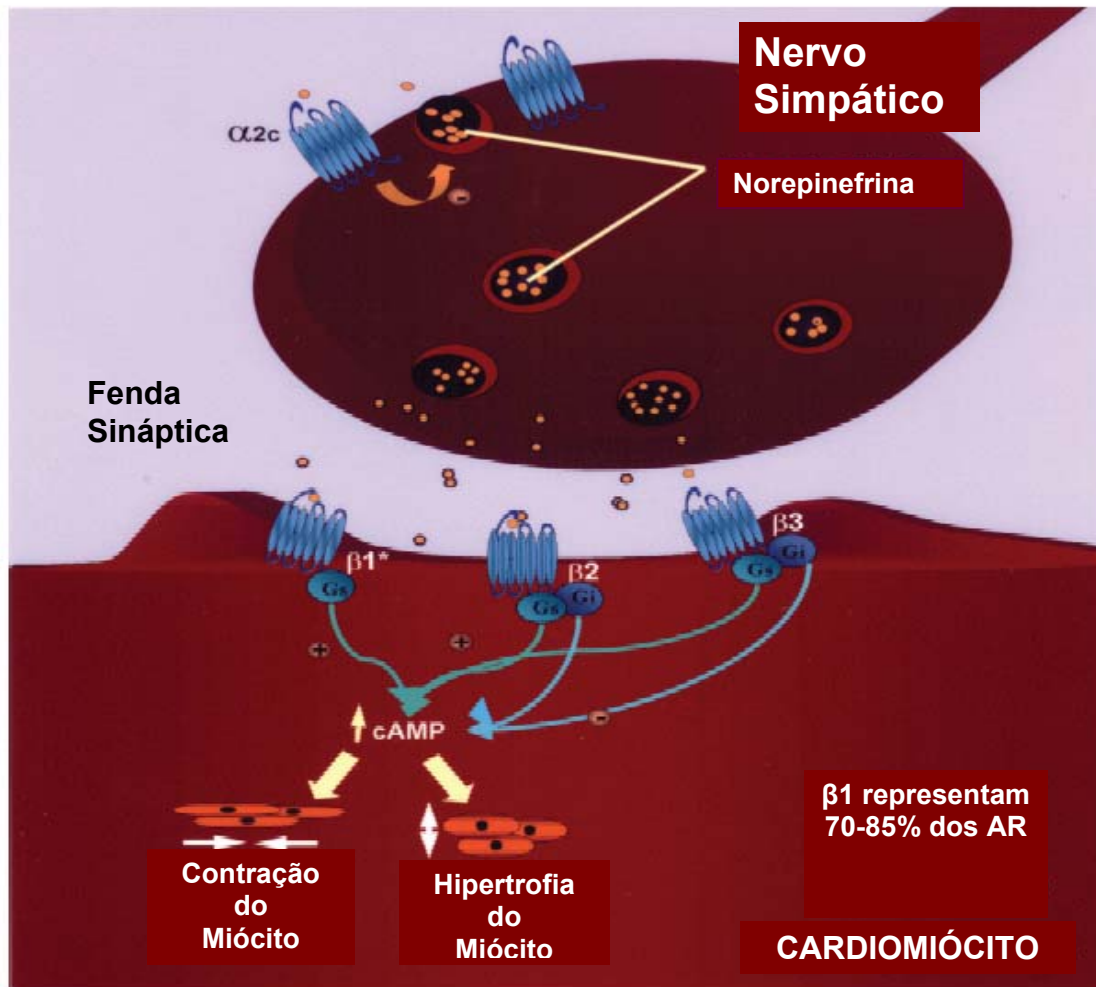


Figura 1. Representação esquemática da fenda sináptica entre o nervo simpático e o cardiomiócito, com os principais componentes da sinalização adrenérgica. A liberação de norepinefrina é regulada pelo receptor pré-sináptico α_{2c} -AR. Depois de ser liberada, a norepinefrina liga-se aos β -AR, que são receptores transmembrana acoplados à proteína G. A ligação com as proteínas G estimulatórias (G_s) ativa a adenilato ciclase e com as proteínas G inibitórias (G_i) reduz a sua atividade. Ambos β_1 e β_2 -AR são normalmente acoplados à proteína G_s , mas o β_2 -AR pode também se acoplar à proteína G_i . A estimulação desses receptores modula moléculas responsáveis pela regulação da contração e hipertrofia do cardiomiócito (Adaptado de Biolo, *et al.* [16]).

Vários polimorfismos nos genes que codificam os AR β 1 e β 2 têm sido identificados e o seu papel na IC está sendo amplamente avaliado (15-18,21,22 39). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que estes polimorfismos podem exercer modulação funcional sobre os receptores e, conseqüentemente, influenciar na ativação ou bloqueio do sistema adrenérgico (17,41,42).

1.4. Polimorfismos dos Receptores Adrenérgicos β 1 e β 2

Mais especificamente, polimorfismos nas posições 145 e 1165 do gene que codifica o β 1-AR e na posição 491 do gene que codifica o β 2-AR têm sido foco de investigações mais detalhadas (15-18).

Polimorfismo β 1 Ser49Gly. O polimorfismo Ser49Gly no gene do β 1-AR resulta da substituição de uma adenina por uma guanina no nucleotídeo 145, levando à substituição de uma serina por uma glicina na posição 49 da proteína, localizada na região extracelular do β 1-AR (42,43) (**Figura 2**). As propriedades funcionais deste polimorfismo foram estudadas *in vitro*, sendo que os β 1-AR com Gly49 apresentam atividade exacerbada, associada a maior inibição por metoprolol, bem como maior dessensibilização e *down-regulation* quando cronicamente estimulados (42). Tem sido especulado que uma alta capacidade regulatória do sistema adrenérgico poderia ser benéfica em pacientes com IC. Em modelos experimentais, a *down-regulation* promovida pela prolongada estimulação foi maior com β 1-AR Gly49, reforçando a idéia que isto pode ser um mecanismo protetor para pacientes com IC (43).

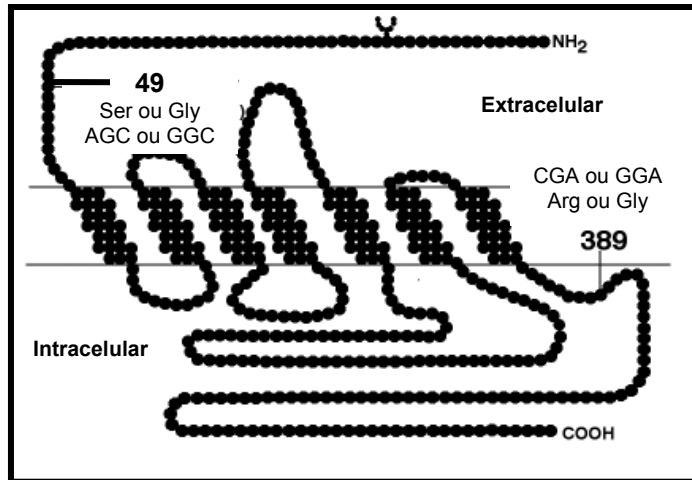


Figura 2. Figura esquemática representando o β 1-AR com os aminoácidos da posição 49 (domínio extracelular) e 389 (domínio intracelular) (Adaptado de White *et al.* [44]).

Um dos primeiros estudos que avaliou a influência deste polimorfismo sobre o prognóstico de pacientes com IC foi uma coorte de 184 pacientes com IC de etiologia idiopática. Neste estudo, Börjesson *et al.* (45) demonstraram, após um seguimento médio de cinco anos, que 62% dos pacientes homocigotos para o alelo Ser49 apresentaram o desfecho morte ou hospitalização, comparados com 39% dos pacientes portadores do alelo Gly49 ($p=0,005$). O genótipo Ser49Ser foi associado a uma tendência a maior risco de morte comparado com os portadores do alelo Gly49 (OR 2,03; IC 95% 0,99-4,16; $p=0,05$). Este efeito protetor do alelo Gly49 também foi observado por Forleo *et al.* (46) em uma coorte semelhante com 171 pacientes. Além disso, Magnusson *et al.* (47) demonstraram que, em pacientes que recebiam dose baixa de betabloqueador (BB), o alelo Gly49 se associou a menor mortalidade comparado com o alelo Ser49. Em pacientes que recebiam uma dose alta de BB, não houve diferença na incidência do desfecho

entre os genótipos. Isso pode ser atribuído a um melhor desfecho dos pacientes homozigotos para o alelo Ser49 tratados com altas doses de BB. Porém, recentemente, duas grandes coortes não encontraram qualquer associação do alelo Gly49 com a sobrevida de pacientes com IC (48,49).

Polimorfismo β 1 Arg389Gly. Este polimorfismo resulta na substituição de um aminoácido arginina por glicina em um sítio crítico para o acoplamento da proteína G. Em modelos bioquímicos (*in vitro*) tem sido demonstrado que o sinal do AMP cíclico produzido pela forma mais comum, isto é, arginina (Arg389), é três vezes superior àquele da glicina (Gly389) (41). Além disso, um estudo recente demonstrou uma clara diferença funcional entre os genótipos dos β 1-AR no tecido ventricular de corações normais. Neste estudo, tecidos com β 1-AR homozigotos Arg389Arg apresentaram maior resposta contrátil ao isoprotenerol do que aqueles que portavam o alelo Gly389 (50). Os receptores homozigotos Arg389Arg, portanto, poderiam ser considerados a forma mais ativa do receptor. Por outro lado, infere-se que os indivíduos portadores do alelo Gly389, menos responsivos, seriam “naturalmente beta-bloqueados”. De fato, um estudo recente publicado por nosso grupo de pesquisa, demonstrou que pacientes com IC homozigotos para o alelo Gly389 tiveram menor incidência de taquicardia ventricular não sustentada na monitorização por Holter do que os pacientes homozigotos para o alelo Arg389 (17% contra 48%, respectivamente; $p=0,015$) (51). Achado semelhante foi observado por Iwai *et al.* (52), no qual o alelo Gly389 foi mais freqüente no grupo sem taquicardia ventricular do que no grupo com taquicardia ventricular (0,46 contra 0,24; $p=0,001$) em pacientes japoneses com miocardiopatia idiopática,

sugerindo que este alelo possa influenciar no risco de morte súbita. Ainda, estudos de interação farmacogenética avaliando o efeito do polimorfismo Arg389Gly sobre o remodelamento ventricular com o uso de betabloqueadores demonstraram que pacientes homozigotos Arg389Arg tratados com tais fármacos tiveram melhora significativa da fração de ejeção do VE, quando comparados com pacientes carreadores do alelo Gly389 (50,53-57). Entretanto, estudos realizados em outras populações com o objetivo de avaliar a possível influência deste polimorfismo no prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca não encontraram associação com mortalidade, hospitalizações ou necessidade de transplante (44,46-49,58).

Polimorfismo β 2 Thr164Ile. Vários polimorfismos no gene do β 2AR também têm sido descritos, sendo que o da posição 164 (Thr164Ile) é um dos mais estudados e com resultados mais intrigantes (**Figura 3**). A maioria dos indivíduos são homozigotos para o alelo Thr164 (96%), o qual torna o receptor mais ativo que a variante Ile164 (59). A presença da variante Ile164, *in vitro* e em ratos transgênicos, resulta na diminuição do acoplamento intracelular do receptor e conseqüente diminuição da função contrátil do miocárdio (60,61). Em um estudo recente, demonstrou-se também reduzida resposta contrátil do miocárdio ao estímulo com agonista β 2-adrenérgico, tanto em corações saudáveis como em pacientes com IC portadores do alelo Ile164 (62).

