

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

**Papel dos Polimorfismos dos Receptores  $\beta$ -Adrenérgicos em Pacientes  
com Insuficiência Cardíaca: Risco de Arritmias Ventriculares Complexas e  
Potenciais Interações Farmacogenéticas**

**Dissertação de Mestrado**

**Andréia Biolo**

**Orientadora: Profa Dra Nadine Clausell**

**Co-orientador: Prof Dr Luis Eduardo Paim Rohde**

**Porto Alegre, setembro de 2005.**

“Antes de ser homem de ciência, é preciso ser homem.”

Albert Einstein

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Pela oportunidade de formular perguntas e buscar respostas,  
por formar cidadãos e cientistas, por ser tão fundamental  
a uma sociedade que precisa de mudanças.

## AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Cardiologia (Coordenação e funcionários) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (em especial Serviços de Cardiologia e Genética e funcionários do Banco de Sangue e dos Ambulatórios), cuja estrutura, capacitação e boa vontade deram suporte para a realização deste trabalho.

Ao Grupo de Insuficiência Cardíaca do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo convívio em ambiente de amizade e aprendizado e pelo auxílio na realização deste trabalho. Em especial, à Enfermeira Eneida Rabello pelo auxílio nas coletas e extrações e à Médica Residente Lívia Goldraich pelo auxílio na revisão final do artigo.

Aos Acadêmicos de Medicina Aline de Souza Rosa, Greice Rampon, Nicolle Gollo Mazzotti, Shanna Martins e Aníbal Pires Borges. A dedicação e o trabalho incansável de vocês nas diversas etapas foram imprescindíveis para concluirmos nosso trabalho.

À Dra Carísi Polanczyk, pela amizade e pela contribuição fundamental à minha formação que as oportunidades de trabalho profissional e científico conjunto têm proporcionado.

À Dra Beatriz Seligman, que pelo exemplo humano e profissional e pela amizade e confiança, tem ajudado a nortear minha trajetória. Ao Dr Renato Seligman, pela confiança, pela amizade e pelo aprendizado constante na convivência profissional.

À Dra Patrícia Prolla, pelo inestimável auxílio em todas as etapas deste trabalho, com paciência, competência e carinho que muito me marcaram. À sua equipe do Laboratório de Pesquisa, em especial a aluna de Doutorado Renata Coura e a Técnica Ingrid, pelo auxílio na realização dos PCRs, etapa fundamental e nova para mim, vencida graças à sua ajuda e dedicação.

Em especial, aos meus orientadores, Dr Luis Rohde e Dra Nadine Clausell, agradeço o convívio destes quase dez anos. Recebi muito mais do que a orientação de um mestrado; aprendi e cresci no convívio com pessoas honestas, competentes, dedicadas ao extremo, que fazem crescer à sua volta a pesquisa, a medicina e as pessoas. Mais do que orientadores e modelos, amigos e pessoas cuja transparência e dignidade tornam tudo mais fácil.

Ao Rohde, pelo exemplo constante de conduta científica e profissional. Pelo rigor e pela exigência, por querer e buscar sempre o melhor. Pela amizade, paciência e presença.

À Nadine, pelo exemplo de competência, simplicidade e trabalho incansável, que juntos fazem tudo parecer (e ser) possível. Pela confiança e incentivo constantes, que tanto me estimularam até aqui.

À minha família, pelo exemplo de que é com trabalho e dignidade que alcançamos nossos objetivos. Pela torcida constante, por compreender e reclamar minha ausência em períodos tão conturbados.

Finalmente, ao Brasil, meu marido, que dá razão a tudo isso. Obrigada pelo amor, pelos sonhos e pela vida que compartilhamos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS: PORTUGUÊS</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS: INGLÊS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ARTIGO DE REVISÃO 1</b> .....	<b>1</b>
THE ROLE OF ADRENERGIC RECEPTOR POLYMORPHISMS IN HEART FAILURE.....	1
<b>ARTIGO DE REVISÃO 2</b> .....	<b>19</b>
O IMPACTO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS E DA FARMACOGENÉTICA NA AVALIAÇÃO E MANEJO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....	19
<b>ARTIGO ORIGINAL: VERSÃO EM PORTUGUÊS</b> .....	<b>25</b>
PAPEL DOS POLIMORFISMOS DOS RECEPTORES $\beta$ -ADRENÉRGICOS EM PACIENTES BRASILEIROS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA: RISCO DE ARRITMIAS VENTRICULARES COMPLEXAS E POTENCIAIS INTERAÇÕES FARMACOGENÉTICAS .....	25
<b>ARTIGO ORIGINAL: VERSÃO EM INGLÊS</b> .....	<b>58</b>
ROLE OF $\beta$ -ADRENERGIC RECEPTOR POLYMORPHISMS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH HEART FAILURE: RISK OF COMPLEX VENTRICULAR ARRHYTHMIAS AND POTENTIAL PHARMACOGENETIC INTERACTIONS .....	58
<b>ANEXOS</b> .....	<b>89</b>
ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (PACIENTES) .....	90
ANEXO II: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (CONTROLES) .....	91
ANEXO III: FICHAS DE REGISTRO E ACOMPANHAMENTO AMBULATORIAL .....	92
ANEXO IV: QUESTIONÁRIO PARA OS CONTROLES.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS: PORTUGUÊS

<b>Arg</b>	Arginina
<b><math>\beta</math>1-Arg389Gly</b>	Substituição de Arginina por Glicina na posição 389 do receptor adrenérgico $\beta$ 1
<b><math>\beta</math>2-Thr164Ile</b>	Substituição de Treonina por Isoleucina na posição 164 do receptor adrenérgico $\beta$ 2
<b><math>\beta</math>1-389Gly</b>	Glicina na posição 389 do receptor adrenérgico $\beta$ 1
<b><math>\beta</math>1-389Arg</b>	Arginina na posição 389 do receptor adrenérgico $\beta$ 1
<b><math>\beta</math>2-164Thr</b>	Treonina na posição 164 do receptor adrenérgico $\beta$ 2
<b><math>\beta</math>2-164Ile</b>	Isoleucina na posição 164 do receptor adrenérgico $\beta$ 2
<b>ECA</b>	Enzima Conversora da Angiotensina
<b>ESV</b>	Extra-Sístoles Ventriculares
<b>FEVE</b>	Fração de Ejeção Ventricular Esquerda
<b>Gly</b>	Glicina
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>Glu</b>	Glutamato
<b>Gly</b>	Glicina
<b>I/D ECA</b>	Polimorfismo Inserção/Deleção da ECA
<b>IC</b>	Insuficiência Cardíaca
<b>IECA</b>	Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina
<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>NYHA</b>	New York Heart Association
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>RAA</b>	Renina-Angiotensina-Aldosterona
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição
<b>SDNN</b>	Desvio-Padrão dos Intervalos R-R Normais
<b>Ser</b>	Serina
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
<b>TVNS</b>	Taquicardia Ventricular Não-sustentada

## LISTA DE ABREVIATURAS: INGLÊS

<b>ACE</b>	Angiotensin-Converting Enzyme
<b>ACE I/D</b>	Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism
<b>AR</b>	Adrenergic Receptor
<b>Arg</b>	Arginine
<b><math>\beta</math>1-Arg389Gly</b>	Arginine to Glycine substitution at codon 389 of $\beta$ 1-AR
<b><math>\beta</math>2-Thr164Ile</b>	Threonine to Isoleucine substitution at codon 164 of $\beta$ 2-AR
<b><math>\beta</math>1-389Gly</b>	Glycine at codon 389 of $\beta$ 1-adrenergic receptor
<b><math>\beta</math>1-389Arg</b>	Arginine at codon 389 of $\beta$ 1-adrenergic receptor
<b><math>\beta</math>2-164Thr</b>	Threonine at codon 164 of $\beta$ 1-adrenergic receptor
<b><math>\beta</math>2-164Ile</b>	Isoleucine at codon 389 of $\beta$ 1-adrenergic receptor
<b>Del322-325</b>	Deletion of aminoacids at positions 322 to 325
<b>Gi</b>	Inhibitory G protein
<b>Gln</b>	Glutamine
<b>Glu</b>	Glutamate
<b>Gly</b>	Glycine
<b>Gs</b>	Stimulatory G protein
<b>HF</b>	Heart Failure
<b>Ile</b>	Isoleucine
<b>LVEF</b>	Left Ventricular Ejection Fraction
<b>NSVT</b>	Non-sustained Ventricular Tachycardia
<b>NYHA</b>	New York Heart Association
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>SDNN</b>	Standard-Deviation of Normal R-R intervals
<b>Ser</b>	Serine
<b>Thr</b>	Threonine
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
<b>VPB</b>	Ventricular Premature Beat

**ARTIGO DE REVISÃO 1**

**The Role of Adrenergic Receptor Polymorphisms in Heart Failure**

Andréia Biolo, Aline de Souza Rosa, Nicolle Gollo Mazzotti,  
Shanna Martins, Luis Eduardo Rohde, Nadine Clausell, Adriane Belló-Klein

*Brazilian Journal of Medical and Biological Research*

(Submetido para publicação)



## Introduction

The main function of cardiac adrenergic system is to regulate myocardial function, whether in pathologic or in physiologic situations.  $\beta$ -adrenergic receptors modulate heart rate and myocardial contractile function, allowing the heart to increase its output by several-fold quickly in response to a number of stimulus. In chronic heart failure, however, long-term activation of  $\beta$ -adrenergic pathways becomes deleterious to the failing heart.<sup>1</sup> This concept has been confirmed by the benefits of taking  $\beta$ -blockers in patients with heart failure.<sup>2-5</sup> The knowledge of specific molecular modifications in the adrenergic system has permitted to understand their role in development and progression of heart failure.<sup>6</sup> Recently, studies of adrenergic receptor polymorphisms focus on their impact in adaptative mechanisms, susceptibilities and pharmacological responses. In this article, we review the adrenergic system function and its maladaptative responses in heart failure (HF). After, we present the major adrenergic receptor polymorphisms and their consequences in risk, progression and prognosis in heart failure. Also, we discuss the possible therapeutic changes that can result of the study of these polymorphisms, speculating about the progress of heart failure treatment by understanding individual genetic characteristics.

### Adrenergic System in the Healthy Heart and Adrenergic Activation

The adrenergic system, or sympathetic autonomous nervous system, is responsible for a variety of adaptative events that occur in response to increases in oxygen and nutrient demands. It consists of nervous structures, neurotransmitters, vasoactive substances, hormones and specific receptors (adrenergic receptors). The heart and peripheral circulation suffer short-term modifications to regulate cardiac output, arterial pressure and bloody flow redistribution. It results from an interaction between superior nervous center and peripheral effector structures. When acutely activated, sympathetic nervous system raises neurotransmitters release, regulating cardiac output, and vasoactive substances, promoting bloody flow redistribution and arterial

pressure modifications.<sup>7</sup> The adrenergic receptors are key signaling elements to regulate the intensity of this activation. (Figure 1)

The cardiac adrenergic receptors (AR) are transmembrane protein of myocardial cells that act by coupling a G-protein that may be excitatory ( $G_s$ ) or inhibitory ( $G_i$ ). They represent the limiting stage of the cardiac response to adrenergic stimulus. When norepinephrine binds an AR, a cascade of events is immediately triggered to obtain an intracellular response. It's a kinase-dependent pathway that regulates the inotropic and chronotropic cardiac response.

There are two principal AR:  $\alpha$  and  $\beta$ .<sup>6,8</sup> The  $\alpha$ -adrenergic receptors ( $\alpha$ -AR) are subdivided into two classes. The postsynaptic  $\alpha_1$ -AR plays a role in hypertrophy and myocardial remodeling and the  $\alpha_2$ -AR is located in the pre-synaptic membrane and its main function is inhibiting norepinephrine release in synaptic gap.<sup>9</sup> The  $\beta$ -AR are classically divided in 3 subtypes, having a fourth subtype not well characterized.  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR stimulation promotes  $G_s$ -protein signaling pathway resulting mainly in positive cardiac inotropism and chronotropism. In the healthy heart,  $\beta_1$ -AR is the predominant subtype (70-80%).<sup>10</sup> Agonist and antagonist affinities are diverse for  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR, having the  $\beta_1$ -AR best affinity for norepinephrine.<sup>11</sup>  $\beta_2$ -AR can bind  $G_i$ -protein in some circumstances, with negative effects on inotropism. The knowledge about  $\beta_3$ -AR is poor. It acts regulating metabolic areas and probably contributes to negative inotropism and myocardial relaxing. It also seems to regulate nitric oxide production.<sup>12</sup>

### **Adrenergic System Maladaptative Changes in Heart Failure**

In conditions that involve contractile cardiac dysfunction, the resultant hemodynamic overload activates several adaptative mechanisms. Thus, in HF with systolic dysfunction, adrenergic activation is an important tool to support cardiac workout at minimal effective levels. The level of circulant norepinephrine is increased in patients with HF and reflects activity of adrenergic system. It results from increased release of norepinephrine as well as reduced uptake.

Nevertheless, in chronic situations, an initially adaptative response of adrenergic system becomes inadequate or even harmful. Actually, norepinephrine plasma levels were related to severity and worse prognosis in HF.<sup>13-15</sup> To avoid the perpetuation of this situation, regulatory mechanisms are developed trying to attenuate adrenergic responses.

Adrenergic receptors are the key for adrenergic system regulation and in pathologic situations their distribution is dramatically altered.<sup>8,16</sup> Desensitization and down-regulation are the principal mechanisms observed in HF for this regulation. Desensitization is the mechanism in which the cell decreases effector responses, despite ligand presence, usually a defect in G-protein coupling. Down-regulation is the reduction in activated receptor quantity in cell membrane. In HF patients, selective  $\beta$ 1-AR down-regulation occurs such that the proportion of  $\beta$ 1: $\beta$ 2-ARs approximates 50:50. In addition, both subtypes are significantly desensitized due to uncoupling of the receptors from their respective signaling pathways. This effect is secondary to increased phosphorylation and up-regulation of  $G_i$ . Phosphorylation of both  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-AR is mediated primarily by increased G-protein-coupled receptor kinase ( $\beta$ -ARK pathway). Moreover,  $\beta$ -AR seems to be involved in regulation of cardiomyocyte apoptosis.<sup>17,18</sup>

In summary, chronic HF generates a situation in which persistent adrenergic activation becomes indispensable to maintain the minimal myocardial work necessary to supply organism requirements. However, the more adrenergic system is activated the higher is its toxicity and the following needs to desensitization, which is obtained through changes in number and function of AR. This adaptative pathway thus stimulates more activation and again myocardial damage, in a vicious and progressive cycle. This *millieu* seems to represent an important factor to the progressive status of myocardial dysfunction and remodeling in HF.

### **Adrenergic Receptor Polymorphisms and Heart Failure**

A polymorphism is a genetic variant that appears in at least 1% of a population, like the human ABO blood groups. By setting the cutoff at 1%, it

excludes spontaneous mutations that may have occurred in — and spread through the descendants of — a single family. As proteins are gene products, polymorphic versions are simply reflections of allelic differences in the gene; that is, allelic differences in DNA.<sup>19</sup> Recently, several polymorphic variants of proteins that constitute adrenergic receptors has been identified, and its role in HF is subject of study.

Since several receptors and regulatory pathways work simultaneously, the final consequence of a single mutation is difficult to predict. Genetic studies in animal models of HF and in HF patients have explored specific adrenergic receptor polymorphisms.<sup>20,21</sup> These studies showed that the polymorphisms alter efficiency of the receptors (by regulating G protein ligation), as well as its sensibility to down-regulation stimuli. Clinical studies have explored the role of these polymorphisms in HF risk, progression and even in the response to therapy. We will discuss the main adrenergic receptor polymorphisms identified and its influence in HF.(Table)

### ***β1-Adrenergic Receptors (β1-AR)***

Two main polymorphisms were identified for the β1-AR, at codons 49 and 389. The β1-Ser49Gly is an adenine to guanine substitution at nucleic acid 145, which results in a serine to glycine substitution in the position of amino acid 49, located in the extra cellular region of the β1-AR.<sup>22,23</sup> Functional properties of this polymorphism were investigated *in vitro*, and β1-49Gly receptors showed greater activity added to greater sensibility to inhibition with metoprolol, as well as greater desensibilization and down-regulation when chronically stimulated.<sup>22</sup> It is speculated that a higher regulating capacity of the adrenergic system could be beneficial and protective for patients with HF. In experimental models, despite similar affinity to agonists and antagonists for β1-49Ser and β1-49Gly variants, the down-regulation promoted by prolonged stimulation was greater for the β1-49Gly, reinforcing the idea that this can be a protective mechanism for patients with HF.<sup>23</sup>

In order to evaluate the influence of this polymorphism in HF risk and prognosis, its prevalence was determined in 184 patients with idiopathic HF and

77 control subjects. Although the prevalence of the polymorphism was similar between patients and controls, the long-term prognosis was better for patients with  $\beta$ 1-49Gly allele (five-year survival 62% *versus* 39% for patients with  $\beta$ 1-49Ser,  $p=0,005$ ).<sup>24</sup> This study is in conformity with speculations of experimental studies, in which the altered function of the receptor with  $\beta$ 1-49Gly allele can result in a myocardial protective effect in patients with HF. These data, however, are not definite, and more studies are necessary in order to better define the role of this polymorphism in HF progression and prognosis.

Another  $\beta$ 1-AR polymorphism is  $\beta$ 1-Arg389Gly, which results from the replacement of Arginine by Glycine in a critical point for G protein coupling, with less affinity for coupling for the  $\beta$ 1-389Gly allele.<sup>25</sup> The allelic prevalence is approximately 70% for  $\beta$ 1-389Arg and 30% for  $\beta$ 1-389Gly.<sup>25,26</sup> In transgenic mice, young Arg389 mice had enhanced receptor function and contractility compared to Gly389 mice. However, older Arg389 mice displayed a phenotypic switch, with decreased  $\beta$ -agonist signaling and cardiac contractility.<sup>27</sup> In fact,  $\beta$ 1-389Arg allele seems to be associated with an increased and hyperactive signaling in initial stages, but it diminishes signaling in later stages, with less receptor binding and ventricular contraction. In addition, Arg389 mice had better hemodynamic response and the ventricular function improvement with beta-blockade, suggesting that this polymorphism can influence the therapeutic response to beta-blockers.<sup>27</sup> Due to these features, a retrospective analysis of MERIT study evaluated the influence of the  $\beta$ 1-389Arg allele in the therapeutic response to beta-blockers in patients with symptomatic HF. However, this analysis did not demonstrate any association with survival or with different response to beta-blockers according to  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism.<sup>26</sup>

To investigate whether this polymorphism represents a risk for the development of HF, Small et al studied 159 patients with HF (ischemic and idiopathic) and 189 controls.<sup>28</sup> There was no increase in risk with  $\beta$ 1-389Arg alone. However, there was a marked increase in risk for HF among black who had concomitantly the  $\beta$ 1-389Arg allele and another polymorphism, related to  $\alpha$ -AR (OR 10.11, 95% CI 2.11 to 48.53). Among white subjects, allele frequencies were too low to permit an adequate assessment of risk. In another study, the

frequency of  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism was determined in 426 patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.<sup>29</sup> Although no association was found with risk or severity of HF, authors speculate that this polymorphism may relate to response to beta-blockade. Further studies are needed to clarify this hypothesis.

The association of  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism with clinical characteristics of HF was also studied. In one study, this polymorphism was a significant determinant of exercise capacity.<sup>30</sup> Patients with  $\beta$ 1-389Gly allele had significantly lower peak oxygen consumption than those with  $\beta$ 1-389Arg, suggesting that early detection of this polymorphism might be useful to identify patients at risk for depressed exercise capacity and therefore candidates for specific tailored therapy.

Since  $\beta$ 1-AR appears to be important in the induction of ventricular tachycardia, the association between the  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism and occurrence of ventricular tachycardia was assessed in Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, and  $\beta$ 1-389Gly allele suppressed the occurrence of this arrhythmia, suggesting a possible decreased sudden death risk associated with this allele.<sup>31</sup> Again, this polymorphism may represent a tool in assessment of risk and in planning specific therapies for HF patients.

### ***$\beta$ 2-Adrenergic Receptors ( $\beta$ 2-AR)***

Regarding  $\beta$ 2-AR, several polymorphisms were described, but the polymorphic variant in amino acid 164 ( $\beta$ 2-Thr164Ile) is the best studied. Most individuals are  $\beta$ 2-164Thr homozygous (95%), which activates more strongly the receptor than the  $\beta$ 2-164Ile variant. In transgenic mice, the presence of  $\beta$ 2-164Ile allele resulted in a worse contractile myocardial function.<sup>32</sup> Liggett et al studied the influence of this polymorphism in 259 patients with idiopathic or ischemic HF in relation to death risk or cardiac transplantation.<sup>33</sup> The 1-year survival patients with the  $\beta$ 2-164Ile allele was 42% compared with 76% for patients harboring wild-type  $\beta$ 2-AR. The authors conclude that patients with  $\beta$ 2-164Ile allele and HF may be candidates for earlier aggressive intervention or

cardiac transplantation (Figure 2). Other polymorphisms of the  $\beta$ 2-AR in this same study ( $\beta$ 2-Arg16Gly and  $\beta$ 2-Gln27Glu) were not associated with HF risk or prognosis.

### ***$\alpha$ -Adrenergic Receptors ( $\alpha$ -AR)***

$\alpha$ -AR are important for regulating noradrenalin release into the synaptic gap, and variations in their function may lead to higher susceptibility to HF. One polymorphism of  $\alpha$ 2c-AR, a deletion of 4 amino acids ( $\alpha$ 2c-Del322-325), results in loss of receptor function, with lower auto-inhibiting activity and higher noradrenalin levels.<sup>34</sup> The deletion was studied in 159 patients with idiopathic or ischemic HF, and it was associated with higher risk of HF in black people.<sup>28</sup> This study demonstrated that polymorphisms of different receptors probably actuate in a synergic way to influence predisposition to HF. When both  $\alpha$ 2c-Del322-325 polymorphism and  $\beta$ 1-Arg389 allele were present in black patients, the risk was increased in approximately 10 times. Characterization of these genotypes may be useful to identify individuals at higher risk for HF and, therefore, candidates for early preventive strategies. Racial differences in allele frequencies remain to be better clarified.<sup>28</sup>

### ***Adrenergic Receptor Polymorphisms and Heart Failure Treatment***

A better understanding of the physiopathologic process involved in HF development and progression has brought dramatic changes in its treatment over last years. The elucidation of the adrenergic system role was one of the most important discoveries. Initially seen as a vital compensatory mechanism, the incessant activation of the adrenergic system started to be faced as one of the greatest villains in the HF progression. With this new paradigm, the adrenergic system blockade became a crucial part in HF treatment.

However, results of some clinical trials allow us to think about this paradigm. While the benefit of beta-blockers is well established, primarily sympatholytic agents seem to have deleterious effects in patients with HF.<sup>35</sup> One example is moxonidine, which increased mortality in patients with HF in the

MOXCON study, an effect primarily attributed to its strong sympatholytic action.<sup>36</sup> Another agent, bucindolol (beta-blocker and sympatholytic), showed loss of benefit in black patients and those in functional class IV, suggesting that certain subpopulations may be more susceptible to the deleterious effects of adrenergic suppression.<sup>37</sup> One hypothesis for these findings is that sympatholytic agents promote removal of adrenergic support, making unfeasible the adrenergic recruiting when necessary to keep cardiac function. With beta-blockers, on the other hand, inhibition can be easily reverted whenever necessary through norepinephrin recruitment.

The altered function of AR and its influence in risk and therapeutic response of HF patients can represent the link between the polymorphisms of AR and certain characteristics in specific populations. An example is the already mentioned study of Small et al, in which the presence of  $\beta 1$ -Arg389 allele and  $\alpha 2c$ -Del322-325 had synergisc effects increasing HF risk in black patients.<sup>28</sup> By the understanding of genetic data about adrenergic system, it can be possible to adjust the treatment to populations of patients more inclined to respond to certain interventions, rather than the current situation (economically unfeasible) of treating a great number of patients to cover a minority who effectively gets some benefit. It is possible to suppose, for instance, that black patients who had higher mortality with bucindolol are the ones with the polymorphism of the  $\alpha 2c$ -AR, who were exposed to much higher levels of norepinephrin, and who lost the adjusting capacity due to its abrupt interruption.<sup>35</sup> The same way, the association of certain polymorphisms to ventricular tachycardia risk and survival can help to select patients for high-cost interventions, such as defibrillator implantation.