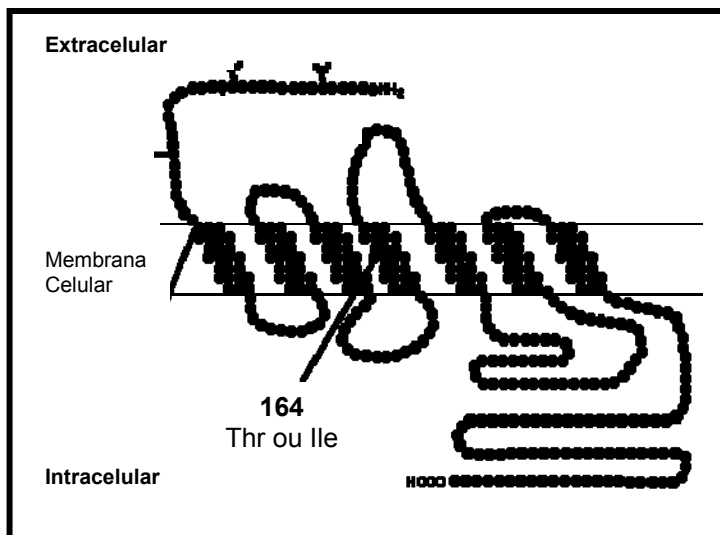


Figura 3. Figura esquemática que demonstra o β 2-AR, ressaltando o aminoácido da posição 164 (localizado na região transmembrana), bem como seus possíveis alelos (Adaptado de Liggett *et al.* [59]).

O impacto prognóstico desta variante foi inicialmente avaliado em uma coorte envolvendo 259 pacientes com IC classe funcional II-IV, de etiologia isquêmica e idiopática, na qual Liggett *et al.* (59) demonstraram que pacientes com o alelo Ile164 apresentaram uma evolução significativamente pior, com sobrevida em um ano de apenas 42% quando comparada a 76% nos pacientes com o genótipo Thr164Thr ($p=0,019$). A variante Ile164 conferiu, portanto, um risco relativo de mortalidade de 4,81 (IC 95% 2,0-11,5; $p<0,001$), ajustado para idade de início dos sintomas, classe funcional e FEVE. Posteriormente, o alelo Ile164 também foi associado a menor capacidade de exercício e maior necessidade de internações em pacientes com IC (62,63). Entretanto, outros dois estudos não confirmaram os achados inicialmente descritos por Liggett *et al.* (46,48). Leineweber *et al.* (64) investigaram se pacientes com IC submetidos a transplante cardíaco apresentariam mais frequentemente o alelo Ile164 que

pacientes com IC estáveis e controles saudáveis. Porém, esta hipótese também não foi confirmada. Soma-se a isto o resultado recente de uma coorte com 451 pacientes neozelandeses com IC, na qual o alelo Ile164 não afetou significativamente a sobrevida (49% nos homocigotos Thr164Thr e 43% nos heterocigotos Thr164Ile, $p=0,66$). Porém, a análise multivariada sugeriu que o tratamento com betabloqueadores pode afetar negativamente a sobrevida nos pacientes heterocigotos (65).

A Tabela 1 demonstra um resumo dos estudos que avaliaram os polimorfismos dos genes dos β -AR e o prognóstico de pacientes com IC.

Tabela 1. Polimorfismos $\beta 1$ Ser49Gly, $\beta 1$ Arg389Gly e $\beta 2$ Thr164Ile dos β -AR e suas implicações no prognóstico de pacientes com IC.

Gene	Polimorfismo	n	População	Etiologia	Resultado Principal	Seguimento	Prognóstico	Referência
$\beta 1$ -AR	Ser49Gly	184	Suecos: 100%	Isquêmica: 15% Idiopática: 85%	Pacientes com o alelo Gly49 tiveram melhor sobrevida livre de morte ou transplante e menor necessidade de hospitalizações.	5 anos	Melhor	Börjesson <i>et al.</i> (45)
$\beta 1$ -AR	Ser49Gly	171	Italianos: 99%	Idiopática: 100%	Pacientes com o alelo Gly49 tiveram melhor sobrevida livre de morte por IC ou transplante e menor necessidade de hospitalizações.	1,4 ano	Melhor	Forleo <i>et al.</i> (46)
$\beta 1$ -AR	Ser49Gly	185	Suecos: 100%	Idiopática: 100%	Em pacientes recebendo dose baixa de BB, o alelo Gly49 se associou a menor mortalidade. Em pacientes recebendo dose alta de BB, não houve diferença no desfecho entre os genótipos.	5 anos	Melhor	Magnusson <i>et al.</i> (47)
$\beta 1$ -AR	Ser49Gly	444	Franceses Caucasianos: 100%	Isquêmica: 43%	Não se observou associação de qualquer um dos alelos com a sobrevida.	3,4 anos	Inalterado	de Groote <i>et al.</i> (48)
$\beta 1$ -AR	Ser49Gly	637	Inglêses Caucasianos: 75%	Isquêmica: 69 % Não-isquêmica: 31%	Não se observou associação de qualquer um dos alelos com a sobrevida.	2,9 anos	Inalterado	Sehnert <i>et al.</i> (49)
$\beta 1$ -AR	Arg389Gly	600	Inglêses e Holandeses Caucasianos: 97%	Isquêmica: 72%	Não se observou associação de qualquer um dos alelos com o prognóstico (mortalidade por todas as causas e hospitalizações).	1 ano	Inalterado	White <i>et al.</i> (44)
$\beta 1$ -AR	Arg389Gly	171	Italianos: 99%	Idiopática: 100%	Não se observou associação de qualquer um dos alelos com o prognóstico (hospitalização, transplante ou morte por IC).	1,4 ano	Inalterado	Forleo <i>et al.</i> (46)

BB, betabloqueador; IC, insuficiência cardíaca.

Tabela 1 (continuação). Polimorfismos β 1 Ser49Gly, β 1 Arg389Gly e β 2 Thr164Ile dos β -AR e suas implicações no prognóstico de pacientes com IC.

Gene	Polimorfismo	n	População	Etiologia	Resultado Principal	Seguimento	Prognóstico	Referência
β 1-AR	Arg389Gly	444	Franceses Caucasianos: 100%	Isquêmica: 43%	Não se observou associação de qualquer um dos alelos com a sobrevida.	3,4 anos	Inalterado	de Groote <i>et al.</i> (48)
β 1-AR	Arg389Gly	637	Inglêses Caucasianos: 75%	Isquêmica: 69% Não-isquêmica: 31%	Não se observou associação de qualquer um dos alelos com a sobrevida.	2,9 anos	Inalterado	Sehnert <i>et al.</i> (49)
β 2-AR	Thr164Ile	259	Americanos Caucasianos: 70%	Isquêmica: 20% Idiopática: 80%	Pacientes com o alelo Ile164 tiveram maior mortalidade e necessidade de transplante.	1 ano	Pior	Liggett <i>et al.</i> (59)
β 2-AR	Thr164Ile	171	Italianos: 99%	Idiopática: 100%	Não se observou associação do alelo Ile164 com o prognóstico (hospitalização, transplante ou morte por IC).	1,4 ano	Inalterado	Forleo <i>et al.</i> (46)
β 2-AR	Thr164Ile	444	Franceses Caucasianos: 100%	Isquêmica: 43%	Não se observou associação do alelo Ile164 com a sobrevida.	3,4 anos	Inalterado	de Groote <i>et al.</i> (48)
β 2-AR	Thr164Ile	31	Belgas Caucasianos: 100%	Idiopática: 100%	Pacientes com o alelo Ile164 mostraram maior incidência de internações e necessidade de aumento na dose de diurético.	2 anos	Pior	Barbato <i>et al.</i> (62)
β 2-AR	Thr164Ile	451	Neozelandeses: 100%	Isquêmica: 37% Não-isquêmica: 63%	O alelo Ile164 não afetou o prognóstico. Porém, pacientes homocigotos Thr164Thr em uso de BB tiveram melhor prognóstico comparados com os pacientes que não estavam usando este tipo de medicamento.	3,1 anos	Inalterado	Littlejohn <i>et al.</i> (65)

BB, betabloqueador; IC, insuficiência cardíaca.

2. Racionalização do Estudo

Como ilustrado anteriormente, os resultados dos estudos que avaliaram individualmente o papel prognóstico dos polimorfismos de receptores adrenérgicos em pacientes com IC não são consensuais. A explicação para a inconsistência destes resultados é motivo de intenso debate entre pesquisadores clínicos, epidemiologistas e geneticistas. Uma análise mais detalhada dos estudos identifica várias diferenças que podem auxiliar, em parte, na elucidação destas discrepâncias. A definição dos desfechos clínicos, o número de pacientes arrolados, a etiologia da IC, o tempo de seguimento clínico e a agregação de genótipos podem alterar substancialmente as análises prognósticas. Em especial, polimorfismos com prevalência muito baixa na população, como a variante Ile164 (β 2-AR), podem ser responsáveis por mudanças significativas na atividade dos receptores, mas são difíceis de serem evidenciadas nos desfechos clínicos. Mesmo que centenas de indivíduos sejam incluídos, a frequência do alelo de risco é muito baixa e mais pacientes são necessários para que essas diferenças possam ser evidenciadas na análise.

Outra explicação possível para estas discrepâncias pode estar relacionada a interações específicas gene-gene e gene-ambiente, que podem ocorrer de acordo com o “background” genético e a origem geográfica da população em estudo. Além disso, acredita-se que o efeito de uma combinação de genótipos, ao invés de um genótipo isolado, esteja, mais provavelmente, relacionada à sobrevivência. Deste modo, a análise de haplótipos (polimorfismos combinados) também está sendo bastante estudada, já que muitos polimorfismos estão em forte desequilíbrio de ligação, isto é, segregam

conjuntamente. Os polimorfismos do gene do β 1-AR, por exemplo, estão em forte desequilíbrio de ligação em caucasianos e afro-americanos, sendo que todos os homozigotos para o alelo Gly389 são também homozigotos para o alelo Ser49, enquanto que o haplótipo Gly49/Gly389 é muito raro (66,67). Small *et al.* (68) estudaram quinze polimorfismos do gene do β 1-AR e encontraram seis haplótipos comuns, além de demonstrarem que a expressão do receptor varia conforme o haplótipo. Recentemente Shin *et al.* (69) encontram associação significativa do haplótipo β 2-AR Arg16Gln17 com o aumento do risco de desfechos adversos, morte e transplante, em pacientes com IC recebendo terapia convencional, entretanto não encontraram associação de outros haplótipos com o prognóstico. Além disso, outra explicação seria a possibilidade de efeito sinérgico entre os polimorfismos. Small *et al.* (70) observaram que os genótipos α _{2c}-AR Del322-325 e β 1-AR Arg389Arg atuam sinergicamente para aumentar o risco de IC em negros e, recentemente, Kardia *et al.* (71) encontraram associação de múltiplos polimorfismos nos genes do α _{2c}-AR e β 1-AR atuando sinergicamente para aumentar o risco de morte e transplante em pacientes com IC.

No Brasil, praticamente inexistem informações sobre as características clínico-epidemiológicas e genéticas de pacientes com IC, e tampouco sobre o papel dos polimorfismos no desenvolvimento e progressão da doença (51,72). Sabe-se que tais características apresentam variação significativa entre populações de diferentes locais do mundo. Sendo assim, o presente trabalho se propõe a investigar a implicação prognóstica de três polimorfismos dos receptores beta-adrenérgicos em uma coorte de pacientes com IC por disfunção

sistólica acompanhados em ambulatório específico em um hospital universitário terciário.

3. Objetivos

Gerais

Avaliar o impacto prognóstico de três polimorfismos do sistema beta-adrenérgico em pacientes com IC por disfunção sistólica.

Específicos

1. Avaliar a associação dos polimorfismos genéticos Ser49Gly e Arg389Gly no gene do β 1-AR e Thr164Ile no gene do β 2-AR com os seguintes desfechos clínicos:
 - a. morte por todas as causas;
 - b. morte por causas cardiovasculares;
 - c. morte relacionada à IC.
2. Avaliar a interação farmacogenética destes polimorfismos com os desfechos citados acima.

4. Referências

1. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (writing committee to update the 2001 guidelines for the evaluation and management of heart failure). *J Am Coll Cardiol* 2005;46:e1-82.
2. Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med* 2003;348:2007-18.
3. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2001/matriz.htm#morb>. Acessado em 17 de setembro de 2008.
4. Hadelman GA, Croft JB, Giles WH, Rashidee A. Hospitalization of patients with heart failure: National Hospital Discharge Survey, 1985 to 1995. *Am Heart J* 1999;137:352-60.
5. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, *et al.* Heart disease and stroke statistics -- 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009;119:480-6.
6. Ho KKL, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: The Framingham study. *J Am Coll Cardiol* 1993;22(suppl A):6A-13A.
7. Ho KLL, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 1993;88:107-15.

8. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1397-402.
9. Eichhorn EJ. Prognosis determination in heart failure. *Am J Med* 2001;110(suppl):14S-36S.
10. Packer M, Coats AJS, Fowler MB *et al.* Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;344:1651-8.
11. Cowburn PJ, Cleland JGF, Coats AJS. Risk stratification in chronic heart failure. *Eur Heart J* 1998;19:696-710.
12. Villacorta H, Mesquita ET. Fatores prognósticos em portadores de insuficiência cardíaca congestiva. *Arq Bras Cardiol* 1999;72:343-52.
13. Jong P, Vowinckel E, Liu PP. Prognosis and determinants of survival in patients newly hospitalized for heart failure. *Arch Intern Med* 2002;162:1684-94.
14. de Groote P, Dagorn J, Soudan B, Lamblin N, McFadden E, Bauters C. B-type natriuretic peptide and peak exercise oxygen consumption provide independent information for risk stratification in patients with stable congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1584-9.
15. Muthumala A, Drenos F, Elliott PM. Role of β adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail* 2008;10:3-13.
16. Biolo A, Rosa AS, Mazzotti NG, *et al.* The role of adrenergic receptor polymorphisms in heart failure. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:1281-90.
17. Hajjar RJ, MacRae CA. Adrenergic receptor polymorphisms and heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1196-9.

18. Brodde OE. β 1- and β 2-adrenoceptor polymorphisms and cardiovascular diseases. *Fund & Clin Pharmacol* 2008;22:107-25.
19. Robin NH, Tabereaux PB, Benza R, Korf BR. Genetic testing in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:727-37.
20. Larson MG, Atwood LD, Benjamin EJ, et al. Framingham heart study 100K project: genome-wide associations for cardiovascular disease outcomes. *BMC Medical Genetics* 2007;8(Suppl1):S5.
21. Kitsios G, Zintzaras E. Genetic variation associated with ischemic heart failure: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2007;166:619-33.
22. Balieiro HM, Brito SRS, Brandão R, Bernardez S, Mesquita ET. O avanço do polimorfismo gênico na insuficiência cardíaca. *Rev SOCERJ* 2008;21:247-53.
23. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928-33.
24. Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001;98:1585-93.
25. Brodde OE, Bruck H, Leineweber K. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci* 2006;100:323-37.
26. Brum PC, Rolim NPL, Bacurau AVN, Medeiros A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An Acad Bras Cienc* 2006;78:485-503.

27. Lefkowitz RJ, Rockman HA, Koch WJ. Catecholamines, cardiac β -adrenergic receptors and heart failure. *Circulation* 2000;101:1634-7.
28. Brodde OE, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T. Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol* 2001;96:528-38.
29. Esler M, Kaye D, Lambert G, Esler D, Jennings G. Adrenergic nervous system in heart failure. *Am J Cardiol* 1997;80:7L-14L.
30. Bristow M. Antiadrenergic therapy of chronic heart failure: surprises and new opportunities. *Circulation* 2003;107:1100-2.
31. Floras JS. Sympathetic activation in human heart failure: diverse mechanisms, therapeutic opportunities. *Acta Physiol Scand* 2003;177:391-8.
32. Port JD, Bristow MR. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:887-905.
33. MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CRyXL in chronic heart failure: metoprolol CRyXL randomised intervention trial in congestive heart failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999;353:2001-7.
34. CIBIS-II investigators. The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999;353:9-13.
35. Krum H, Roecker EB, Mohacsi P, *et al.* Effects of initiating carvedilol in patients with severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS study. *JAMA* 2003;289:712-8.
36. Azuma J, Nonen S. Chronic heart failure: β -blockers and pharmacogenetics. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65:3-17.

37. Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 1999;402:181-4.
38. Chakraborti S, Chakraborti T, Shaw G. Beta-adrenergic mechanisms in cardiac diseases: a perspective. *Cell Signal* 2000;12:499-513.
39. Brodde OE. β -1 and β -2 adrenoceptor polymorphisms: functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses. *Pharmacol Ther* 2008;117:1-29.
40. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, *et al.* Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 1986;59:297-309.
41. Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human b1-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1999;274:12670-4.
42. Levin MC, Marullo S, Muntaner O. The myocardium-protective Gly-49 variant of the β 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem* 2002;277:30429-35.
43. Rathz DA, Brown KM, Kramer LA, Liggett SB. Amino acid 49 polymorphisms of the human beta1-adrenergic receptor affect agonist promoted trafficking. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;39:155-60.

44. White HL, Boer RA, Maqbool A. An evaluation of the beta-1 adrenergic receptor Arg389Gly polymorphism in individuals with heart failure: a MERIT-HF sub-study. *Eur J Heart Fail* 2003;5:463-8.
45. Börjesson M, Magnusson Y, Hjalmarson A, Andersson B. A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J* 2000;21:1853-8.
46. Forleo C, Resta N, Sorrentino S, *et al.* Association of β -adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med* 2004;117:451-8.
47. Magnusson Y, Levin M, Eggertsen R, *et al.* Ser49Gly of β 1-adrenergic receptor is associated with effective β -blocker dose in dilated cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78:221-31.
48. de Groote P, Lamblin N, Helbecque N, *et al.* The impact of beta-adrenoreceptor gene polymorphisms on survival in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2005;7:966-73.
49. Sehnert AJ, Daniels SE, Elashoff M, *et al.* Lack of association between adrenergic receptor genotypes and survival in heart failure patients treated with carvedilol or metoprolol. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:644-51.
50. Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, *et al.* A polymorphism within a conserved beta1-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:11288-93.
51. Biolo A, Clausell N, Santos KG, *et al.* Impact of β 1-adrenergic receptor polymorphisms on susceptibility to heart failure, arrhythmogenesis,

- prognosis, and response to beta-blocker therapy. *Am J Cardiol* 2008;102:726-32.
52. Iwai C, Akita H, Shiga N, *et al.* Suppressive effect of the Gly389 allele of the β 1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J* 2002;66:723-8.
53. Perez JM, Rathz DA, Petrashevskaya NN, *et al.* Beta1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med* 2003;9:1300-5.
54. de Groote P, Helbecque N, Lamblin N, *et al.* Association between beta-1 and beta-2 adrenergic receptor gene polymorphisms and the response to beta-blockade in patients with stable congestive heart failure. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:137-42.
55. Terra SG, Hamilton KK, Pauly DF, *et al.* Beta1-adrenergic receptor polymorphisms and left ventricular remodeling changes in response to beta-blocker therapy. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:227-34.
56. Chen L, Meyers D, Javorsky, *et al.* Arg389Gly-beta1-adrenergic receptors determine improvement in left ventricular systolic function in nonischemic cardiomyopathy patients with heart failure after chronic treatment with carvedilol. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17:941-9.
57. Ming L, Ying B, Yuan-xi X. Effects of metoprolol on β 1 adrenergic receptor polymorphism and receptor density in urban Chinese patients with heart failure. *Chin Med J* 2007;120:1720-3.
58. Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M. Characterization of a unique genetic variant in the b1-adrenoceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1025-32.

59. Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, *et al.* The Ile164 β 2 adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest* 1998;102:1534-9.
60. Green SA, Cole G, Jacinto M, Innis M, Liggett SB. A polymorphism of the human beta 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem* 1993;268:23116-21.
61. Turki J, Lorenz JN, Green SA, Donnelly ET, Jacinto M, Liggett SB. Myocardial signaling defects and impaired cardiac function of a human beta 2-adrenergic receptor polymorphism expressed in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10483-8.
62. Barbato E, Penicka M, Delrue L, *et al.* Thr164Ile polymorphism of β 2-adrenergic receptor negatively modulates cardiac contractility: implications for prognosis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Heart* 2007;93:856-61.
63. Wagoner LE, Craft LL, Singh B, *et al.* Polymorphisms of the β 2-adrenergic receptor determine exercise capacity in patients with heart failure. *Circ Res* 2000;86:834-40.
64. Leineweber K, Tenderich G, Wolf C, *et al.* Is there a role of the Thr164Ile- β 2-adrenoceptor polymorphism for the outcome of chronic heart failure? *Basic Res Cardiol* 2006;101:479-84.
65. Littlejohn MD, Palmer BR, Richards AM, *et al.* Ile164 variant of β 2-adrenoceptor does not influence outcome in heart failure but may interact with β blocker treatment. *Eur J Heart Fail* 2008;10:55-9.

66. Terra SG, McGorray SP, Wallace MR, Picoult-Newberg L, Pepine CJ, Johnson JA. Linkage disequilibrium of common beta-1 adrenergic receptor polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71:70.
67. Brodde OE, Leineweber K. Beta(2)-adrenoceptor gene polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:267-75.
68. Small KM, Mialet-Perez J, Liggett SB. Genetic variation within the β 1-adrenergic receptor gene results in haplotype-specific expression phenotypes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;51:106-10.
69. Shin J, Lobmeyer MT, Gong Y, et al. Relation of β 2-adrenoceptor haplotype to risk of death and heart transplantation in patients with heart failure. *Am J Cardiol* 2007;99:250-5.
70. Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SLR, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of β 1 and α_{2c} -adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1135-42.
71. Kardia SRL, Kelly RJ, Keddache MA, et al. Multiple interactions between the α_{2c} - and β 1-adrenergic receptors influence heart failure survival. *BMC Medical Genetics* 2008;9:93.
72. Cuoco MAR, Pereira AC, Mota GFA, Krieger JE, Mansur AJ. Polimorfismo genético, terapia farmacológica e função cardíaca seqüencial em pacientes com insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol* 2008;90:274-9.

ARTIGO ORIGINAL

ORIGINAL ARTICLE

**Prognosis Evaluation Based on Aggregated Genetic Polymorphisms of
Beta-receptors in a Cohort of Heart Failure Outpatients**

Salvaro R, Santos KG, Silvello D, Clausell N, Rohde LE

Heart Failure and Cardiac Transplant Unit,
Cardiology Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Post-Graduate Program: Cardiology and Cardiovascular Science
Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT

Objective: Our objective was to evaluate the role of polymorphisms at codons 49 and 389 of the β 1-adrenergic receptor (β 1-AR) and codon 164 of the β 2-adrenergic receptor (β 2-AR) on the outcome in patients with heart failure (HF).

Background: Genetic polymorphisms of adrenergic receptors (ARs) have been associated to the development, progression, and prognosis of HF patients in some studies involving North-American and European populations, but a lack of consensus prevails. Very few studies have addressed the impact of ARs polymorphisms on HF prognosis in Brazilian patients.

Methods and Results: We conducted a prospective study that recruited adult HF patients with left ventricular ejection fraction (LVEF) < 45%, irrespective of functional class or etiology. Genomic DNA was extracted from samples of peripheral blood and ARs genotypes were detected by polymerase chain reaction, followed by restriction fragment length polymorphism analysis. Study sample (n = 316) was composed predominantly by middle-aged Caucasian men, mainly in functional class I-II, with severe LV systolic dysfunction and a mixed etiology profile. During follow-up (median 3 years, interquartile range from 1.4 to 5.1 years), 96 (30%) deaths occurred and 58 (18%) were HF-related. Higher functional class (p=0.001), lower LVEF (p=0.01), greater QRS duration (p<0.001), hyponatremia (p=0.003), renal dysfunction (p=0.01) and anemia (p=0.02) were more common in patients with HF-related deaths than in alive patients. Unexpectedly, Ile164 carriers (n = 12) had no HF-related events (log-rank p value = 0.13) and there was a significant effect of high dose beta-blockade on HF-related survival (log-rank p value = 0.004). No meaningful association was identified between Ser49Gly genotypes and clinical events, neither any

significant drug interaction. All 22 Gly389Gly HF patients were alive at the end of follow-up (log-rank p value = 0.09) and Arg389 carriers using low-dose beta-blockers or non-users had the worst prognosis (log-rank p value = 0.017). The best clinical outcome was observed in HF patients with “favorable” genotypes (Thr164Ile, Gly49Gly or Gly389Gly patients; n = 42; log-rank p value = 0.01) and in those with high-dose beta-blockade. In a Cox proportional hazard model adjusted for clinical characteristics, “unfavorable” genotypes (hazard ratio [HR] 8.2, 95% confidence interval [CI] 1.2-60.8) and low-dose/non-users beta-blockade (HR 3.3, 95% CI 1.0-3.3) remained independent predictors of HF-related deaths.

Conclusions: ARs polymorphisms had a significant impact on prognosis in a Brazilian cohort of HF patients, with important drug interactions. These findings differ substantially from those reported in other populations.