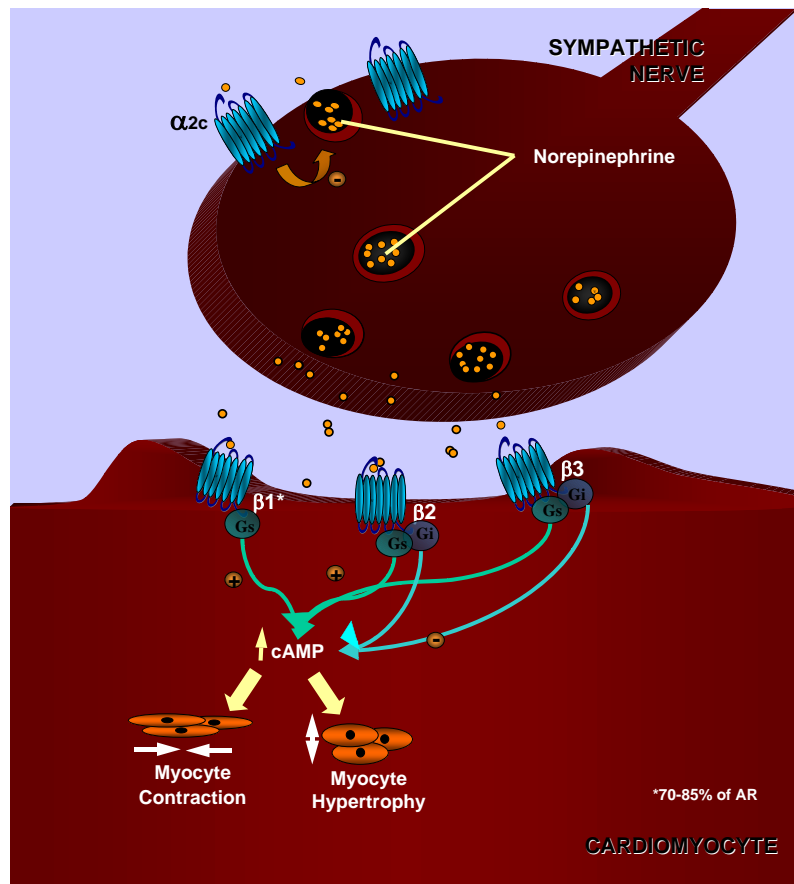
The fact that in a MERIT sub-study no difference related to  $\beta 1$ -Arg398Gly was found in response to beta-blockers, and the synergic action between polymorphisms of different AR in HF risk raises the possibility of the phenotype determination being more likely a result of the interaction between multiple polymorphisms than the influence of an individual polymorphism.<sup>26,28</sup> Besides, the complex influence of the adrenergic system in HF must be considered and understood so that we can advance in the therapeutic approach of this syndrome.



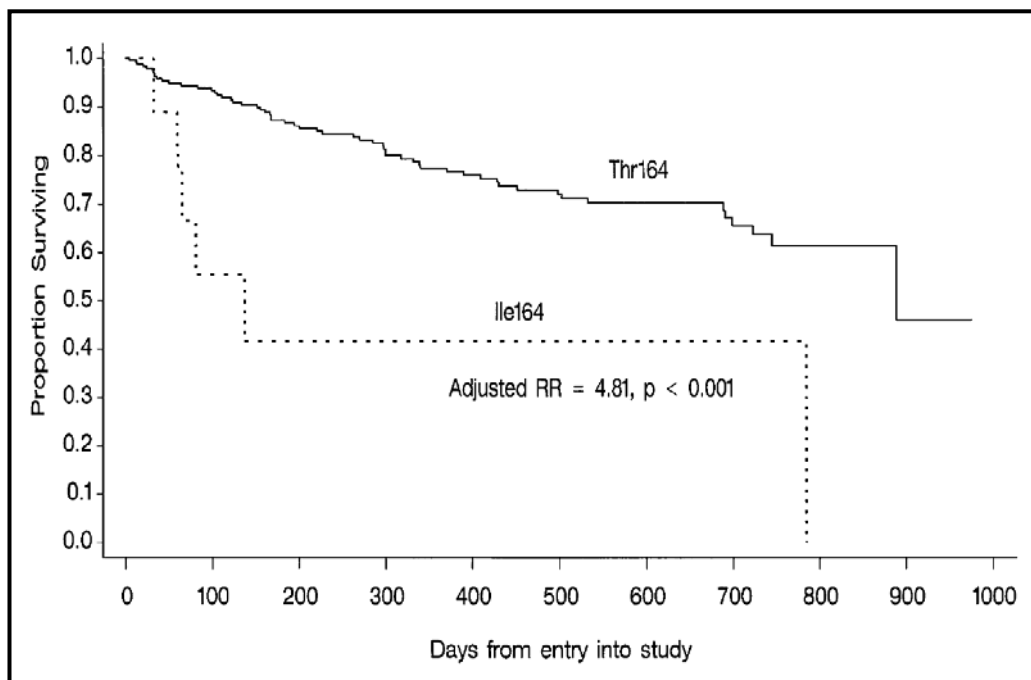
## **Conclusion**

Recently, the role of the adrenergic system (and specifically of AR) in development and progression of HF has been clarified. Genetic studies have provided information about receptor functions and its polymorphisms in the complex balance of this system.

The combination of experimental data and, recently, studies in HF patients bring information and questions that can help the evolution of therapeutic approaches. In addition, new information about the effects of AR polymorphisms can be the basis to pharmacogenetics, which takes in account genetically mediated variability in HF presentation and response to specific medications to define the better individualized approach to HF patients.



**Figure 1.** Principal components of the cardiac adrenergic signaling. AR – Adrenergic Receptor.



**Figure 2.** Survival of patients with HF harboring the wild-type  $\beta$ 2-AR (continuous line) or the  $\beta$ 2-164Ile allele (dotted line). From Liggett SB et al (reference 33), with permission from Journal of Clinical Investigation.

**Table.** Adrenergic receptor polymorphisms and heart failure

<b>Polymorphism</b>	<b><i>In vitro</i> effects</b>	<b>Possible clinical consequences*</b>
<b><math>\beta</math>1-Ser49Gly</b>	Uncertain Exaggerated down-regulation?	Greater regulating capacity of the adrenergic system (22, 23) Better prognosis (24)
<b><math>\beta</math>1-Arg389Gly</b>	Increased function (acutely)	Increased response at cardiomyocyte (25- 27) Poor exercise capacity (30) Increased response to $\beta$ -blockade?(28, 29)
<b><math>\beta</math>2-Thr164Ile</b>	Decreased affinity to G-protein coupling	Worse contractile myocardial function (32) Worse prognosis (33)
<b><math>\alpha</math>2c-Del322-325</b>	Decreased function	Increased norepinephrine release at synapse (34) Increased risk of HF (28)

\* (references about the respective polymorphism). HF – heart failure.

## References

1. ESLER M, KAYE D, LANBERV G, ESLER D & JENNINGS G (1997). Adrenergic nervous system in heart failure. *Am Journal of Cardiology*, 80(11A): 7L-14L.
2. The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS-II) (1999): A randomized trial. *The Lancet*, 353 (9146): 9-13.
3. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL randomized intervention trial in congestive heart failure (MERIT-HF) (1999). *The Lancet*, 353 (9169): 2001-7.
4. KRUM H, ROECKER EB, MOHACSI P, ROULEAU JL, TENDERA M, COATS AJ, KATUS HA, FOWLER MB & PACKER M (2003). Effects of initiating carvedilol in patients with severe heart failure: results from the COPERNICUS study. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 289(6): 712-8.
5. DOMANSKI MJ, KRAUSE-STEINRAUF H, MASSIE BM, DEEDWANIA P, FOLLMANN D, KOVAR D, MURRAY D, OREN R, ROSENBERG Y, YOUNG J, ZILE M & EICHHORN E; BEST Investigators (2003). A comparative analysis of the results from 4 trials of beta-blocker therapy for heart failure: BEST, CIBIS-II, MERIT-HF, and COPERNICUS. *Journal of Cardiac Failure*, 9(5): 354-63.
6. PORT JD & BRISTOW MR (2001). Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(5): 887-905.
7. BRISTOW MR, HERSHBERGER RE, PORT JD GILBERT EM, SANDOVAL A, RASMUSSEN R, CATES AE & FELDMAN AM (1990). Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation*, 82(2 suppl): I12-25.
8. BRODDE OE; BRUCK H; LEINEWEBER K & SEYFARTH T (2001). Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Research in Cardiology*, 96(6): 528-38.

9. HEIN L, ALTMAN JD & KOBILKA BK (1999). Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*, 402(6758): 181-4.
10. BRODDE OE (1988). The functional importance of beta-1 and beta-2 adrenoceptors in the human heart. *American Journal of Cardiology*, 62(5): 24C-9C.
11. BRISTOW MR, GINSBURG R, UMANS V et al. (1986). Beta 1- and 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. *Circulation Research*, 59(3): 297-309.
12. GAUTHIER C, LEBLAIS V, KORBZIK L, TROCHU JN, KHANDOUDI N, BRIL A, BALLIGAND JL & LE MAREE H (1998). The negative inotropic effect of beta3-adrenoreceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *Journal of Clinical Investigation*, 102(7): 1377-84.
13. FLORAS JS (2003). Sympathetic activation in human heart failure: diverse mechanisms, therapeutic opportunities. *Acta Physiologica Scandinavica*, 177(3): 391-8.
14. FRANCIS GS, BENEDICT DE, JOHNSTONE DE, KIRLIN PC, NICKLAS J, LIANG CS, KUBO SH, RUDIN-TORETSKY E & YUSUF S (1990). Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation*, 82(5): 1724-9.
15. COHN JN., LEVINE TB., OLIVARI MT, GARBERG V, LURA D, FRANCIS GS, SIMON AB & RECTOR T (1984). Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *The New England Journal of Medicine*, 311(13): 819-24.
16. RODEFELD MD, BEAU SL, SCHUESSLER RB, BOINEAU JP & SAFITZ JE (1996). Beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor densities in the human sinoatrial node: identification of a high beta-2-adrenergic receptor density. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 7(11): 1039-49.

17. COMMUNAL C, SINGH K, SAWYER DB & COLUCCI WS (1999). Opposing effects of beta1- and beta2-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation*, 100(22): 2210-2.
18. COMMUNAL C, SINGH K, PIMENTEL DR & COLUCCI WS (1998). Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation*, 98(13):1329-34.
19. KIMBALL JW. Kimball's Biology Pages, 2004. [<http://home.comcast.net/~john.kimball1/BiologyPages/>]. Accessed December 12, 2004.
20. TURKI J, LORENZ JN, GREEN AS, DONNELLY ET, JACINTO M & LIGGETT SB (1996). Myocardial signaling defects and impaired cardiac function of a human beta 2-adrenergic receptor polymorphism expressed in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93(19): 10483-8.
21. MCGRAW DW, FORBES SL, KRAMER LA & LIGGETT SB (1998). Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta 2-adrenergic receptor regulate receptor expression. *Journal of Clinical Investigation*, 102(11): 1927-32.
22. LEVIN MC, MARULLO S, MUNTANER O, ANDERSSON B & MAGNUSSON Y (2002). The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(34): 30429-35.
23. RATHZ DA, BROWN KM, KRAMER LA & LIGGETT SB (2002). Amino acid 49 polymorphisms of the human beta 1-adrenergic receptor affect agonist-promoted trafficking. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 39(2): 155-60.
24. BORJESSON M, MAGNUSSON Y, HJALMARSON A & ANDERSON B (2000). A novel polymorphism in the gene coding for the beta1-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *European Heart Journal*, 21(22): 1853-8.
25. MASON DA, MOORE JD, GREEN SA & LIGGETT SB (1999). A gain of function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta-1 adrenergic receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(18): 12670-4.

26. WHITE HL, DE BOER RA, MAQBOOL A, GREENWOOD D, VAN VELDHUISEN DJ, CUTHBERT R, BALL SG, HALL AS & BALMFORTH AJ (2003). An evaluation of the beta-1 adrenergic receptor Arg389Gly polymorphism in individuals with heart failure: a MERIT-HF sub-study. *European Journal of Heart Failure*, 5(4): 463-8.
27. PEREZ JM, RATHZ DA, PETRASHEVSKAYA NN, HAHN HS, WAGONER LE, SCHWARTZ A, DORN GW & LIGGETT SB (2003).  $\beta$ 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nature Medicine*, 9(10): 1300-5.
28. SMALL KM, WAGONER LE, LEVIN AM, KARDIA SLR & LIGGETT SB (2002). Synergistic polymorphisms of  $\beta$ 1-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *The New England Journal of Medicine*, 347(15): 1135-42.
29. TESSON F, CHARRON P, PEUCHMAURD M et al. (1999). Characterization of a unique genetic variant in the  $\beta$ 1-adrenoceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31(5): 1025-32.
30. WAGONER LE, CRAFT LL, ZENGEL P, MCGUIRE N, RATHZ DA, DORN GW & LIGGETT SB (2002). Polymorphisms of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor predict exercise capacity in heart failure. *American Heart Journal*, 144(5): 840-6.
31. IWAI C, AKITA H, SHIGA N et al. (2002). Suppressive effect of the Gly389 allele of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circulation Journal*, 66(8): 723-8.
32. PARKER JD, NEWTON GE, LANDZBERG JS, FLORAS JS & COLUCCI WS (1995). Functional significance of presynaptic alpha-adrenergic receptors in failing and nonfailing human left ventricle. *Circulation*, 92(7):1793-800.
33. LIGGETT SB, WAGONER LE, CRAFT LL, HORNUNG RW, HOIT BD, MCINTOSH TC & WALSH RA (1998). The Ile164  $\beta$ 2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *Journal of Clinical Investigation*, 102(8): 1534-9.



34. SMALL KM, FORBES SL, RAHAMN FF, BRIDGES KM & LIGGETT SB (2000). A four amino acid deletion polymorphism in the third intracellular loop of the human  $\alpha_2$ -adrenergic receptor confers impaired coupling to multiple effectors. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(30):23059-64.
35. BRISTOW M (2003). Antiadrenergic therapy of chronic heart failure: surprises and new opportunities. *Circulation*, 107(8):1100-02.
36. COATS AJ (1999). Heart failure 99: the MOXCON story. *International Journal of Cardiology*, 71(2): 109-11.
37. Beta-blocker Evaluation of Survival Trial Investigators (2001). A trial of the beta-blocker bucindolol in advanced chronic heart failure. *The New England Journal of Medicine*, 344(22):1659-67.

**ARTIGO DE REVISÃO 2**

**O Impacto dos Polimorfismos Genéticos e da Farmacogenética na  
Avaliação e Manejo da Insuficiência Cardíaca**

Andréia Biolo, Luis Eduardo Rohde

*Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*  
Ano XIV N° 02 – Mai/Jun/Jul/Ago 2005; 5-12.



## Artigo

### O IMPACTO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS E DA FARMACOGENÉTICA NA AVALIAÇÃO E MANEJO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Andréia Biolo

Luis Eduardo Rohde

Grupo de Insuficiência Cardíaca e Transplante Cardíaco

Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

#### Endereço para Correspondência:

Luis Eduardo Rohde  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos 2350 – Sala 2060  
Porto Alegre – RS 90035-003

#### Introdução

A prevalência da insuficiência cardíaca e sua importância na sociedade tem aumentado nos últimos anos<sup>1</sup>, e a busca do melhor entendimento dos fatores responsáveis por sua apresentação ou evolução torna-se cada vez mais importante. Insuficiência cardíaca representa o estágio final de um processo contínuo e complexo, iniciado com uma agressão ao cardiomiócito. A agressão se inicia com insultos prevalentes, como a isquemia miocárdica, a hipertensão arterial sistêmica e o álcool, e, em alguns casos, o gatilho inicial ainda não está completamente compreendido, como na miocardiopatia idiopática.

Apesar dos enormes avanços terapêuticos nas últimas décadas, limitação funcional, hospitalizações e elevada mortalidade ainda representam um desafio para a busca de novas intervenções ou aperfeiçoamento das existentes. Entretanto, novos ensaios clínicos implicam em novos medicamentos ou procedimentos, os quais o paciente deverá agregar aos tantos que já vêm sendo utilizados. A polifarmácia, associada aos dispositivos terapêuticos disponíveis, em particular os desfibriladores e marcapassos biventriculares, torna o tratamento da insuficiência cardíaca progressivamente mais caro, complexo e de difícil aderência. Além disso, observações de diversos ensaios clínicos apontam para respostas individualizadas diferentes às medicações, trazendo questionamentos sobre a possibilidade de tratamentos particulares que facilitem a aderência, racionalizem os custos e possam trazer benefícios máximos para cada paciente.

A influência do fenótipo nas respostas aos tratamentos farmacológicos auxilia na seleção de pacientes para as intervenções terapêuticas. Na insuficiência cardíaca, a classe funcional, características ecocardiográficas e laboratoriais e a própria evolução (dificuldade de resposta ao tratamento, hospitalizações frequentes) ajudam na escolha do manejo mais adequado para grupos de pacientes. Assim, aqueles com fração de ejeção reduzida são candidatos a utilizar inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) para evitar progressão à insuficiência cardíaca clínica, da mesma forma que a terapia de ressincronização está indicada somente para pacientes em classe funcional III ou IV.

De modo recente, passou a ser investigado o papel do genótipo influenciando as manifestações de doenças. Assim, interesse crescente tem surgido sobre a genética funcional (influência do

genótipo para o risco de desenvolver doenças e também como determinante de sua apresentação e evolução) e sobre a farmacogenética (influência do genótipo como determinante das respostas individuais ao tratamento farmacológico). Com relação à insuficiência cardíaca, por exemplo, as observações de ensaios clínicos demonstram que os IECA são mais eficazes em brancos do que em negros, enquanto a combinação hidralazina e isossorbida parece ser mais eficaz em negros.<sup>2,3</sup> Além disso, para alguns beta-bloqueadores parece haver também diferença de resposta em relação à raça.<sup>4</sup> Estes retornos poderiam ser explicadas, pelo menos em parte, por diferenças genotípicas entre as raças. De maneira alternativa, as diversas etiologias da insuficiência cardíaca (cujas prevalências diferem entre as raças) podem estar associadas a diferentes características genéticas, com influência nas respostas terapêuticas.

Para tentar compreender esta ligação entre o genótipo e os diferentes aspectos da síndrome insuficiência cardíaca, diversos estudos têm buscado avaliar a influência de características genotípicas no risco de desenvolver insuficiência cardíaca, em sua apresentação clínica e na resposta aos diferentes tratamentos disponíveis.<sup>5</sup> Como foco principal de pesquisa, está o estudo de polimorfismos, ou seja, variações genéticas (mutações) não-letais que aparecem em pelo menos 1% da população, como o grupo sanguíneo ABO, por exemplo. Diferenças alélicas no DNA do gene resultam em variações polimórficas de seus produtos, proteínas envolvidas nas mais diversas funções do organismo. Existem centenas de polimorfismos em cada gene, e estes polimorfismos podem ou não ter algum significado funcional. Assim, a genômica funcional tenta identificar o significado funcional das alterações na estrutura genética.<sup>6</sup> Diversos polimorfismos, com repercussão funcional em sistemas ligados à insuficiência cardíaca, têm sido estudados, como por exemplo os relacionados ao sistema adrenérgico e ao sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Neste artigo, revisamos alguns dos principais polimorfismos envolvidos no sistema adrenérgico e no sistema renina-angiotensina-aldosterona, bem como aqueles relacionados à disfunção endotelial e à atividade imuno-inflamatória, tentando abordar sua relação com o desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca e sua interação com a resposta às intervenções medicamentosas.

**Polimorfismos dos receptores adrenérgicos**

Na insuficiência cardíaca, a ativação adrenérgica e o aumento dos níveis de epinefrina são mecanismos desencadeados na tentativa de aumentar o débito cardíaco. Entretanto, cronicamente esta resposta se torna inadequada e até mesmo prejudicial, com efeitos cardiotóxicos.<sup>6,7</sup> Os receptores adrenérgicos são a chave para a regulação deste sistema e, na insuficiência cardíaca, sua função e distribuição estão alteradas de maneira significativa (figura 1).<sup>8</sup> Estes achados levaram à identificação de polimorfismos em genes responsáveis pela decodificação dos receptores adrenérgicos, os quais pudessem influenciar na resposta terapêutica, no prognóstico ou no risco de desenvolver insuficiência cardíaca.<sup>9</sup> Os principais polimorfismos com repercussão funcional na insuficiência cardíaca são listados na tabela, com os possíveis efeitos *in vitro* e repercussão clínica.

Tabela. Principais polimorfismos dos receptores adrenérgicos relacionados à insuficiência cardíaca

Polimorfismo	Efeitos <i>in vitro</i>	Possíveis consequências clínicas
$\beta_1$ Ser49Gly	Indefinido Maior <i>down-regulation</i> ?	Maior capacidade de regulação do sistema adrenérgico Melhor prognóstico
$\beta_1$ Arg389Gly	Função aumentada (agudamente)	Maior resposta do cardiomiócito Menor capacidade para o exercício Maior resposta aos $\beta$ -bloqueadores?
$\beta_2$ Thr164Ile	Menor afinidade ao acoplamento com a proteína-G	Pior função do cardiomiócito Pior prognóstico
$\alpha_2c$ Del322-325	Função reduzida	Maior liberação de noradrenalina na fenda sináptica Maior risco de insuficiência cardíaca

Dois polimorfismos importantes foram identificados para o receptor adrenérgico  $\beta_1$ . A substituição de uma adenina por uma guanina no nucleotídeo 145 resulta na substituição de uma serina por uma glicina no aminoácido 49 do receptor  $\beta_1$  (*Ser49Gly*). Esta mutação resulta em maior dessensibilização por situações de estimulação crônica e maior resposta à inibição com metoprolol, o que poderia ter efeitos protetores na insuficiência cardíaca crônica.<sup>10</sup> Em 184 pacientes com insuficiência cardíaca idiopática, a presença deste polimorfismo se associou à maior sobrevida em 5 anos (62 vs 39%,  $p=0,005$ ).<sup>11</sup>

Outro polimorfismo do receptor  $\beta_1$  é o *Arg389Gly*, o qual resulta em menor capacidade de resposta aos agonistas. Na verdade, parece que a variante Arg se associa de modo agudo a respostas hiperativas, mas cronicamente diminui sua função de ligação e sinalização.<sup>12,13</sup> Assim, apesar de os pacientes homocigotos para Arg apresentarem melhor capacidade para o exercício, parece que a presença da variante Gly se associa à menor ocorrência de taquicardia ventricular, podendo estar associado a melhor prognóstico.<sup>14,15</sup> Individualmente este polimorfismo não se associou a maior risco de insuficiência cardíaca, mas quando presente concomitante com o polimorfismo do receptor  $\alpha$ -adrenérgico (*Del322-325* do receptor  $\alpha_2c$ ), houve aumento de cerca de 10 vezes nesse risco em pacientes negros.<sup>16</sup>

O receptor  $\alpha_2c$  regula a liberação de noradrenalina na fenda sináptica (figura 1). O polimorfismo *Del322-325*, uma deleção de quatro aminoácidos neste receptor, parece se associar à maior liberação de noradrenalina.<sup>17</sup> Sua prevalência foi maior de maneira significativa em negros, sendo associada a um risco quase seis vezes maior de insuficiência cardíaca nestes pacientes, com efeito sinérgico com o polimorfismo do receptor  $\beta_1$ -adrenérgico, como já citado.<sup>16</sup> Especula-se que diferenças na apresentação e resposta terapêutica entre pacientes de diferentes raças possam ter explicação em alterações genotípicas dos receptores adrenérgicos.

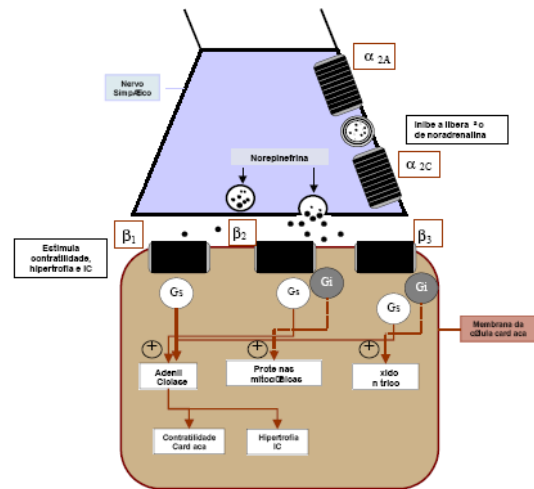


Figura 1. Principais componentes da sinalização adrenérgica. Os receptores  $\alpha_2c$  têm localização pré-sináptica e inibem a liberação de noradrenalina na fenda sináptica. Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos se localizam na membrana do cardiomiócito (o receptor  $\beta_1$  é presente em maior quantidade) e regulam a função cardíaca mediante acoplamento com a proteína G. Os receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  se acoplam à proteína G estimulatória (Gs) e apenas os receptores  $\beta_2$  se acoplam à proteína G inibitória (Gi). O papel dos receptores  $\beta_3$  ainda não está bem estabelecido. Os receptores  $\alpha_2c$  também têm funções pós-sinápticas, não mostradas nesta figura.