INTRODUCTION

Heart failure (HF) is an important cause of mortality and hospitalizations in Brazil and worldwide (1,2). Despite recent advances in HF medical treatment, mortality rates and morbidity due to this entity remain considerably elevated (3). Identification of prognostic factors is an important aspect of HF management that has been the focus of intense clinical and basic research in the last decades (4,5). In this scenario, activation of the adrenergic system has an essential importance in the genesis and progression of HF. The AS has significant influences in cardiac remodeling, inotropism and chronotropism, besides being associated to ventricular arrhythmia and sudden death (6,7). Adrenergic receptors (ARs) are central for adrenergic system regulation and their function and distribution are dramatically altered in pathologic conditions (8,9). The clinical importance of this system has been demonstrated by the remarkable beneficial therapeutic effect of beta-blockade in HF morbidity and mortality (10-12).

Genetic polymorphisms of ARs have been associated with functional modulation of these receptors with subsequent impact on the adrenergic system (13,14). The association of these polymorphisms with the development, progression, exercise response and prognosis of HF patients has been previously investigated, but a lack of consensus prevails (15,16). In particular, polymorphisms of the β 1-AR at positions 389 and 49 and of the β 2-AR at position 164 have been previously evaluated in North-American, European, Chinese and Japanese populations (17-29). For instance, Liggett *et al* (27) have demonstrated that the Ile164 β 2-AR allele significantly affects the clinical outcome of HF patients. This finding, however, was not supported by other investigators (19,28,29). Very few studies in Brazil have addressed the impact of ARs

polymorphisms on HF prognosis (30,31). In this prospective study, we investigated whether the functionally relevant β 1- and β 2-ARs polymorphisms Arg389Gly, Ser49Gly and Thr164Ile are associated with HF-related mortality in a cohort of Brazilian outpatients.

METHODS

Study Subjects. HF patients were recruited from a tertiary care university hospital in Porto Alegre, Brazil. Consecutive eligible patients who agreed to participate were enrolled at the Heart Failure Clinic between October, 2003 and October, 2007. The eligibility criteria were age \geq 18 years and left ventricular ejection fraction (LVEF) less than 45%, irrespective of functional class or etiology. HF patients due to obstructive or hypertrophic cardiomyopathies were excluded from the present evaluation, as well as patients with reduced life-expectancy. Brazilian Amerindians were not included in this study, but no other ancestry criteria inclusion was *a priori* defined. The racial classification of all participants was self-reported. The study protocol was approved by the local institutional review board and by the National Agency of Ethics in Research and all subjects provided written informed consent. Demographic, clinical, and routine laboratory data from all patients were collected using a structured data form.

Genotyping. Genomic DNA was extracted from samples of peripheral blood using a commercial kit (Puregene; Genra Systems, Minneapolis, USA). The adrenergic receptor genotypes were detected by amplification of genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) using primers under conditions previously described for the Ser49Gly (29), Arg389Gly (32), and Thr164Ile (33)

polymorphisms. The amplified products were digested with *Mva*I, *Eco*0109I and *Mn*I, for Arg389Gly, Ser49Gly and Thr164Ile variants, respectively, following manufacturer recommendations (MBI Fermentas, St. Leon-Rot., Germany). For all polymorphisms, the digested products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel containing ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

Drug Therapy Classification. Drug therapy strata were defined based on the last visit of follow-up or the visit preceding clinical events. Regarding beta-blocker (BB) treatment, patients were classified as high-dose users if they were at or above 50% of target doses as defined by heart failure treatment guidelines (50 mg/day of carvedilol, 150 mg/day of metoprolol tartrate or 200 mg/day of metoprolol succinate) (34). Patients at lower doses or those that did not receive BB were classified as low-dose/non-users. Regarding angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) treatment, patients were classified as high-dose users if they were at or above 50% of target doses as defined by heart failure treatment guidelines (20 mg/day of enalapril or 150 mg/day of captopril) (34). Patients at lower doses or those that did not receive ACEi were classified as low-dose/non-users.

Outcome Evaluation. Enrolled patients were followed-up at the Heart Failure and Transplant outpatient clinic at our institution. Vital status was determined using the last registry assessed in the hospital's electronic database (electronic records since 2000). Telephone contact was attempted for all patients for whom no registry was found in the 4 months prior to follow-up assessment. Vital status was also verified through the State Death Certificate Database. Analyses were

stratified by the presumptive cause of death, classified as (1) all-cause mortality, (2) cardiovascular mortality (from acute coronary syndromes and HF-related) or (3) HF-related, defined as sudden unexpected death (within 1 hour of initiation of symptoms) or caused by advanced refractory disease.

Statistical Analysis. Continuous data are expressed as mean \pm standard deviation or median (interquartile ranges) and categorical variables are expressed as absolute numbers and percentages. Comparison between groups was tested by chi-square, Student's t test, analysis of variance, or nonparametric statistics as appropriate. Allele frequencies were determined by gene counting, and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were verified using the chi-square test. The chi-square test was also used to evaluate the allele and genotype distributions among groups of subjects. Kaplan-Meier survival curves were constructed from the date of entry at the outpatient clinic until the last registry of follow-up or death, and compared by the log-rank statistics. Cox proportional hazard models were created and adjusted for age, left ventricular function, etiology and functional class. A two-tailed p value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical analysis was performed using SPSS version 12.0 or SAS version 9.0 for Windows.

RESULTS

Patients' Characteristics. The present cohort consisted of 316 HF patients whose complete baseline clinical characteristics are shown in Table 1. Study sample was composed predominantly by middle-aged Caucasian men, in functional class I and II and with a mixed etiology profile. Overall, HF patients had

severe LV systolic dysfunction, mild renal failure, and 30% had left bundle branch block. Most patients were using angiotensin converting enzyme inhibitors and beta-blockers.

Clinical Outcomes. During follow-up (median 3 years, interquartile range from 1.4 to 5.1 years), 96 (30%) deaths occurred and 58 (18%) were HF-related. Most clinical characteristics (age, gender, race, HF etiology, clinical comorbidities, and drug use) were not statistically different between patients that remained alive and those who died. Notably, higher *Specific Activity Scale* functional class ($p=0.02$ and $p=0.001$), lower LVEF ($p=0.05$ and $p=0.01$), greater LV diastolic diameter ($p=0.002$ and $p=0.005$) and QRS duration (both $p<0.001$), hyponatremia ($p=0.002$ and $p=0.003$), renal dysfunction ($p=0.001$ and $p=0.01$) and anemia (both $p=0.02$) were more common in HF patients with worst clinical prognosis (p values for total mortality and HF-related deaths, respectively). Also, as demonstrated on Table 1, patients with HF-related deaths reported greater need of drugs such as spironolactone, hidralazine and isosorbide (all p values < 0.01).

ARs genotypes, clinical characteristics and outcomes. The genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium for all ARs polymorphisms in HF patients. The frequencies of minor alleles were 0.02 for β 2-AR Ile164, 0.17 for β 1-AR Gly49 and 0.24 for β 1-AR Gly389. Analysis of genotypes and clinical characteristics are described in Tables 2, 3 and 4. Overall, there were no major significant differences in baseline characteristics among different ARs genotypes, except for QRS duration and

beta-blockers use in Thr164Ile genotypes and race in Ser49Gly genotypes. As previously reported, we also did not identify Ile164 homozygosis in our sample.

Figure 1A depicts the Kaplan-Meier survival curves according to the Thr164Ile genotype for all-cause mortality, cardiovascular mortality and HF-related mortality. Unexpectedly, Ile164 carriers (n = 12) had no HF-related events in our cohort (log-rank p value = 0.13). In survival analysis stratified for drug use, we observed a significant effect of high-dose beta-blockade on HF-related survival but not of high-dose ACE inhibition (Figure 1B).

Figure 2A depicts the Kaplan-Meier survival curves according to the Ser49Gly genotype for all-cause mortality, cardiovascular mortality and HF-related mortality. No meaningful association was identified between this polymorphism and clinical events in our cohort, neither any significant interaction with beta-blockade and ACE inhibition (Figure 2B).

Figure 3A depicts the Kaplan-Meier survival curves according to the Arg389Gly genotype for all-cause mortality, cardiovascular mortality and HF-related mortality. All 22 Gly389Gly HF patients were alive at the end of follow-up (log-rank p value = 0.09). In stratified analysis for drug use, Arg389 carriers using low-dose BB or non-users had the worst prognosis (log-rank p value = 0.017). No such interaction was observed with the intensity of ACE inhibition (Figure 3B).

We further analyzed the effect of aggregating “favorable” ARs genotypes (Thr164Ile, Gly49Gly or Gly389Gly patients) on HF-survival and the potential interaction of the intensity of beta-blockade and ACE inhibition. The best outcome was observed in HF patients with these “favorable” genotypes (n = 42; log-rank p value = 0.01; Figure 4A) and in those with high-dose beta-blockade (Figure 4B). In a Cox proportional hazard model adjusted for other clinical

characteristics, “unfavorable” genotypes (hazard ratio [HR] 8.2, 95% confidence interval [CI] 1.2-60.8) and high-dose beta-blockade (HR 3.3, 95% CI 1.0-3.3) remained independent predictors of HF-related deaths (Table 5).

DISCUSSION

Based on previous studies that demonstrated a potential influence of β -ARs polymorphisms in HF survival (16-30), we evaluated the role of β 2-Thr164Ile, β 1-Ser49Gly and β 1-Arg389Gly ARs polymorphisms in a cohort of Brazilian HF patients with systolic dysfunction who regularly attend a tertiary care university hospital. In this study, higher *Specific Activity Scale* functional class, lower LVEF, greater LV diastolic diameter and QRS duration, hyponatremia, renal dysfunction and anemia were more common in HF patients with worse clinical prognosis. This is consistent with what was demonstrated in other studies and would be expected from predictive models such as the Seattle HF score (4,5,35). It also reinforces the importance of recognizing anemia in this clinical condition (36). Importantly, although we did not observe a significant association of β -ARs polymorphisms with survival when they were individually analyzed, aggregation of an unfavorable genetic profile was independently associated to HF-related events. In addition, a pharmacogenetic interaction between the Arg389Gly and Thr164Ile polymorphisms with the beta-blockade was found. No such interaction was observed in relation to ACE inhibition.

β 2-Thr164Ile Polymorphism. In our cohort, HF patients carrying the β 2-164Ile allele had no HF-related events. This findings contrast dramatically with those from Liggett *et al.* (27) who found that HF patients carrying the Ile164 allele had a significantly increased chance of rapid progression to the endpoints of death or

transplant compared to those homozygous for the Thr164 allele. Littlejohn *et al.* (28) evaluated the Ile164 variant of the β 2-adrenoceptor in a cohort of 451 New Zealander HF failure patients predominately of European heritage. These investigators have demonstrated that the Ile164 polymorphism does not have a major impact on HF prognosis, although multivariate analysis suggested that beta-blocker treatment may negatively impact survival in the heterozygote group. We also observed that patients with the Thr164Thr genotype in use of high-dose beta-blockers had a better prognosis, consistent with that found by Littlejohn *et al.* (28). Interestingly, no interaction between the β 2-164 genotype and ACEi doses was observed. Our findings should be interpreted with caution given that the analysis was based only on 12 heterozygous patients; however, this is inherent in any analysis of a rare polymorphism.

β 1-Ser49Gly Polymorphism. Although previous studies have demonstrated that the Gly49 allele is associated with a favorable outcome in HF patients (18-20), in the present study we did not observe a significant association with survival nor any significant drug interaction, similarly to what was observed in recent studies with a greater number of patients (21,22). In these latter studies, over 1,500 subjects were enrolled and no association with transplantation-free survival was observed. There are several possible explanations for these conflicting results. For example, in the study reported by Börjesson *et al.* (18), selection of patients was based on clinical parameters, and patients with diastolic dysfunction were eligible for inclusion, explaining why their mean LVEF was close to 45%. In addition, only 25% of their patients were treated with ACEi and 39% with beta-

blockers, while in the most recent studies (21,22), including ours, most of the patients received the combination of ACEi and beta-blockers.