Com relação aos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, vários polimorfismos foram identificados. Os mais comuns são o *Arg16Gly*, o *Gln27Glu* e o *Thr164Ile*.<sup>18</sup> Os dois primeiros não afetam a afinidade com agonistas ou antagonistas, mas alteram a resposta de "down-regulation" à estimulação crônica, estando associados à capacidade funcional e resposta ao exercício em pacientes com insuficiência cardíaca.<sup>19</sup> Já a variante Ile164 do polimorfismo *Thr164Ile* resulta em menor afinidade e ativação do receptor. Pacientes com esta variante apresentaram pior capacidade funcional, provavelmente relacionada à menor capacidade de resposta à ativação adrenérgica para o aumento do débito cardíaco.<sup>19</sup> Além disso, a presença deste polimorfismo parece estar associada a pior prognóstico. Em estudo de Liggett e cols, a sobrevida livre de transplante em 1 ano, para pacientes com insuficiência cardíaca isquêmica ou idiopática, foi 42% para aqueles com a variante Ile164, comparada com 76% para os pacientes sem o polimorfismo.<sup>20</sup>

Desta forma, parece que os polimorfismos dos receptores adrenérgicos podem ter implicações funcionais com repercussão no prognóstico e no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca. Entretanto, análise retrospectiva do estudo MERIT avaliou a influência do polimorfismo *Arg389Gly* na resposta terapêutica aos beta-bloqueadores, e a presença do polimorfismo não se associou ao prognóstico nem à resposta terapêutica. Assim, a interação entre os diversos polimorfismos e sua influência na resposta terapêutica ao uso de beta-bloqueadores ou outras intervenções ainda não foram avaliados de forma a permitir seu uso e valorização no contexto clínico.<sup>21</sup>

**Polimorfismos envolvendo o sistema renina-angiotensina-aldosterona**

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA) também está relacionado de modo íntimo à insuficiência cardíaca. A produção de angiotensina II é estimulada pela sobrecarga mecânica e exerce efeitos na estrutura do miócito e da matriz extracelular.<sup>22</sup> De forma similar ao que ocorre com o sistema adrenérgico, níveis elevados de angiotensina II se associam a pior prognóstico nos pacientes com insuficiência cardíaca.<sup>23</sup> A inibição do sistema RAA é uma das mais importantes intervenções terapêuticas nestes pacientes.<sup>24,25</sup> Entretanto, seu benefício parece não ser homogêneo entre aqueles com

insuficiência cardíaca, tendo sido demonstradas distinções entre pacientes de diferentes raças (maior eficácia em pacientes brancos), além da grande variabilidade no funcionamento e nos níveis da enzima conversora da angiotensina (ECA) entre pacientes com insuficiência cardíaca e mesmo entre pessoas normais.<sup>3,26</sup>

Parece haver explicação genética para esta variabilidade. Um importante polimorfismo do gene da ECA foi identificado, o qual consiste na inserção (I) ou deleção (D) de um par de bases, resultando nos genótipos DD, ID ou II (figura 2).<sup>27</sup> A presença da deleção está associada a maiores níveis de ECA e maior atividade da angiotensina II.<sup>28</sup> Em pacientes com insuficiência cardíaca, aqueles com o genótipo DD têm menor tolerância para o exercício, e os pacientes com este mesmo genótipo desenvolvem maiores dilatações ventriculares após infarto do miocárdio.<sup>29-31</sup>

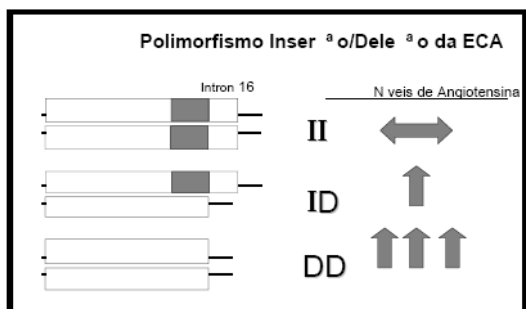


Figura 2. Polimorfismo no intron 16 do gene da enzima conversora da angiotensina (Inserção/Deleção da ECA) e seus efeitos sobre os níveis de angiotensina II

Embora não tenha sido encontrada associação deste polimorfismo (deleção) com o risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca, ele parece atuar em sua progressão, estando associado a pior prognóstico nos pacientes com insuficiência cardíaca.<sup>32-34</sup> Com relação a seu papel na resposta ao tratamento farmacológico, foi demonstrado que o impacto prognóstico deste polimorfismo foi muito maior nos pacientes que não recebiam beta-bloqueador, enquanto naqueles que recebiam tratamento com beta-bloqueadores não houve influência da deleção na sobrevivência.<sup>32</sup> Este estudo sugere uma forte interação farmacogenética entre o polimorfismo inserção/deleção da ECA e o tratamento com beta-bloqueadores, o que poderia levar até mesmo a mudança nas estratégias de priorização de determinado tratamento, de acordo com a avaliação genotípica. Outro estudo recente avaliou a relação entre o tratamento com IECA e o polimorfismo inserção/deleção da ECA, encontrando pior prognóstico nos pacientes com a presença da deleção, em especial no grupo que recebia baixas doses de IECA.<sup>35</sup> Nos pacientes com dose-alvo da medicação, o efeito deletério do polimorfismo foi reduzido de forma marcante. O benefício de altas doses de IECA e do uso de beta-bloqueadores foi maior nos pacientes homocigotos, para a presença da deleção, sugerindo de novo forte interação e um possível papel para o polimorfismo da ECA na seleção de pacientes para tratamentos individualizados.

A aldosterona é outro neurohormônio intimamente relacionado à insuficiência cardíaca.<sup>36</sup> Por meio de efeitos no músculo cardíaco e nos vasos sanguíneos, influencia nas respostas vasodilatadoras e mesmo no remodelamento cardíaco.<sup>37</sup> Além disso, a inibição da aldosterona reduz a mortalidade de pacientes em classes funcionais III e VI.<sup>38</sup> O polimorfismo do gene que sintetiza a aldosterona (C-344T) parece resultar em níveis elevados deste neuro-hormônio, e especula-se que possa se associar a pior prognóstico quando associado ao polimorfismo mencionado de deleção da ECA.<sup>5</sup> Entretanto, o papel deste polimorfismo, de maneira isolada ou por sua interação com outros sistemas, deve ser ainda melhor estudado.

Buscando avaliar se os polimorfismos do sistema RAA se associam à melhora da fração de ejeção apresentada por alguns pacientes em resposta ao tratamento, foram estudados os polimorfismos de inserção-deleção da ECA e C-344T da aldosterona.<sup>39</sup> O polimorfismo do gene da aldosterona foi associado à melhora da fração de ejeção consequente ao tratamento da insuficiência

cardíaca, sugerindo seu papel na progressão e na farmacogenética da síndrome. Neste estudo, o polimorfismo da ECA não se associou à resposta terapêutica.

Assim, parece que os polimorfismos do sistema renina-angiotensina-aldosterona estão muito associados aos efeitos dos tratamentos amplamente utilizados nos pacientes com insuficiência cardíaca. O melhor entendimento de tais interações poderá transformar este conhecimento na ferramenta para a individualização destes tratamentos.

### Polimorfismos de genes envolvidos em outros sistemas

Diversos outros sistemas parecem estar envolvidos e influenciar na progressão da insuficiência cardíaca. Variabilidades genéticas nestes sistemas podem também ter consequências funcionais na manifestação clínica ou na resposta terapêutica em pacientes com insuficiência cardíaca.

O óxido nítrico é um neurohormônio expresso em altos níveis em pacientes com insuficiência cardíaca.<sup>40</sup> Por sua função de relaxamento das fibras musculares nos vasos periféricos e atenuação dos efeitos cardiotoxícos da estimulação adrenérgica, espera-se que níveis reduzidos de óxido nítrico se associem a pior prognóstico.<sup>41,42</sup> Um polimorfismo do gene da óxido nítrico sintase 3 (*Glu298Asp*) leva a menor meia-vida da enzima, podendo-se esperar maior resposta vasoconstritora.<sup>43</sup> De fato, pacientes com este polimorfismo (especialmente aqueles com etiologia idiopática) apresentaram pior prognóstico, sugerindo que polimorfismos deste sistema possam ser importantes marcadores prognósticos e mesmo alvos terapêuticos individualizados no futuro.<sup>44</sup>

A adenosina é um nucleotídeo endógeno com diversas funções benéficas no sistema cardiovascular (atenua a liberação de catecolaminas, aumenta o fluxo coronariano, inibe a ativação plaquetária e a expressão do fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) e seus níveis estão elevados em pacientes com insuficiência cardíaca.<sup>45-47</sup> O polimorfismo que resulta na deficiência da AMPD1 (enzima envolvida na catalisação da adenosina) se associa a níveis elevados de adenosina e os possíveis efeitos benéficos deste polimorfismo têm sido estudados.<sup>48</sup> Diversos estudos têm demonstrado associação deste polimorfismo com melhor prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca, tanto de etiologia isquêmica como idiopática.<sup>49-51</sup> Os mecanismos para esta proteção parecem ser relacionados de modo predominante a alterações metabólicas do próprio músculo cardíaco, sem alterações significativas em rotas sistêmicas.<sup>52</sup>

O fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória sintetizada por macrófagos ativados. Está envolvido com a liberação de óxido nítrico, com a permeabilidade vascular, com a contratilidade cardíaca e até mesmo com o estado pró-trombótico associado à insuficiência cardíaca.<sup>53</sup> O TNF $\alpha$  é expresso pelo músculo cardíaco na presença de disfunção, e seus níveis se associam à mortalidade.<sup>54</sup> Apesar de sua íntima relação com a patogênese da insuficiência cardíaca, os estudos clínicos não têm conseguido demonstrar associação dos polimorfismos deste sistema com risco ou progressão da insuficiência cardíaca.<sup>53,55</sup> Existe evidência de possível associação entre o polimorfismo do gene do TNF $\alpha$  (conhecido como variante TNF $\alpha$ 2) e risco de insuficiência cardíaca de etiologia idiopática.<sup>56</sup> Entretanto, seu papel na patogênese da insuficiência cardíaca ainda não está definido, e parece que seus níveis representam mais uma resposta à ativação de diversos sistemas do que alterações do próprio TNF.

### Conclusão

Diversos polimorfismos com consequências nos mais diversos sistemas envolvidos na patogênese da insuficiência cardíaca têm sido estudados recentemente. À medida que seu papel no risco da doença, no prognóstico e na resposta a tratamentos específicos vai sendo esclarecido, novas ferramentas poderão ser agregadas na abordagem dos pacientes com insuficiência cardíaca.

Até o momento, porém, estratégias terapêuticas derivadas de ensaios clínicos "tradicionais" implicam no uso de determinado medicamento ou procedimento em inúmeros pacientes, para que apenas uma minoria seja de fato beneficiada. Podemos esperar, para um futuro não tão distante, que os clínicos possam somar as informações genotípicas às informações fenotípicas já utilizadas, e

individualizar os tratamentos, com maior benefício para cada paciente. Para isso, entretanto, será necessária a realização de novos estudos clínicos que reavaliem tratamentos já estabelecidos, considerando, em conjunto, aspectos genéticos individuais. Neste sentido, parece plausível que se redefina, por exemplo, o benefício clínico do uso de beta-bloqueadores e inibidores da enzima de conversão da angiotensina à luz da presença ou não de variações genéticas na própria enzima de conversão. O delineamento destes estudos será tarefa certamente desafiadora e complexa dos pontos de vista logístico e ético. Da mesma forma, identificar indivíduos com risco aumentado de desenvolver insuficiência cardíaca e intervir na sua prevenção se tornará importante ferramenta para frear o aumento progressivo da prevalência desta síndrome.