β 1-Arg389Gly Polymorphism. Previous studies have found no evident association between the Arg389Gly polymorphism and the survival of patients with HF (17,19,21,22). However, as previously demonstrated by our research group and also in Japanese patients, the Gly389 allele was associated with a lower incidence of non-sustained ventricular tachycardia in 24-hour Holter monitoring (23,30). Interestingly, we observed no HF-related events in patients homozygous for Gly389 allele. These data also suggest a potential protector influence of the Gly389 allele. As observed by Chen *et al.* (24), we also demonstrated a clear pharmacogenetic interaction between carriage of Arg389 allele and beta-blocker doses, with the best outcome associated to high-doses. In addition, Liggett *et al.* (25) has shown a significant pharmacogenetic association in HF survival between bucindolol-treated Arg389 homozygotes and placebo in a recent DNA substudy of 1,040 patients (515 treated) of the BEST trial. Arg389 homozygotes patients' treated with bucindolol had an age-, sex-, and race-adjusted 38% reduction in mortality and 34% reduction in mortality or hospitalization when compared to the placebo group. In contrast, Gly389 carriers had no clinical response to bucindolol compared to placebo. The authors suggest that β 1-AR 389 variation might be used to individualize HF treatment.

In order to increase the study power, we also analyzed the effect of aggregating "favorable" ARs genotypes (patients carrying Thr164Ile, Gly49Gly or Gly389Gly genotypes) on HF-survival and the potential interaction of the intensity of beta-blockade and ACE inhibition. The best outcome was observed in HF

patients with “favorable” genotypes and in those with high-dose beta-blockade, and remained as independent predictors of HF-related mortality, after adjustment for other clinical characteristics. These findings are in accordance to previous studies which observed a beneficial effect of beta-blockers (10-12) and reinforce the potential protector role of specific genotypes (18-20).

Study Limitations. Our study has several limitations. First, it was an observational study, which can introduce unmeasured biases (37). Our study population was heterogeneous compared with other studies that restricted their study patients on the basis of etiology and left ventricular ejection fraction. In addition, the pharmacotherapy was not different according to etiology. Because the purpose of our study was to identify the genetic polymorphisms that can affect the prognosis of HF patients receiving contemporary pharmacotherapy, the exclusion of one etiology might have prevented us to achieve this goal. Therefore, our study is likely to represent the usual management and outcomes of HF.

The contradictory findings from various studies can be explained, at least partly, by ethnic heterogeneity, suggesting that genetically based information can not be totally applicable to patients derived from different geographic and/or genetic origin. Moreover, other explanation for these discrepancies may be related to specific gene-gene or gene-environmental interactions. It is reasonable to hypothesize that the analysis of different clinical outcomes, aggregation of genotypes, population-specific interactions, and the inherent difficulty in defining the onset of HF in an individual patient may be responsible, in part, for the

absence of consensus in relation to the role of ARs polymorphisms in HF prognosis.

Finally, we examined three common coding polymorphisms in β 1-AR and β 2-AR, but we cannot evaluate the possible synergistic effect of these genotypes with others. Kardia *et al.* (38), for example, found association of multiples polymorphisms at α _{2c}-AR e β 1-AR acting synergistic to increase the risk of death and transplantation in patients with HF.

Conclusions. ARs polymorphisms had a significant impact on prognosis in a Brazilian cohort of HF patients, with important drug interactions. These findings differ substantially from those reported in other populations outside Latin America. Elucidating the complexity of the factors that affect the progression of this syndrome need also to take into account genetic factors and warrant future prospective studies to dissect the impact of multiple genes and pathways on treatment response in HF.

REFERENCES

1. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2001/matriz.htm#morb>. Accessed on September 17, 2008.
2. Eichhorn EJ. Prognosis determination in heart failure. *Am J Med* 2001;110(suppl):14S-36S.
3. Packer M, Coats AJS, Fowler MB, *et al*. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;344:1651-8.
4. Villacorta H, Mesquita ET. Fatores prognósticos em portadores de insuficiência cardíaca congestiva. *Arq Bras Cardiol* 1999;72:343-52.
5. Jong P, Vowinckel E, Liu PP. Prognosis and determinants of survival in patients newly hospitalized for heart failure. *Arch Intern Med* 2002;162:1684-94.
6. Lefkowitz RJ, Rockman HA, Koch WJ. Catecholamines, cardiac β -adrenergic receptors and heart failure. *Circulation* 2000;101:1634-7.
7. Brum PC, Rolim NPL, Bacurau AVN, Medeiros A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An Acad Bras Cienc* 2006;78:485-503.
8. Brodde OE, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T. Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol* 2001;96:528-38.
9. Brodde OE, Bruck H, Leineweber K. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci* 2006;100:323-37.
10. MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CRyXL in chronic heart failure: metoprolol CRyXL randomised intervention trial in congestive heart failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999;353:2001-7.

11. CIBIS-II investigators. The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999;353:9-13.
12. Krum H, Roecker EB, Mohacsi P, *et al.* Effects of initiating carvedilol in patients with severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS study. *JAMA* 2003;289:712-8.
13. Hajjar RJ, MacRae CA. Adrenergic receptor polymorphisms and heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1196-9.
14. Brodde OE. β -1 and β -2 adrenoceptor polymorphisms: functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses. *Pharmacol Ther* 2008;117:1-29.
15. Biolo A, Rosa AS, Mazzotti NG, *et al.* The role of adrenergic receptor polymorphisms in heart failure. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:1281-90.
16. Muthumala A, Drenos F, Elliott PM. Role of β adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail* 2008;10:3-13.
17. White HL, Boer RA, Maqbool A. An evaluation of the beta-1 adrenergic receptor Arg389Gly polymorphism in individuals with heart failure: a MERIT-HF sub-study. *Eur J Heart Fail* 2003;5:463-8.
18. Börjesson M, Magnusson Y, Hjalmarsen A, Andersson B. A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J* 2000;21:1853-8.
19. Forleo C, Resta N, Sorrentino S, *et al.* Association of β -adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med* 2004;117:451-8.

20. Magnusson Y, Levin M, Eggertsen R, *et al.* Ser49Gly of β 1-adrenergic receptor is associated with effective β -blocker dose in dilated cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78:221-31.
21. de Groote P, Lamblin N, Helbecque N, *et al.* The impact of beta-adrenoreceptor gene polymorphisms on survival in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2005;7:966-73.
22. Sehnert AJ, Daniels SE, Elashoff M, *et al.* Lack of association between adrenergic receptor genotypes and survival in heart failure patients treated with carvedilol or metoprolol. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:644-51.
23. Iwai C, Akita H, Shiga N, *et al.* Suppressive effect of the Gly389 allele of the β 1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J* 2002;66:723-8.
24. Chen L, Meyers D, Javorsky, *et al.* Arg389Gly-beta1-adrenergic receptors determine improvement in left ventricular systolic function in nonischemic cardiomyopathy patients with heart failure after chronic treatment with carvedilol. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17:941-9.
25. Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, *et al.* A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and β -blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:11288–93.
26. Ming L, Ying B, Yuan-xi X. Effects of metoprolol on β 1 adrenergic receptor polymorphism and receptor density in urban Chinese patients with heart failure. *Chin Med J* 2007;120:1720-3.

27. Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, *et al.* The Ile164 β 2 adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest* 1998;102:1534-9.
28. Littlejohn MD, Palmer BR, Richards AM, *et al.* Ile164 variant of β 2-adrenoceptor does not influence outcome in heart failure but may interact with β blocker treatment. *Eur J Heart Fail* 2008;10:55-9.
29. de Groote P, Helbecque N, Lamblin N, *et al.* Association between beta-1 and beta-2 adrenergic receptor gene polymorphisms and the response to beta-blockade in patients with stable congestive heart failure. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:137-42
30. Biolo A, Clausell N, Santos KG, *et al.* Impact of β 1-adrenergic receptor polymorphisms on susceptibility to heart failure, arrhythmogenesis, prognosis, and response to beta-blocker therapy. *Am J Cardiol* 2008;102:726-32.
31. Cuoco MAR, Pereira AC, Mota GFA, Krieger JE, Mansur AJ. Polimorfismo genético, terapia farmacológica e função cardíaca seqüencial em pacientes com insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol* 2008;90:274-9.
32. Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M. Characterization of a unique genetic variant in the b1-adrenoceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1025-32.
33. Aynacioglu AS, Cascorbi I, Güngör K, *et al.* Population frequency, mutation linkage and analytical methodology for the Arg16Gly, Gln27Glu and Thr164Ile polymorphisms in the b2-adrenergic receptor among Turks. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:761-4.
34. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver

- MA, Stevenson LW, Yancy CW. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (writing committee to update the 2001 guidelines for the evaluation and management of heart failure). *J Am Coll Cardiol* 2005;46:e1-82.
35. Levy WC, Mozaffarian D, Linker DT, *et al.* The Seattle heart failure model: prediction of survival in heart failure. *Circulation* 2006;113:1424-33.
36. Tang WH, Tong W, Jain A, Francis GS, Harris CM, Young JB. Evaluation and long-term prognosis of new-onset, transient, and persistent anemia in ambulatory patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:569-76.
37. Rosenbaum PR. Discussing hidden bias in observational studies. *Ann Intern Med* 1991;115:901-5.
38. Kardina SRL, Kelly RJ, Keddache MA, *et al.* Multiple interactions between the α_{2c} - and β_1 -adrenergic receptors influence heart failure survival. *BMC Medical Genetics* 2008;9:93.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Kaplan-Meier survival curves according to the Thr164Ile genotype for all cause mortality, cardiovascular mortality and HF-related mortality (A). Survival analysis stratified for intensity of beta-blockade and ACE inhibition (B).

Low-dose refers to low-dose or non-users.

Figure 2. Kaplan-Meier survival curves according to the Ser49Gly genotype for all cause mortality, cardiovascular mortality and HF-related mortality (A). Survival analysis stratified for intensity of beta-blockade and ACE inhibition (B).

Low-dose refers to low-dose or non-users.

Figure 3. Kaplan-Meier survival curves according to the Arg389Gly genotype for all cause mortality, cardiovascular mortality and HF-related mortality (A). Survival analysis stratified for intensity of beta-blockade and ACE inhibition (B).

Low-dose refers to low-dose or non-users.

Figure 4. Kaplan-Meier survival curves according to the aggregation of “favorable” adrenergic receptors genotypes (A). Survival analysis stratified for intensity of beta-blockade (B). Low-dose refers to low-dose or non-users.

TABLE 1. Baseline clinical characteristics of HF patients

Characteristics	All Patients N=316	Alive N=220 (70%)	Total Death N=96 (30%)	p¶	HF-related Death N=58 (18%)	p*
Age (years)	54.3 ± 13.0	53.4 ± 13.4	56.5 ± 11.8	0.04	55.0 ± 12.2	0.29
Males	218 (69)	148 (67)	70 (73)	0.32	38 (66)	0.80
Self-reported race						
Caucasian	222 (70)	157 (71)	65 (68)	0.75	41 (71)	0.59
Mixed	45 (14)	31 (14)	14 (15)		6 (10)	
Black	49 (16)	32 (15)	17 (17)		11 (19)	
HF etiology						
Ischemic	118 (37)	76 (35)	42 (44)	0.12	20 (35)	0.98
Hypertensive	75 (24)	53 (24)	22 (23)	0.82	12 (21)	0.59
Chagas Disease	9 (3)	8 (4)	1 (1)	0.29	1 (2)	0.69
Idiopathic	92 (29)	62 (28)	30 (31)	0.58	23 (40)	0.09
Functional class (SAS)						
I and II	242 (78)	177 (82)	65 (70)	0.02	35 (61)	0.001
III and IV	68 (22)	40 (18)	28 (30)		22 (39)	
Comorbidities						
COPD	43 (14)	28 (13)	15 (16)	0.49	8 (14)	0.83
Stroke	26 (8)	11 (5)	15 (16)	0.002	7 (12)	0.07
Liver disease	12 (4)	9 (4)	3 (3)	0.48	3 (5)	0.72
Diabetes mellitus	95 (30)	59 (27)	36 (37)	0.06	17 (29)	0.71
Current smoking	38 (12)	23 (10)	15 (16)	0.19	8 (14)	0.46
Echocardiography						
LVEF (%)	31.3 ± 8.3	31.8 ± 8.1	29.9 ± 8.4	0.05	28.7 ± 8.7	0.01
LVDD (cm)	6.6 ± 0.9	6.5 ± 0.9	6.9 ± 1.0	0.002	7.0 ± 1.4	0.005
LAD (cm)	4.8 ± 0.8	4.7 ± 0.8	4.9 ± 0.8	0.03	5.0 ± 0.8	0.02
PASP (mmHg)	49 ± 13	47 ± 13	52 ± 14	0.02	53 ± 15	0.03
ECG						
Sinus rhythm	235 (76)	164 (76)	71 (74)	0.11	41 (71)	0.03
Atrial fibrillation	57 (18)	42 (19)	15 (16)		9 (16)	
Pacemaker rhythm	18 (6)	9 (4)	9 (9)		8 (14)	
LBBB	92 (30)	56 (26)	36 (38)	0.04	25 (44)	0.01
QRS duration (ms)	129 ± 36	123 ± 33	141 ± 40	<0.001	153 ± 39	<0.001
Laboratory variables						

Creatinine (mg/dL)	1.3 ± 0.5	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.5	0.001	1.4 ± 0.6	0.01
Urea (mg/dL)	57 ± 30	53 ± 26	67 ± 36	0.001	68 ± 39	0.006
Sodium (mEq/L)	140 ± 3.4	141 ± 3.4	139 ± 3.4	0.002	139 ± 3.6	0.003
Potassium (mEq/L)	4.5 ± 0.6	4.4 ± 0.5	4.5 ± 0.6	0.14	4.5 ± 0.5	0.33
Hemoglobin (g/dL)	13.1 ± 1.7	13.3 ± 1.7	12.7 ± 1.8	0.02	12.7 ± 1.7	0.02
Initial drugs						
Beta-blockers	277 (88)	198 (90)	79 (82)	0.05	49 (85)	0.24
ACEi	277 (88)	192 (87)	85 (88)	0.75	51 (88)	0.89
Digoxin	247 (79)	171 (78)	76 (80)	0.77	48 (83)	0.44
Spirolactone	121 (75)	73 (66)	48 (94)	<0.001	29 (91)	0.007
Hidralazine	62 (49)	36 (39)	26 (77)	<0.001	17 (74)	0.003
Isosorbide	75 (60)	41 (47)	34 (90)	<0.001	20 (91)	<0.001
Anticoagulation	63 (20)	46 (22)	17 (18)	0.43	14 (24)	0.68

Values are expressed as mean ± standard deviation or n (%).

SAS - *Specific Activity Scale*; COPD - chronic obstructive pulmonary disease; LVEF - left ventricular ejection fraction; LVDD - left ventricular diastolic diameter; LAD - left atrium diameter; PASP - pulmonary artery systolic pressure; ECG - electrocardiogram; LBBB - left bundle branch block; ACEi - angiotensin converting enzyme inhibitor.

¶ For comparison between total death and alive patients.

* For comparison between HF-related death and alive patients.

TABLE 2. Baseline clinical characteristics according to Thr164Ile genotype

Characteristics	Thr/Thr N=303	Thr/Ile N=12	p
Age (years)	54.5 ± 12.5	53.1 ± 13.7	0.29
Males	209 (69)	8 (67)	0.54
Caucasian	212 (70)	9 (75)	0.83
HF etiology			
Ischemic	116 (38)	2 (17)	0.11
Hypertensive	72 (24)	2 (17)	0.44
Idiopathic	89 (29)	3 (25)	0.52
Functional class (SAS)			
Class I and II	230 (77)	11 (92)	0.47
LVEF (%)	31.0 ± 8.3	32.0 ± 8.7	0.66
ECG			
Sinus rhythm	217 (76)	8 (67)	0.92
Atrial fibrillation	53 (18)	4 (33)	
LBBB	91 (31)	1 (8)	0.08
QRS duration (ms)	131.2 ± 36	104.5 ± 21.7	0.008
Laboratory variables			
Creatinine (mg/dL)	1.3 ± 0.5	1.2 ± 0.2	0.40
Sodium (mEq/L)	140.3 ± 3.4	140.7 ± 5.0	0.83
Hemoglobin (g/dL)	13.1 ± 1.7	12.6 ± 0.9	0.14
Initial drugs			
Beta-blockers	268 (88)	8 (67)	0.05
ACEi	264 (87)	12 (100)	0.37

Values are expressed as mean ± standard deviation or n (%).

SAS - *Specific Activity Scale*; LVEF - left ventricular ejection fraction; ECG - electrocardiogram; LBBB - left bundle branch block; ACEi - angiotensin converting enzyme inhibitor.

TABLE 3. Baseline clinical characteristics according to Ser49Gly genotype

Characteristics	Ser/Ser N=215	Ser/Gly N=85	Gly/Gly N=10	p
Age (years)	54.4 ± 12.8	55.5 ± 12.3	48.7 ± 12.3	0.19
Males	151 (70)	55 (65)	7 (70)	0.65
Caucasian	162 (75)	53 (62)	5 (50)	0.02
HF etiology				
Ischemic	73 (34)	35 (41)	6 (60)	0.15
Hypertensive	47 (22)	25 (29)	2 (20)	0.37
Idiopathic	70 (33)	20 (24)	1 (10)	0.11
Functional class (SAS)				
Class I and II	169 (80)	58 (71)	9 (90)	0.16
LVEF (%)	30.1 ± 8.1	31.2 ± 8.9	36.2 ± 7.7	0.11
ECG				
Sinus rhythm	160 (76)	64 (75)	7 (78)	0.78
Atrial fibrillation	40 (19)	14 (17)	2 (22)	
LBBB	57 (27)	31 (37)	1 (11)	0.14
QRS duration (ms)	129 ± 36	132 ± 36	139 ± 37	0.65
Laboratory variables				
Creatinine (mg/dL)	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.4	0.17
Sodium (mEq/L)	140.5 ± 3.2	140.1 ± 4.1	139.3 ± 2.6	0.70
Hemoglobin (g/dL)	13.2 ± 1.7	12.8 ± 1.4	13.6 ± 1.9	0.24
Initial drugs				
Beta-blockers	192 (89)	71 (84)	8 (80)	0.31
ACEi	190 (88)	72 (85)	9 (90)	0.67

Values are expressed as mean ± standard deviation or n (%).

SAS - *Specific Activity Scale*; LVEF - left ventricular ejection fraction; ECG - electrocardiogram; LBBB - left bundle branch block; ACEi - angiotensin converting enzyme inhibitor.

TABLE 4. Baseline clinical characteristics according to Arg389Gly genotype

Characteristics	Arg/Arg N=178	Arg/Gly N=104	Gly/Gly N=22	p
Age (years)	53.8 ± 13.0	56.6 ± 10.6	49.0 ± 16.0	0.29
Males	118 (66)	76 (73)	17 (77)	0.35
Caucasian	123 (69)	79 (76)	13 (59)	0.28
HF etiology				
Ischemic	109 (61)	71 (68)	12 (54)	0.34
Hypertensive	139 (78)	78 (75)	14 (64)	0.31
Idiopathic	52 (29)	33 (32)	4 (18)	0,45
Functional class (SAS)				
Class I and II	133 (76)	81(79)	19 (86)	0.53
LVEF (%)	31.5 ± 8.5	31.0 ± 8.3	29.0 ± 7.5	0.68
ECG				
Sinus rhythm	134 (77)	75 (73)	16 (76)	0.18
Atrial fibrillation	35 (20)	17 (17)	4 (19)	
LBBB	52 (30)	33 (32)	3 (15)	0.30
QRS duration (ms)	129 ± 35	135 ± 38	121 ± 32	0.41
Laboratory variables				
Creatinine (mg/dL)	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.5	1.3 ± 0.7	0.10
Sodium (mEq/L)	140.4 ± 3.7	140.2 ± 2.8	140.2 ± 4.4	0.69
Hemoglobin (g/dL)	13.2 ± 1.6	13 ± 1.7	13.5 ± 2.1	0.31
Initial drugs				
Beta-blockers	155 (87)	90 (87)	22 (100)	0.19
ACEi	157 (88)	90 (87)	20 (91)	0.83

Values are expressed as mean ± standard deviation or n (%).

SAS - *Specific Activity Scale*; LVEF - left ventricular ejection fraction; ECG - electrocardiogram; LBBB - left bundle branch block; ACEi - angiotensin converting enzyme inhibitor.

TABLE 5. Cox proportional hazard model for HF-related mortality

	Hazard Ratio	95% CI	p
LVEF (for each increment of 1%)	0.98	0.90 - 1.01	0.180
Sodium (for each increment of 1 mEq/L)	0.83	0.80 - 0.90	<0.001
SAS functional class (for each increment of 1 class)	1.40	1.06 - 1.80	0.020
QRS duration (for each increment of 1 ms)	1.01	1.004 - 1.02	0.002
“Unfavorable” genotypes	8.20	1.20 - 60.80	0.039
High-dose beta-blockade	0.50	0.30 - 0.996	0.048

CI - confidence interval; LVEF - left ventricular ejection fraction; SAS - *Specific Activity Scale*.