## Referências

- Levy D, Kenchaiah S, Larson MG et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *New Engl J Med* 2002; 347: 1397-402.
- Cohn JN, Johnson G, Ziesche S et al. A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325:303-10.
- Carson P, Ziesche S, Johnson G, Cohn JN. Racial differences in response to therapy for heart failure: analysis of the vasodilator-heart failure trials. *Vasodilator-heart failure trial study group. J Card Fail* 1999; 5: 178-87.
- Yancy CW, Fowler MB, Colucci WS et al. Race and the response to adrenergic blockade with carvedilol inpatients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 344: 1358-65.
- Feldman AM. The emerging role of pharmacogenomics in the treatment of patients with heart failure. *Ann Thorac Surg* 2003; 76: S2246-53.
- Esler M, Kaye D, Lanberv G, Esler D and Jennings G. Adrenergic nervous system in heart failure. *Am J Cardiol* 1997; 80: 7L-14L.
- Bristow MR, Hershberger RE, Port JD et al. Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* 1990; 82: 112-25.
- Port JD and Bristow MR. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 887-905.
- Taylor MGR, Bristow MR. The emerging pharmacogenomics of the beta-adrenergic receptors. *Congest Heart Fail* 2004; 10: 281-8.
- Levin MC, Marullo S, Muntaner O, Andersson B and Magnusson Y. The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem* 2002; 277: 30429-35.
- Borjesson M, Magnusson Y, Hjalmarson A, Anderson B. A novel polymorphism in the gene coding for the beta1-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J* 2000; 21: 1853-8.
- Mason DA, Moore JD, Green SA et al. A gain of function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta-1 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1997; 274: 12670-4.
- Perez JM, Rathz DA, Petrashevskaya NN et al. b1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med* 2003; 9: 1300-5.
- Wagoner LE, Craft LL, Zengel P et al. Polymorphisms of the b1-adrenergic receptor predict exercise capacity in heart failure. *Am Heart J* 2002; 144: 840-6.
- Iwai C, Akita H, Shiga N et al. Suppressive effect of the Gly389 allele of the b1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J* 2002; 66: 723-8.
- Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SLR and Liggett SB. Synergistic polymorphisms of b1- and a2c-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *New Engl J Med* 2002; 347: 1135-42.
- Small KM, Forbes SL, Raham FF, Bridges KM, Liggett SB. A four amino acid deletion polymorphism in the third intracellular loop of the human a2c-adrenergic receptor confers impaired coupling to multiple effectors. *J Biol Chem* 2000; 275:23059-64.
- Liggett SB. Pharmacogenetics of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors. *Pharmacology* 2000; 61: 10483-8.
- Wagoner LE, Craft LL, Singh B et al. Polymorphisms of the b2-adrenergic receptor determine exercise capacity in patients with heart failure. *Circ Res* 2000; 86: 834-40.
- Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL et al. The Ile164 b2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest* 1998; 102: 1534-9.
- White HL, de Boer RA, Maqbool A et al. 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(4): 463-8.
- Gaussin V, Schneider MD. Surviving infarction one gene at a time: decreased remodeling and mortality in engineered mice lacking the angiotensin II type 1A receptor. *Circulation* 1999; 100: 2043-4.
- Swedberg K, Eneroth P, Kjekshus J, Wilhelmssen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS trial study group. *Circulation* 1990; 82: 1730-6.
- The CONSENSUS trial study group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987; 316: 1429-35.
- The SOLVD investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325: 293-302.
- Exner DV, Dries DL, Domanski MJ and Cohn J. Lesser response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor therapy in black as compared with white patients with left ventricular dysfunction. *New Engl J Med* 2001; 344: 1351-7.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. Na insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-6.
- Tiret L, Rigat B, Visvikis S et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 197-205.
- Abraham MR, Olson LJ, Joyner JF, Turner ST, Beck KC, Johnson BD. Angiotensin-converting enzyme genotype modulates pulmonary function and exercise capacity in treated patients with congestive stable heart failure. *Circulation* 2002; 106: 1794-9.
- Bryne J, Robb SD, Morton IJ, Cooke A, McMurray JJ, Dargie HJ. The insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and indices of left ventricular function following myocardial infarction [Abstract]. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 491A.
- Murayama M. Effect of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on left ventricular remodeling after antero-septal infarction. *Clin Cardiol* 1999; 22: 587-90.
- McNamara DM, Holubkov R, Janosko K et al. Pharmacogenetic interactions between beta-blocker therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *Circulation* 2001; 103: 1644-8.

33. Andersson B, Sylven C. The DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with increased mortality in idiopathic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 162-7.
34. Montgomery HE, Keeling PJ, Goldman JH, Humphries SE, Talmud PJ, McKenna WJ. Lack of association between the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1627-31.
35. McNamara Dm, Holubkov R, Postava L et al. Pharmacogenetic interactions between angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 2019-26.
36. Dzau VJ, Colucci WS, Hollenberg NK, Williams GH. Relation of the renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure. *Circulation* 1981; 63: 645-51.
37. Zhou G, Kandala JC, Tyagi SC, Katwa LC, Weber KT. Effects of angiotensin II and aldosterone on collagen gene expression and protein turnover in cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 1996; 154: 171-8.
38. Pitt B, Zannad F, Remme WJ et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study investigators. *N Engl J Med* 1999; 341: 709-17.
39. Tiago AD, Badenhorst D, Skudicky D et al. An aldosterone synthase gene variant is associated with improvement in left ventricular ejection fraction in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 584-9.
40. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996; 93: 1087-94.
41. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996; 79: 363-80.
42. Meguire SM, Nugent AG, McGurk C, Johnston GD, Nicholls DP. Abnormal vascular responses in human chronic cardiac failure are both endothelium dependent and endothelium independent. *Heart* 1998; 80: 141-5.
43. McNamara DM. Pharmacogenetics in heart failure: genomic markers of endothelial and neurohumoral function. *Congest Heart Fail* 2004; 10: 302-8.
44. McNamara Dm, Holubkov R Postava L et al. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation* 2003; 107: 1598-602.
45. Kitakaze M, Hori M, Kamada T. Role of adenosine and its interaction with alpha adrenoceptor activity in ischaemic and reperfusion injury of the myocardium. *Cardiovas Res* 1993; 27: 18-27.
46. Wagner DR, McTiernan C, Sanders VJ, Feldman AM. Adenosine inhibits lip polysaccharide-induced cardiac secretion of tumor necrosis factor-alpha in the failing human heart. *Circulation* 1998; 97: 521-4.
47. Funaya H, Kitakaze , Node K, Minamino T, Komamura K, Hori M. Plasma adenosine levels increase in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1997; 95: 1363-5.
48. Binkley PF, Auseon A, Cooke G. A polymorphism of the gene encoding AMPD1: clinical impact and proposed mechanisms in congestive heart failure. *Congest Heart Fail* 2004; 10: 274-8.
49. Yazaki Y, Muhlestein JB, Carlquist JF et al. A common variant of the AMPD1 gene predicts improved survival in patients with ischaemic left ventricular dysfunction. *J Card Fail* 2004; 10: 316-20.
50. Gastman A, Sigusch HH, Henke A et al. Role of adenosine monophosphate deaminase-1 gene polymorphism in patients with congestive heart failure (influence on tumor necrosis factor-alpha level and outcome). *Am J Cardiol* 2004; 93: 1260-4.
51. Loh E, Rebbeck TR, Mahoney PD, DeNofrio D, Swain JL, Holmes EW. Common variant in AMPD1 gene predicts improved clinical outcome in patients with heart failure. *Circulation* 1999; 99: 1422-5.
52. Kalsi KK, Yuen AH, Rybaskowsda IM et al. Decreased cardiac activity of AMP deaminase in subjects with the AMPD1 mutation – a potential mechanism of protection in heart failure. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 678-84.
53. Vadlamani L, Iyengar S. Tumor necrosis factor alpha polymorphism in heart failure/cardiomyopathy. *Congest Heart Fail* 2004; 10: 289-92.
54. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J et al. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996; 93: 704-11.
55. Kubota T, McNamara DM, Wang JJ et al. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 97: 2499-501.
56. Ito M, Takahashi H, Fuse K et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Jpn Heart J* 2000; 41: 183-91.

**ARTIGO ORIGINAL: VERSÃO EM PORTUGUÊS**

**Papel dos Polimorfismos dos Receptores  $\beta$ -Adrenérgicos em Pacientes  
com Insuficiência Cardíaca: Risco de Arritmias Ventriculares Complexas e  
Potenciais Interações Farmacogenéticas**



## RESUMO

**Introdução:** Neste estudo, avaliamos o papel dos polimorfismos  $\beta$ 1-Arg389Gly e  $\beta$ 2-Thr164Ile no risco de Insuficiência Cardíaca (IC), assim como a potencial interação do alelo  $\beta$ 1-389Gly com arritmias ventriculares complexas e com o tratamento da IC.

**Métodos:** Foi realizada a genotipagem dos receptores adrenérgicos  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 nos códonos 389 e 164, respectivamente, em 151 pacientes ambulatoriais com IC por disfunção sistólica e em 154 indivíduos controles. Foi realizada monitorização por Holter em 135 (89%) pacientes para avaliar a presença de arritmias ventriculares complexas e índices de variabilidade da frequência cardíaca.

**Resultados:** A idade média dos pacientes foi de  $61 \pm 12$  anos, 42% com etiologia isquêmica e 79% em Classe Funcional I ou II da *New York Heart Association*. As frequências dos alelos  $\beta$ 1-389Gly e  $\beta$ 2-164Ile nos pacientes foi de 0,22 e 0,013, respectivamente. Não houve influência destes polimorfismos no risco de IC na amostra. Entretanto, os pacientes com pelo menos um alelo  $\beta$ 1-389Gly apresentaram menor ocorrência de taquicardia ventricular não-sustentada (TVNS) (27% versus 44% no grupo sem o alelo,  $P=0,05$ ). Além disso, o uso de beta-bloqueadores em altas doses foi associado a uma menor prevalência de TVNS, e observou-se uma significativa interação farmacogenética conforme o genótipo  $\beta$ 1-389. Pacientes homocigotos para o

alelo  $\beta 1$ -389Arg tiveram uma redução de cerca de 50% na ocorrência de TVNS com o uso de beta-bloqueadores em doses altas (26% *versus* 55% para aqueles utilizando dose baixa ou não utilizando a medicação,  $P=0,006$ ), efeito não observado nos pacientes com pelo menos um alelo  $\beta 1$ -389Gly (25% *versus* 29%,  $P=0,7$ ).

**Conclusões:** Os polimorfismos  $\beta 1$ -Arg389Gly e  $\beta 2$ -Thr164Ile não estão associados com suscetibilidade para IC. O alelo  $\beta 1$ -389Gly apresentou um efeito supressivo nas arritmias ventriculares e pacientes sem este alelo (pacientes Arg/Arg) parecem ter maior benefício com altas doses de beta-bloqueadores com relação à redução de TVNS. A avaliação do genótipo  $\beta 1$ -389 pode representar uma nova ferramenta para a busca de terapias individualizadas na IC.

## INTRODUÇÃO

A insuficiência Cardíaca (IC) é um importante problema de saúde em todo o mundo, e apesar dos muitos avanços terapêuticos recentes, a morbidade e mortalidade relacionadas à IC permanecem elevadas.<sup>1-3</sup> O impacto mórbido sustentado da IC ocorre, em parte, porque nem todos os pacientes se beneficiam de todas as estratégias terapêuticas específicas. Diversos investigadores têm observado uma importante variabilidade individual não somente na resposta às terapias farmacológicas como também na apresentação clínica da IC.<sup>4,5</sup> Raça, sexo e fatores ambientais podem estar implicados, mas a variabilidade geneticamente mediada surgiu como um aspecto central no risco, no prognóstico e na resposta a diferentes terapias em pacientes com IC.<sup>6,7</sup>

Independentemente do insulto inicial, a diminuição do débito cardíaco resulta em ativação simpática. Diversos estudos experimentais e clínicos demonstram que esta ativação adrenérgica sustentada pode ser prejudicial para o coração em disfunção, contribuindo para a progressão, perpetuação e apresentação da IC.<sup>8,9</sup> Os receptores adrenérgicos são um passo limitante da ativação adrenérgica; recentemente, o papel dos polimorfismos destes receptores tem sido foco de investigação intensa.<sup>6,10-12</sup> O receptor adrenérgico  $\beta_1$  é o subtipo predominante em indivíduos saudáveis, e a sua ativação resulta em aumento do inotropismo, lusitropismo e cronotropismo cardíacos.<sup>13</sup> Um polimorfismo comum do receptor adrenérgico  $\beta_1$  resulta em uma Glicina ( $\beta_1$ -389Gly) ou uma Arginina ( $\beta_1$ -389Arg) na posição 389, um ponto crítico para o acoplamento com a proteína G.<sup>14-15</sup> Embora este polimorfismo possa estar

relacionado ao risco de desenvolvimento de IC em populações específicas, esta associação ainda é controversa.<sup>16,17</sup> O receptor com a variante  $\beta$ 1-389Arg apresenta uma maior afinidade de acoplamento, estando associado a uma sinalização hiperativa e a uma resposta aumentada aos beta-bloqueadores em modelos experimentais de IC.<sup>18</sup> Por outro lado, pacientes com IC e com o alelo  $\beta$ 1-389Gly apresentaram capacidade de exercício significativamente menor, com menor pico de consumo de oxigênio.<sup>19</sup> Além disso, como o polimorfismo  $\beta$ 1-Arg389Gly está associado a uma sinalização diminuída, ele teoricamente pode produzir efeitos protetores na função cardíaca e na arritmogênese. Neste sentido, um estudo com pacientes japoneses com cardiomiopatia dilatada sugere que a presença do alelo  $\beta$ 1-389Gly está associada a uma menor ocorrência de arritmias ventriculares.<sup>20</sup>

Um polimorfismo do receptor  $\beta$ 2-adrenérgico – substituição de Treonina (Thr) por Isoleucina (Ile) no aminoácido 164 – que resulta em importante redução da função do receptor, tem sido associado a uma menor função contrátil tanto em repouso quanto estimulada por agonistas em ratos transgênicos *in vivo*.<sup>21</sup> Esta substituição (Thr por Ile) está associada com prognóstico em longo prazo significativamente pior em pacientes com IC.<sup>22</sup> Apesar destes achados iniciais, o papel dos polimorfismos dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos no risco e na apresentação da IC e sua potencial interação com respostas terapêuticas ainda precisa ser esclarecido.

Como os polimorfismos genéticos podem ter prevalências e impacto em características fenotípicas variáveis de acordo com a constituição genética da população em estudo, o presente estudo observacional prospectivo foi

realizado para avaliar a relação dos polimorfismos  $\beta$ 1-Arg389Gly e  $\beta$ 2-Thr164Ile com (1) o risco de desenvolvimento de IC (em um estudo caso-controle), (2) marcadores clínicos de ativação simpática (presença de arritmias ventriculares complexas e índices de variabilidade da frequência cardíaca) e (3) respostas farmacológicas específicas para drogas de uso comum em IC, em uma amostra brasileira de pacientes com IC.

## MÉTODOS

### População Estudada

Os pacientes com IC e os indivíduos controles foram recrutados de um hospital universitário de atendimento terciário, em Porto Alegre, Brasil. Pacientes consecutivos elegíveis para o estudo e que concordaram em participar foram arrolados no Ambulatório de Insuficiência Cardíaca, no período de Outubro/2003 a Novembro/2004. Os critérios de elegibilidade foram idade  $\geq$  18 anos e fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE) menor do que 45%, independentemente da classe funcional. Foram incluídos somente pacientes com diagnóstico de cardiomiopatia dilatada isquêmica, hipertensiva ou idiopática. Não foram incluídos pacientes com IC de etiologia valvular primária, infecciosa (Doença de Chagas), tóxica (álcool, doxirrubicina), miocardite e aqueles com cardiomiopatias obstrutivas ou hipertróficas. Pacientes com expectativa de vida reduzida e aqueles com doenças auto-imunes também foram excluídos. Os indivíduos controles foram recrutados previamente à doação voluntária de sangue e consistiam de sujeitos não-relacionados e aparentemente hígidos (avaliado por meio de questionário). Doadores de

sangue com doença cardiovascular ou sintomas cardiovasculares e aqueles com história familiar de morte súbita precoce foram excluídos. A classificação racial de todos os participantes foi auto-declarada. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). A todos os indivíduos do estudo foi aplicado Termo de Consentimento Informado. Foram obtidos dados demográficos, clínicos e laboratoriais de todos os pacientes.

### **Genotipagem**

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico através de procedimento padronizado.<sup>23</sup> Os genótipos dos receptores adrenérgicos foram detectados por análise da reação em cadeia da polimerase – polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Para o polimorfismo  $\beta$ 2-Thr164Ile, as reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25  $\mu$ l, contendo 100-200 ng de DNA genômico, 1,6  $\mu$ mol de cada *primer*, 4 unidades de Taq DNA polimerase, 400 mmol dNTP, 4mmol MgCl<sub>2</sub> e 10% DMSO. Um fragmento de 280 pb, incluindo o sítio polimórfico no códon 164, foi amplificado usando o *primer sense* (5'-TTACTTCACC-TTTCAAGTACCAGAG-3') e o *primer antisense* (5'-CATAGCAGTTGATGGC-TTCCTG-3'). As condições do PCR foram as seguintes: 2 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguido por 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento do *primer* a 57°C por 1 minuto, polimerização a 72°C por 1 minuto) e uma extensão final (7 min a 72°C). Após a amplificação, 10  $\mu$ l

do produto do PCR foram digeridos com 10 U de *MnII* a 37°C por 3 horas. Todos os fragmentos foram separados em um gel de poliacrilamida 29:1 e visualizados após coloração com prata. (Figura 1, A)

Para o polimorfismo  $\beta$ 1-Arg389Gly, os *primers sense* e *antisense* 5'-TGGGCTACGCCAACTCGG-3' e 5'-GGCCCCGACGACATCGTC-3' originaram um produto de amplificação de 221 pb. Sumariamente, 100-200 ng de DNA genômico foi amplificado utilizando 400  $\mu$ mol de dNTP, 4 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 3 unidades de Taq DNA polimerase, 10% de DMSO e 1,6  $\mu$ mol de cada *primer* em um volume final de 25  $\mu$ l. Um PCR "touch-down" foi realizado com temperaturas de 58°C a 52°C, incluindo desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação iniciando com temperaturas de anelamento de 58°C, 56°C, 54°C e então 27 ciclos a 52°C com extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Após a amplificação, o produto do PCR foi digerido com 2 unidades de *MvaI* a 57°C por 2 horas e o resultado da digestão foi separado em géis de agarose a 2%, os quais foram analisados após coloração com brometo de etídio. (Figura 1,B)

Um controle positivo conhecido e confirmado por seqüenciamento correu em todos os experimentos concomitantemente com as amostras do estudo.

### **Avaliação de Arritmias**

Foram também avaliados os dados da monitorização por Holter de 24 horas com relação à presença de arritmias ventriculares complexas e índices de variabilidade da frequência cardíaca. Os pacientes foram instruídos a

manter seu regime usual de medicamentos e a continuar suas atividades rotineiras durante o registro, porém evitando atividade física intensa. Os traçados do Holter foram analisados por cardiologistas que desconheciam os genótipos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , usando uma técnica semi-automática (analisador Mars 8000, Marquette Medical Systems, Milwaukee, Wis). Este analisador identifica e conta o número total de batimentos, artefatos e ectopias, e cria uma série no tempo de intervalos R-R normais, com uma resolução de 8 ms. As extra-sístoles ventriculares (ESV) foram classificadas como isoladas, pareadas ou salvas de taquicardia ventricular não-sustentada (TVNS), definida como três ou mais extra-sístoles ventriculares com frequência superior a 100 batimentos por minuto. O desvio-padrão de todos os intervalos R-R normais (SDNN) foi calculado usando arquivos contendo intervalos R-R normais, de acordo com as recomendações da *Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology*.<sup>24</sup>

### **Classificação da Terapia Medicamentosa**

Para os tratamentos com beta-bloqueadores e inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), os pacientes foram classificados, de acordo com as doses-alvo definidas pelas diretrizes em IC, em usuários de altas doses (50 mg/dia ou mais de carvedilol, 150 mg/dia ou mais de tartarato de metoprolol ou 200 mg/dia ou mais de succinato de metoprolol para os beta-bloqueadores, e 20 mg/dia ou mais de enalapril ou 150 mg/dia ou mais de captopril para os inibidores da ECA) ou usuários de baixas doses ou não usuários (aqueles em doses abaixo das supracitadas ou sem os respectivos tratamentos).<sup>25</sup>



## **Análise Estatística**

As variáveis contínuas são descritas como média  $\pm$  desvio-padrão ou mediana (intervalo interquartis) e as variáveis categóricas são descritas em números absolutos e porcentagens. As freqüências alélicas foram computadas por método padrão de contagem de genes. Testes de qui-quadrado 2x2 foram utilizados para avaliar a associação entre o risco de IC e a freqüência do alelo ou o genótipo, e para avaliar as possíveis interações entre os polimorfismos e a etiologia da IC. As diferenças nas características clínicas entre os grupos (presença ou ausência de TVNS) [Tabela3] ou genótipo RA- $\beta$ 1 [Tabela 5] foram obtidos pelo teste *t* de Student ou teste de qui-quadrado, conforme apropriado. Finalmente, as potenciais interações entre as doses dos fármacos comumente prescritos para IC (beta-bloqueadores e inibidores da ECA), o polimorfismo do receptor adrenérgico  $\beta$ 1 e a presença de TVNS no Holter também foram avaliados. Análise de regressão logística foi realizada para identificar fatores determinantes independentes de TNVS e termos de interação clinicamente relevantes foram testados nos modelos. Para todas as análises, um valor de *P* bi-caudal  $< 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 12.0.

## **RESULTADOS**

### **Características Clínicas dos Pacientes com IC e Controles**

Foram incluídos 151 pacientes com IC e 154 controles. Os pacientes com IC eram predominantemente brancos (69%), masculinos (66%), com disfunção ventricular esquerda moderada a grave e em Classe Funcional I e II

da *New York Heart Association* (79%), com 42% de etiologia isquêmica (Tabela 1). Como esperado, a maioria dos pacientes estava em tratamento com inibidores da ECA (91%) e com beta-bloqueadores (85%). A monitorização por Holter foi realizada em 135 (89%) pacientes, sendo que TVNS esteve presente em 50 (33%) deles. Os controles eram mais jovens ( $41 \pm 8$  anos *versus*  $61 \pm 12$  anos,  $P < 0,01$ ); 117 (75%) eram homens e 122 (78%) brancos.

### **Polimorfismos dos Receptores Adrenérgicos $\beta 1$ e $\beta 2$ e risco de IC**

A Tabela 2 demonstra a prevalência dos polimorfismos  $\beta 1$ -Arg389Gly e  $\beta 2$ Thr164Ile e as respectivas freqüências alélicas na amostra. Para ambos os polimorfismos não houve diferenças na freqüência dos alelos ou nos genótipos entre os pacientes com IC e os controles. Na análise estratificada por etiologia (pacientes com IC de etiologia isquêmica e não-isquêmica), também não houve diferenças significativas entre pacientes e controles. A prevalência do alelo  $\beta 2$ -164Ile foi relativamente baixa (2,6%).

Não houve associação entre raça (brancos e não-brancos) e ambos os polimorfismos ( $\beta 1$ -389Gly presente em 43% dos pacientes brancos *versus* 42% dos não-brancos,  $\beta 2$ -Ile164 presente em 2,9% *versus* 2,2%, respectivamente). Também não houve associação entre os genótipos e o risco de IC em indivíduos brancos e não-brancos, quando examinados separadamente. O alelo  $\beta 1$ -389Gly estava presente em 42% dos pacientes brancos com IC e em 35% dos controles de raça branca ( $P=0,34$ ), e em 43% e 30% dos pacientes e controles não-brancos, respectivamente ( $P=0,23$ ). As porcentagens de

pacientes e controles com o alelo  $\beta 2$ -Ile164 foram 2,8% e 3,3% para brancos ( $P=0,82$ ), e 2,2% e 2,9% para não-brancos ( $P=0,83$ ), respectivamente.

### **Polimorfismo do Receptor Adrenérgico $\beta 1$ , Arritmia Ventricular e Variabilidade da Frequência Cardíaca**

Os pacientes com IC foram também avaliados com relação à presença de TVNS e ao SDNN na monitorização por Holter de 24 horas. A Tabela 3 mostra as características clínicas dos pacientes com e sem TVNS. Pacientes com TVNS tiveram menor FEVE (29% *versus* 33%,  $P=0,02$ ) e estavam menos freqüentemente com doses altas de beta-bloqueadores (30% *versus* 52%,  $P=0,01$ ). Todas as outras características foram similares entre os pacientes com e sem TVNS. A Tabela 4 apresenta a relação entre a presença de TVNS e os genótipos e freqüências alélicas do polimorfismo  $\beta 1$ -Arg389Gly nos pacientes. Pacientes com pelo menos um alelo  $\beta 1$ -389Gly tiveram uma ocorrência menor de TVNS, com significância estatística limítrofe (razão de chances = 0,64, intervalo de confiança 95% = 0,39 – 1,0;  $P=0,05$ ).

A análise do SDNN foi tecnicamente possível em 88 pacientes (exclusões principalmente por fibrilação atrial). Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de SDNN entre pacientes com e sem o alelo  $\beta 1$ -389Gly ( $105 \pm 38$  *versus*  $113 \pm 50$  ms, respectivamente,  $P=0,43$ ). Achados similares foram observados na análise usando diferentes pontos de corte nos valores de SDNN (SDNN < 70 ms ou SDNN < 100 ms). Também não foi encontrado qualquer efeito significativo de drogas para IC sobre os valores de SDNN, embora os pacientes com altas doses de beta-bloqueadores tenham apresentado tendência a valores de SDNN mais altos comparados aos

pacientes usando doses baixas ou não usando a medicação ( $117 \pm 44$  versus  $101 \pm 44$  ms,  $P=0,09$ ).