Figure 1A

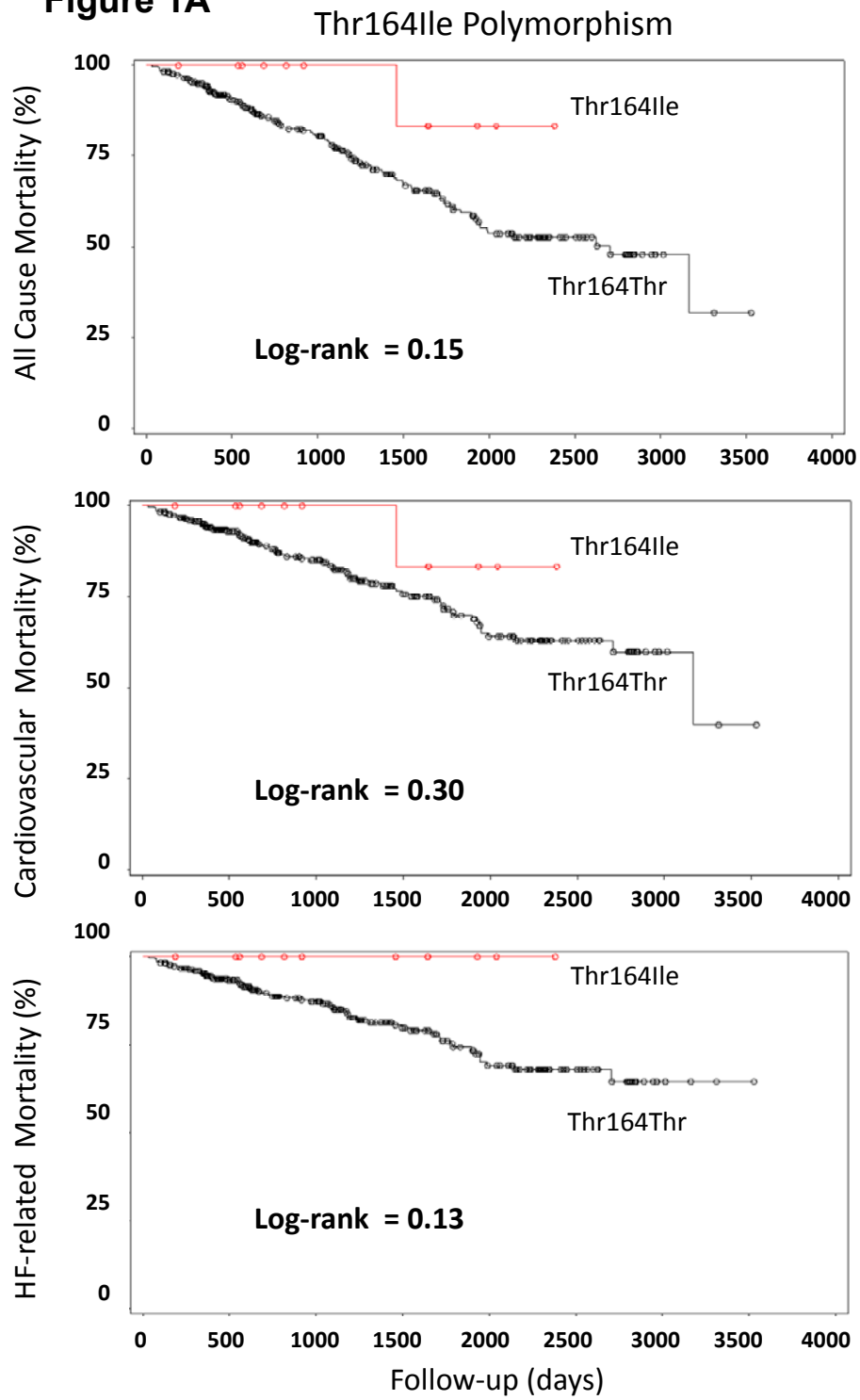


Figure 1B

Thr164Ile Polymorphism
and Drug Interactions

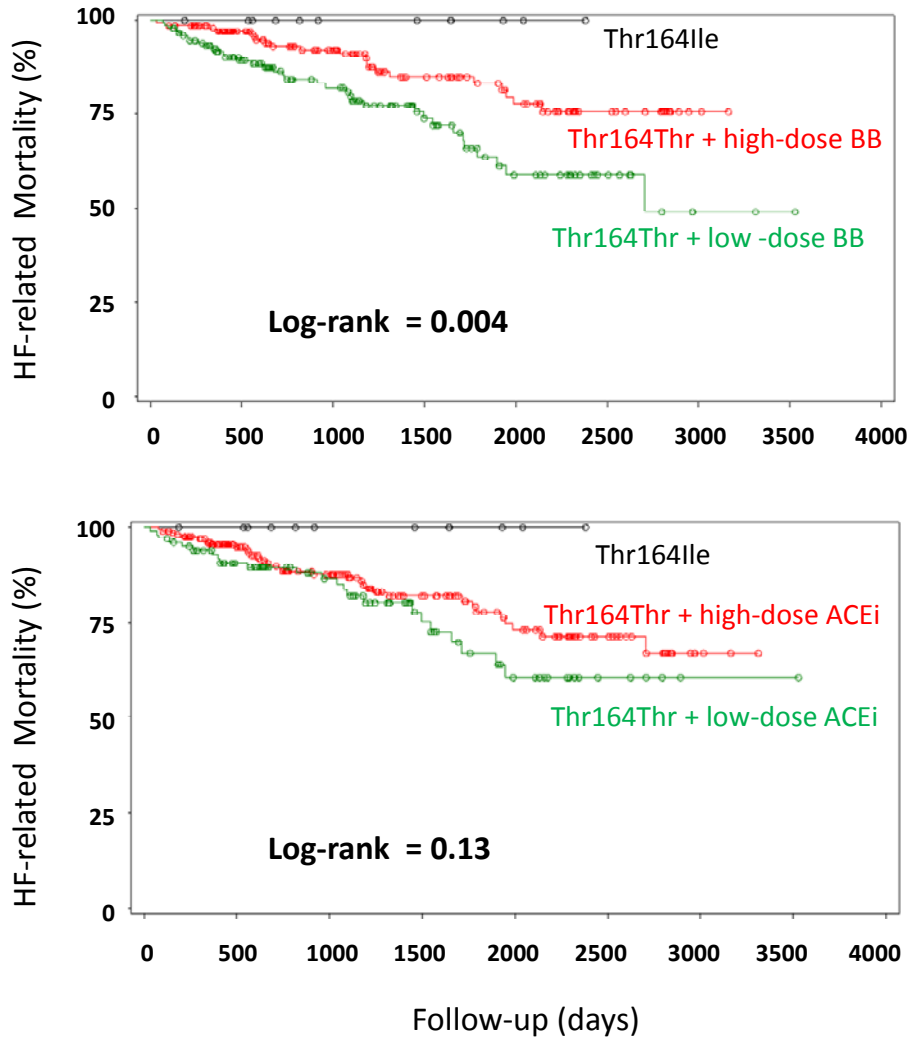


Figure 2A

Ser49Gly Polymorphism

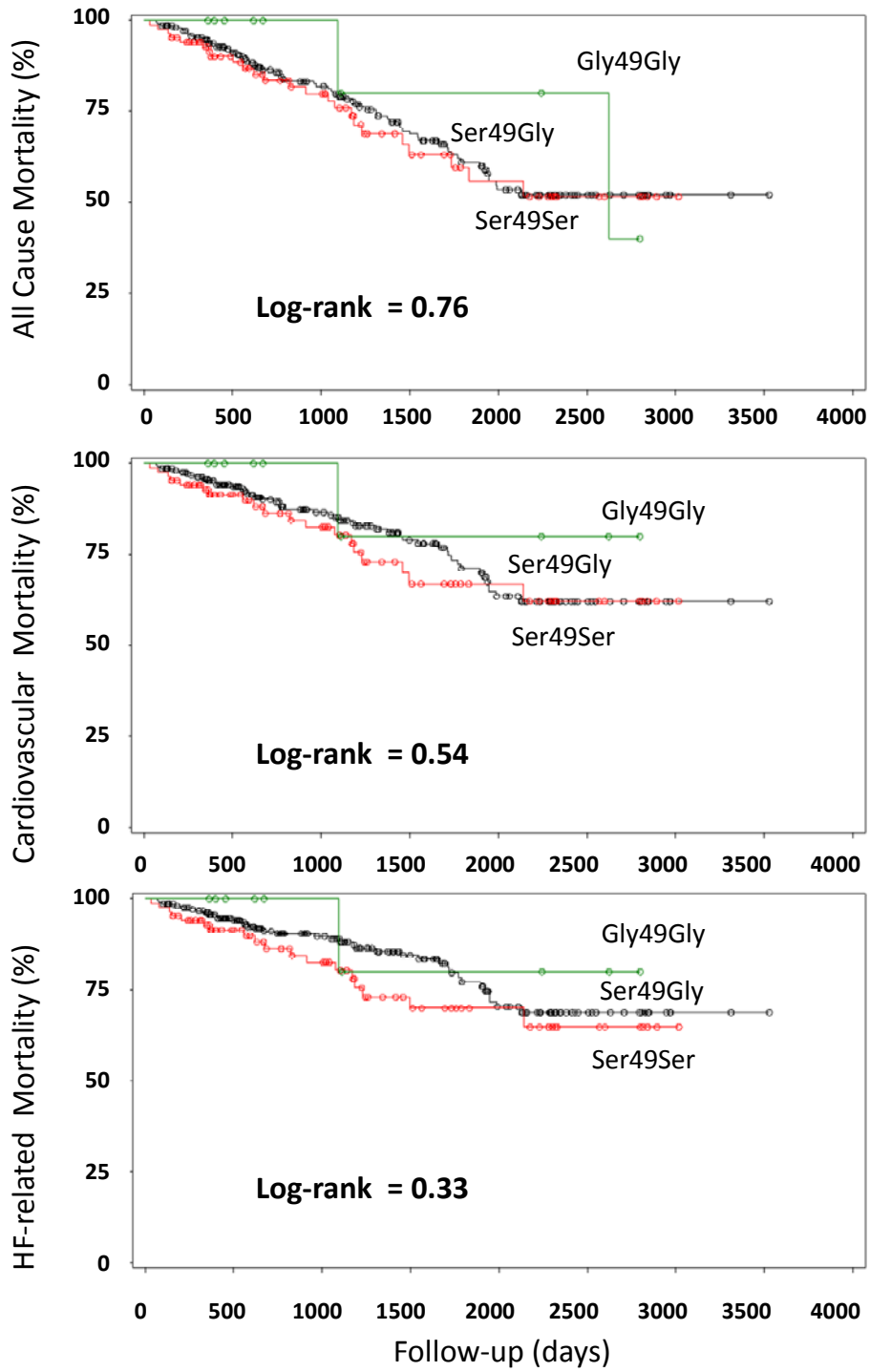


Figure 2B

Ser49Gly Polymorphism
and Drug Interactions

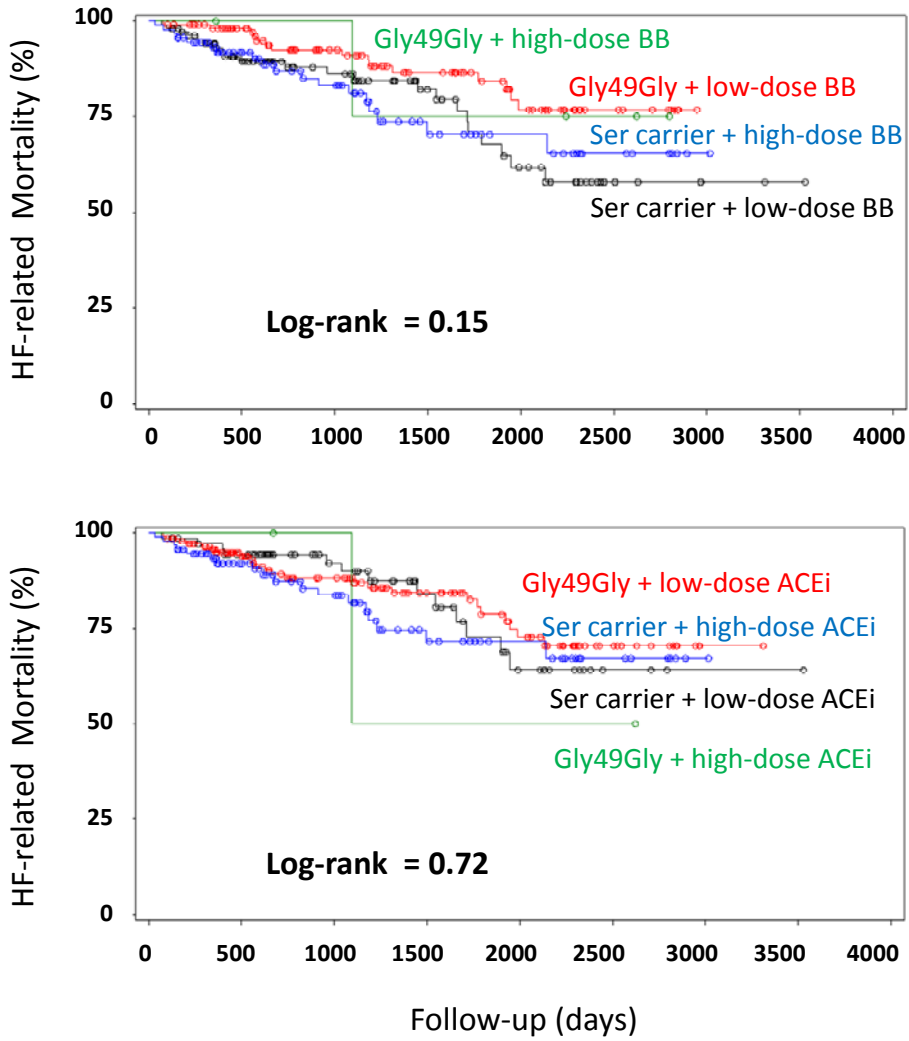


Figure 3A

Arg389Gly Polymorphism

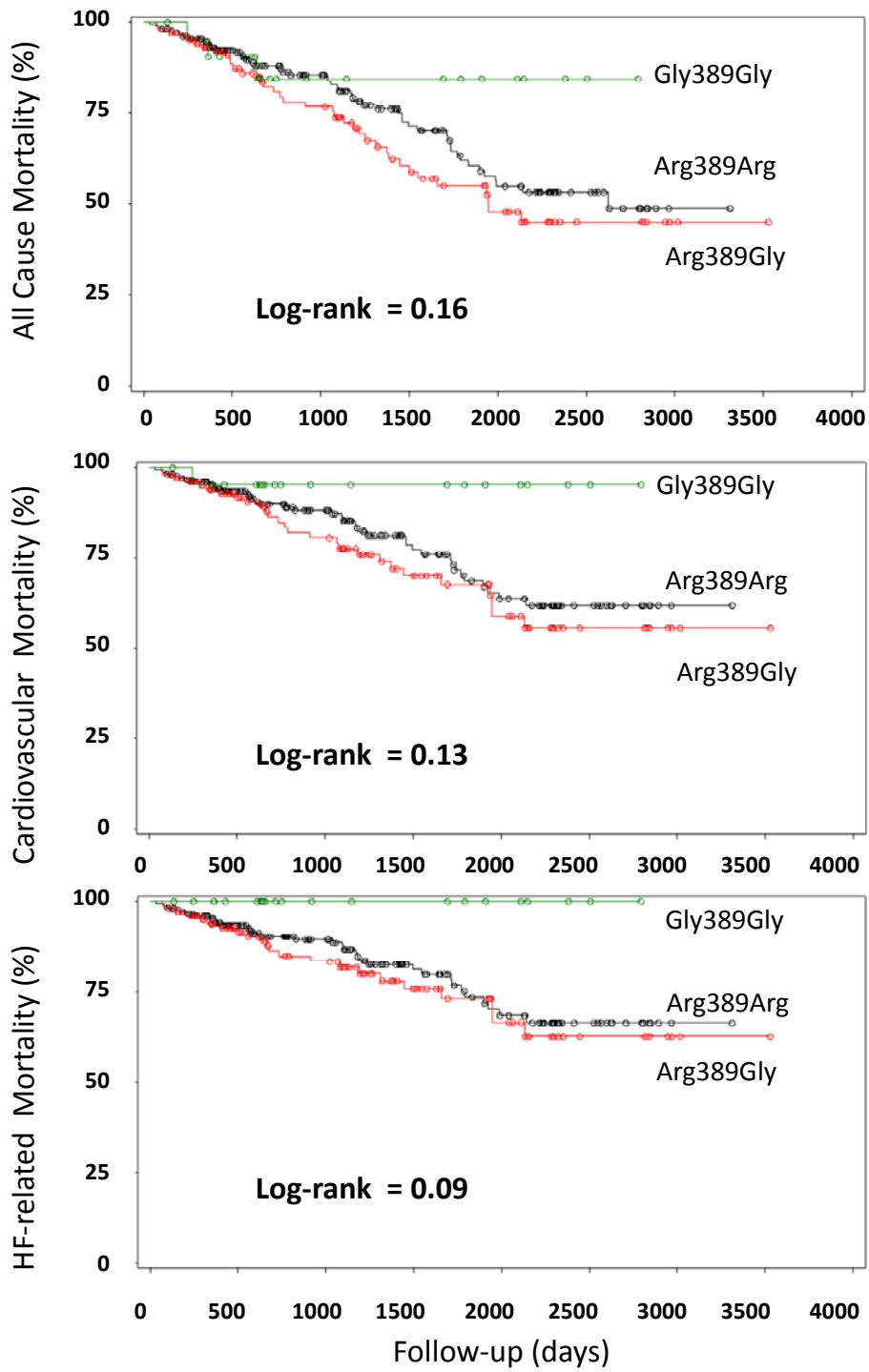


Figure 3B

Arg389Gly Polymorphism
and Drug Interactions

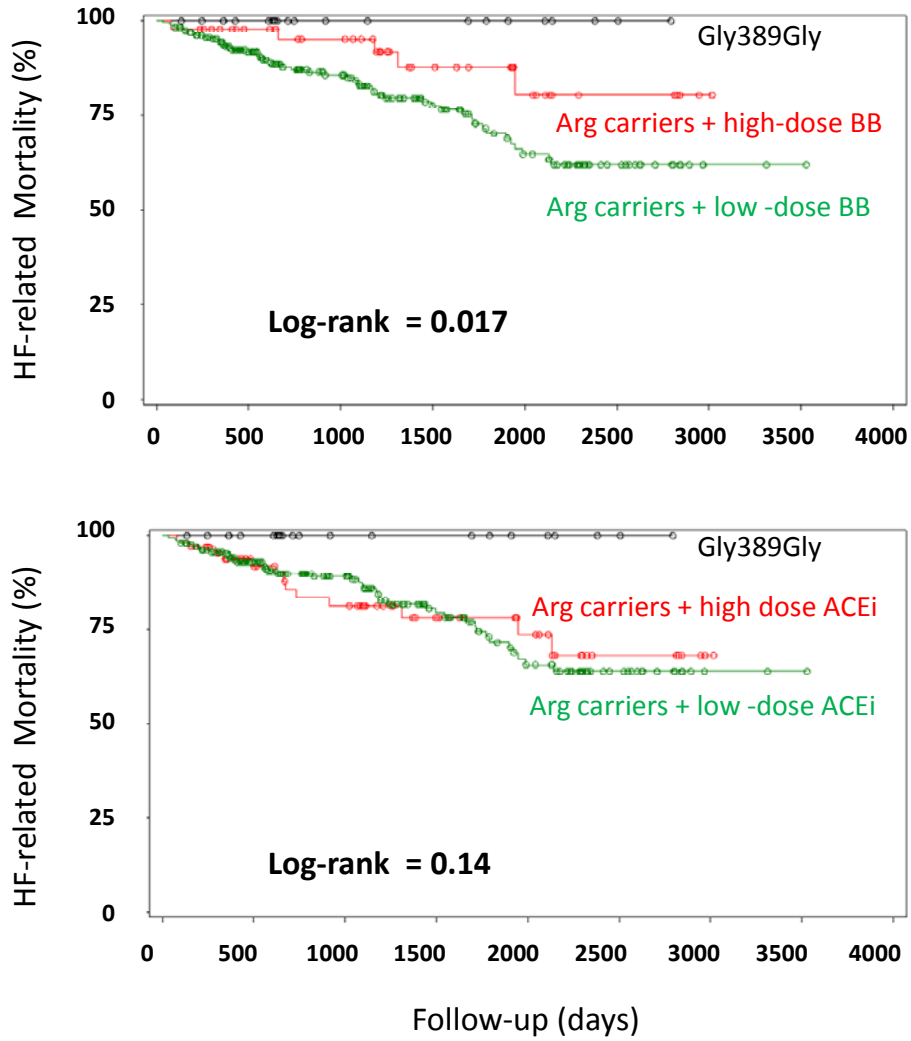


Figure 4A

Aggregated Genotypes
and Drug Interactions

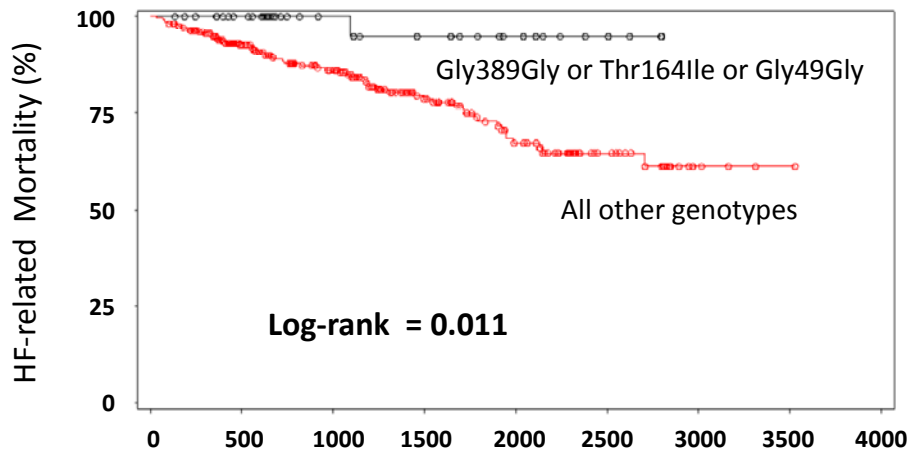
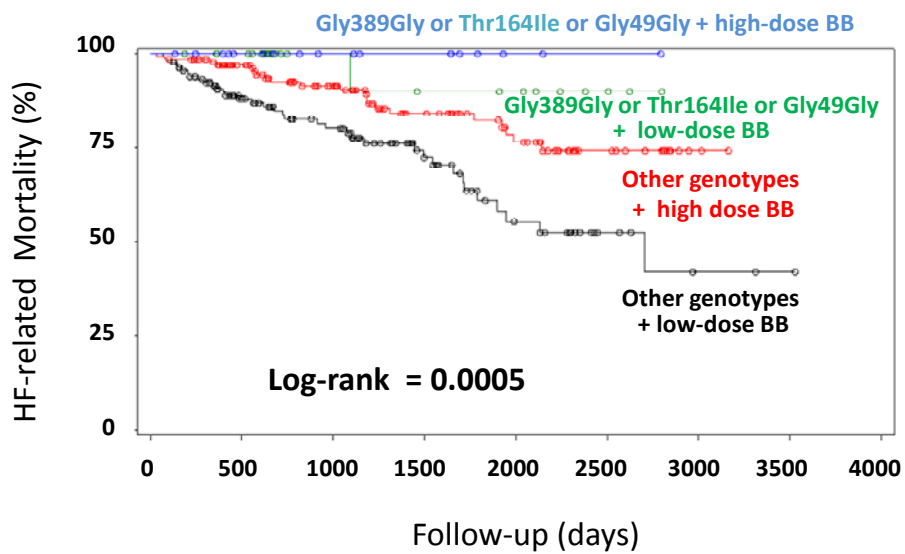


Figure 4B



ANEXOS

Anexo 1. Termo de Consentimento Informado

Prezado Sr/a:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver um problema no coração chamado insuficiência cardíaca. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Como o Sr/a tem insuficiência cardíaca, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue – na ocasião de sua entrada no estudo. Após, estaremos registrando novamente estas informações nas suas próximas consultas. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 3 polimorfismos em genes responsáveis pela regulação da função cardíaca, que podem estar associadas ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca e à forma com que ela se apresenta. Se o Sr/a concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na escolha mais individualizada dos medicamentos, com mais benefícios para os pacientes e menores custos no tratamento da insuficiência cardíaca. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o Sr/a.

O Sr/a é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são o Dr. Luiz Eduardo Paim Rohde, a Dra. Nadine Clausell, a Dra. Andréia Biolo e o Dr. Roberto Gabriel Salvaro (fone para contato com os pesquisadores 21018344), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável:

Nome

Assinatura

Anexo 2. Ficha de Registro Ambulatorial de Pacientes com Insuficiência Cardíaca

GRUPO DE ICC - HCPA

Nome: _____
Prontuário: _____
Endereço: _____
Telefone: 1) _____ 2) _____
Data de nascimento: ___/___/_____
Sexo: () fem () masc
Cor: () branco () pardo () preto

HISTÓRIA
Duração da IC: _____ meses
Idade de início da IC: _____ anos
No. Internações por IC: _____
Etiologia:
() isquêmica
() idiopática
() hipertensiva
() alcoólica
() valvular
() pós-parto
() pós-QMT
() outra: _____

() Cardiopatia isquêmica
() Angina atual () IAM
() CRM () ACTP/stent
() Síncope () AVE
() Vasculopatia periférica
() Marcapasso permanente

() Dislipidemia () Obesidade
() DM () HAS
() Tabagismo: _____ anos-maço
() Tabagismo atual
() Uso abusivo de álcool () Atual

COMORBIDADES CHARLSON
() DPOC () d renal mod/grave
() d. cerebrovascular () neoplasia
() demência () neo metastática
() úlcera péptica () SIDA
() d. tecido conjuntivo () linfoma/leucemia
() d. hepática leve () d. hepática mod/sev
() d. vascular periférica
() DM com lesão em órgão-alvo

REGISTRO GERAL: _____

REGISTRO POLIMORFISMOS: _____

- () **excluído** () etiologia
() FE > 45%
() recusa
() diálise
() SCA últimos 3 meses
() SIDA em uso ARVs
() neoplasia não-curada
() _____

CHECKLIST
() Registro Data: _____
() Coleta Data: _____
() Holter Data: _____
() Ecocardio Data: _____
() Etiologia definida Data: _____
() Seguimento 1 ano Data prevista: _____
() Consulta de seguimento marcada Data da consulta: _____

Anexo 3. Ficha de seguimento clínico.

Óbito: Data ___ / ___ / ___ Causa () _____

Causa do óbito:

1. Morte súbita
2. Progressão da ICC
3. Infarto do miocárdio
4. Outra causa cardíaca
5. Não cardíaca conhecida
6. Desconhecida.

DATA	Tipo do Evento	Causa do evento	Descrição / Observações
Evento/Admissão: ___ / ___ / ___ Alta: ___ / ___ / ___			
Evento/Admissão: ___ / ___ / ___ Alta: ___ / ___ / ___			
Evento/Admissão: ___ / ___ / ___ Alta: ___ / ___ / ___			
Evento/Admissão: ___ / ___ / ___ Alta: ___ / ___ / ___			

Tipo de evento:

1. Visita à Emergência
2. Internação
3. Síncope

Motivo da internação ou visita à emergência / internação:

1. ICC
2. Intoxicação digitalica
3. Síncope
4. IAM com supra
5. IAM sem supra
6. Angina instável
7. Bradiarritmia
8. Taquiarritmia supraventricular
9. Taquiarritmia ventricular
10. Desidratação
11. Outra causa cardíaca
12. Outra causa não cardíaca
13. Desconhecida