### **Alelo $\beta 1$ -389Gly, TVNS e Interações Farmacogenéticas**

Para explorar a potencial interação farmacogenética entre a terapia com inibidores da ECA ou beta-bloqueadores e o polimorfismo  $\beta 1$ -Arg389Gly, comparamos os efeitos destas intervenções farmacológicas na prevalência de TVNS, de acordo com a presença do alelo  $\beta 1$ -389Gly. Primeiramente, todos os pacientes foram analisados de acordo com a presença do alelo  $\beta 1$ -389Gly; nenhuma característica clínica em particular foi associada com este polimorfismo (Tabela 5).

Para o tratamento com beta-bloqueadores, a intensidade do beta-bloqueio não teve efeito na porcentagem de ocorrência de TVNS para pacientes com pelo menos um alelo  $\beta 1$ -389Gly (genótipo protetor). Por outro lado, pacientes sem esta variante (homozigotos Arg/Arg) tiveram uma redução de duas vezes na prevalência de TVNS quando em tratamento com beta-bloqueadores em altas doses, comparados com pacientes utilizando a medicação em doses baixas ou que não a utilizavam (Figura 2 – superior). Na regressão logística multivariada ajustada para a FEVE (Tabela 6), tanto pacientes recebendo altas doses de beta-bloqueadores como aqueles com o alelo Gly estavam altamente protegidos para TVNS (razão de chances (RC) = 0,21, intervalo de confiança (IC) 95% = 0,08 – 0,59, e RC = 0,29, IC 95% = 0,11 – 0,83, respectivamente; “estatística c” = 0,72).

Com relação à terapia com inibidores da ECA, não houve diferença na porcentagem de pacientes com TVNS entre os pacientes utilizando altas doses desta medicação e aqueles utilizando baixas doses ou não a utilizando, tanto para pacientes com o alelo  $\beta$ 1-389Gly como para aqueles sem este alelo (Figura 2 – inferior).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, os polimorfismos dos receptores adrenérgicos  $\beta$ 1-Arg389Gly e  $\beta$ 2-Thr164Ile não se relacionaram com risco de IC em uma amostra de pacientes brasileiros com IC. A prevalência destes polimorfismos tanto no grupo de pacientes quanto no grupo controle foi similar àquela previamente descrita, com uma baixa prevalência para o alelo  $\beta$ 2-164Ile e presença relativamente comum do alelo  $\beta$ 1-389Gly.<sup>22,26,27</sup> Em particular, demonstrou-se uma associação significativa entre o polimorfismo  $\beta$ 1-Arg389Gly e arritmias ventriculares complexas, com um efeito supressivo do alelo  $\beta$ 1-389Gly na ocorrência de TVNS. Finalmente, foi demonstrada também uma interação farmacogenética entre o polimorfismo  $\beta$ 1-Arg389Gly e o efeito dos beta-bloqueadores sobre a ocorrência de TVNS.

Diversos investigadores avaliaram o papel de polimorfismos genéticos no risco de IC, mas os achados não são uniformes e a maioria dos estudos não demonstrou associação significativa tanto para a etiologia isquêmica quanto para a idiopática.<sup>22,26,28</sup> O estudo CARDIGENE, por exemplo, foi uma iniciativa europeia que não identificou suscetibilidade aumentada para cardiomiopatia

dilatada em 8 genes candidatos.<sup>28</sup> Nenhum destes polimorfismos, contudo, envolvia variações geneticamente mediadas dos receptores adrenérgicos. Recentemente, um importante estudo realizado por Small *et al.* encontrou um risco de IC dez vezes maior nos pacientes que eram, simultaneamente, homozigotos para o alelo  $\beta 1$ -389Gly e tinham uma deleção de 4 aminoácidos no receptor adrenérgico  $\alpha 2c$ , sugerindo uma ação sinérgica no sistema adrenérgico para aumentar a suscetibilidade para IC, especialmente em negros.<sup>16</sup> Para a utilização clínica, a genotipagem deste *loci* poderia ser um recurso útil para a identificação de sub-grupos com maior risco de IC e, conseqüentemente, candidatos para medidas preventivas precoces.

As conseqüências funcionais do polimorfismo  $\beta 1$ -Arg389Gly podem influenciar a progressão da IC e algumas características específicas. Corações de ratos transgênicos expressando o alelo  $\beta 1$ -389Arg têm maior contratilidade agudamente, com marcada redução após seis meses, sem resposta ao estímulo inotrópico; além disso, corações de ratos  $\beta 1$ -389Gly são menos sensíveis ao beta-bloqueio.<sup>18</sup> Os estudos em humanos que avaliaram a potencial interação entre este alelo e a resposta à terapia com beta-bloqueadores não são consensuais. Perez *et al.* estudaram a resposta ao carvedilol em pacientes com IC e observaram que pacientes homozigotos para o alelo Arg-389 tiveram um aumento substancialmente maior na FEVE do que os portadores do alelo  $\beta 1$ -389Gly.<sup>18</sup> Outros estudos demonstraram que pacientes com o alelo  $\beta 1$ -389Gly necessitaram mais freqüentemente de aumentos nas doses de suas medicações para IC durante o escalonamento da dose de metoprolol,<sup>29</sup> e que pacientes Arg/Arg tiveram maior resposta com

relação ao remodelamento ventricular com o tratamento com beta-bloqueadores,<sup>30</sup> sugerindo um possível efeito deste alelo na variabilidade interindividual relacionada à tolerabilidade e à resposta aos beta-bloqueadores. Contudo, estes achados não foram confirmados em um estudo recente que avaliou cinco polimorfismos dos receptores adrenérgicos  $\beta 1$  e  $\beta 2$  (incluindo  $\beta 1$ -Arg389Gly), o qual não encontrou interação entre nenhum destes polimorfismos e variações na frequência cardíaca e na FEVE após tratamento com beta-bloqueadores.<sup>31</sup> Da mesma forma, um sub-estudo do MERIT-HF não encontrou associação significativa entre o genótipo do receptor adrenérgico  $\beta 1$ -389 e prognóstico.<sup>15</sup> Esta sub-análise, entretanto, não explorou completamente a potencial interação dos grupos randomizados com os alelos  $\beta 1$ -389. Estes estudos avaliados conjuntamente sugerem uma possível interação farmacogenética entre o efeito dos beta-bloqueadores nos desfechos intermediários e o alelo  $\beta 1$ -389, embora o impacto desta interação no prognóstico da IC não esteja bem estabelecido.

Teoricamente, a sinalização diminuída observada para o alelo  $\beta 1$ -389Gly poderia, de fato, agir de modo similar aos efeitos esperados dos beta-bloqueadores, conferindo proteção para arritmogênese. Nosso achado de um perfil protetor do alelo  $\beta 1$ -389Gly na presença de TVNS em pacientes com IC sustenta este conceito. Embora a relação entre TVNS e morte súbita em IC não esteja definitivamente comprovada<sup>32-35</sup>, a eficácia dos beta-bloqueadores em reduzir arritmias ventriculares complexas pode ser um mecanismo possível para a diminuição de morte súbita observada com este tratamento em diversos ensaios clínicos.<sup>36,37</sup> Este chamado “comportamento protetor do alelo  $\beta 1$ -

389Gly” com relação às arritmias ventriculares foi sugerido previamente em um estudo com pacientes Japoneses portadores de cardiomiopatia dilatada.<sup>20</sup>

No presente estudo, encontramos uma interação farmacogenética significativa entre os efeitos supressivos da terapia com beta-bloqueadores na ocorrência de TVNS e o polimorfismo  $\beta 1$ -Arg389Gly. Interessantemente, pacientes com o alelo  $\beta 1$ -389Gly tiveram uma frequência menor de TVNS e não tiveram supressão desta arritmia com altas doses de beta-bloqueadores, enquanto pacientes sem este alelo (pacientes Arg/Arg) tiveram uma frequência maior TVNS e uma redução significativa (de cerca de 50%) na frequência de TVNS com tratamento com altas doses de beta-bloqueadores. Nossos achados sustentam o conceito de que pacientes portadores do alelo  $\beta 1$ -389Gly podem estar naturalmente protegidos, obtendo benefícios menores com o beta-bloqueio. Uma interação similar foi demonstrada entre os inibidores da ECA e o polimorfismo inserção/deleção da ECA (I/D-ECA). McNamara *et al.* demonstraram associação do alelo D-ECA com risco aumentado de eventos em pacientes com IC, risco este marcadamente reduzido em pacientes recebendo altas doses de inibidores da ECA.<sup>38</sup> Estes estudos, conjuntamente, são a base para o desenvolvimento e validação de novas estratégias terapêuticas que possam considerar a resposta inter-individual às drogas para IC, baseadas na variabilidade geneticamente mediada.

Considerando o delineamento observacional e a ausência de randomização à terapia com beta-bloqueadores, os resultados deste estudo devem ser entendidos como achados exploratórios. Da mesma forma, o efeito supressivo dos beta-bloqueadores na ocorrência de TVNS não é necessariamente o único mecanismo responsável pela redução da mortalidade,

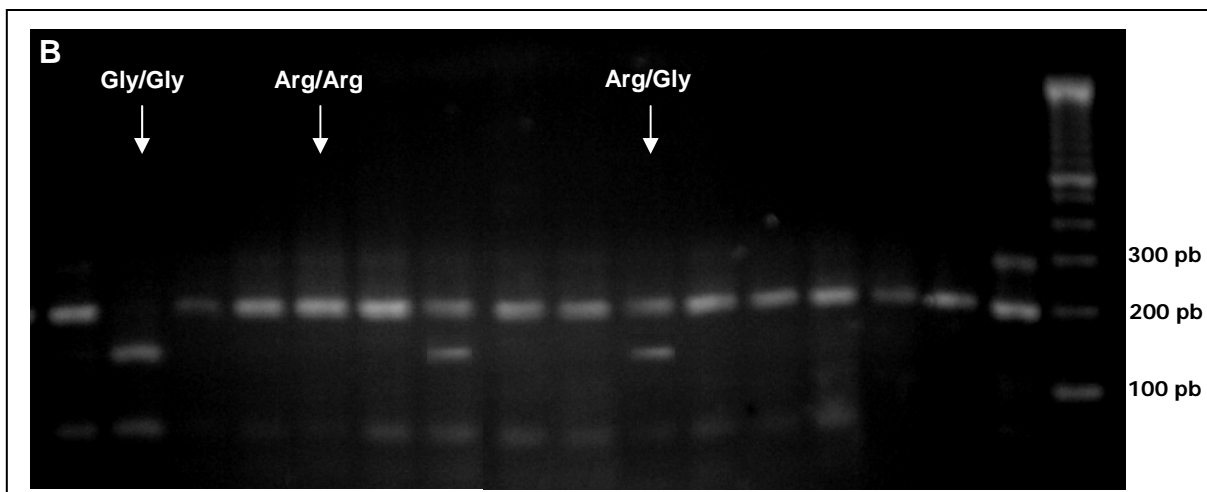
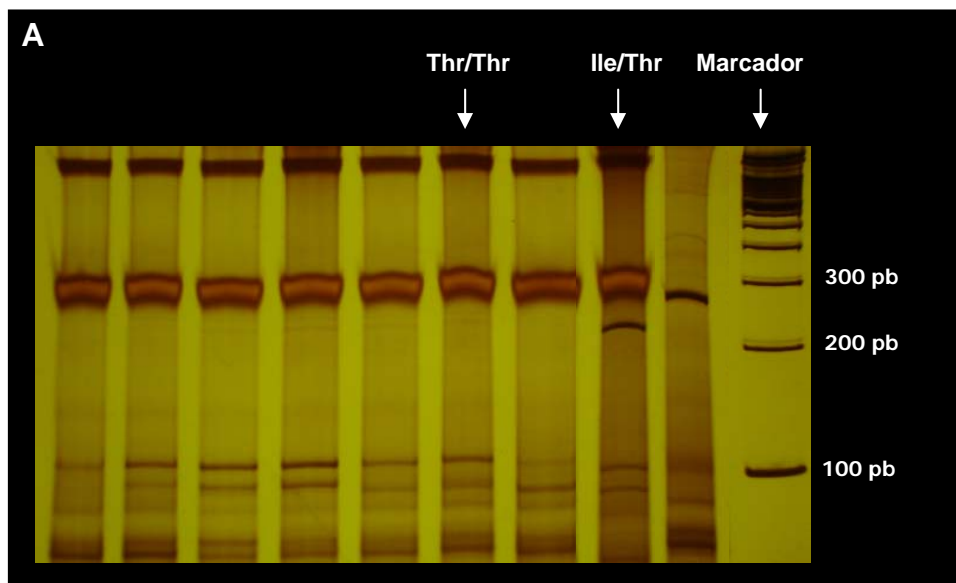


e mesmo a relação entre TVNS e morte súbita ou prognóstico em pacientes com IC ainda não está claramente definida.

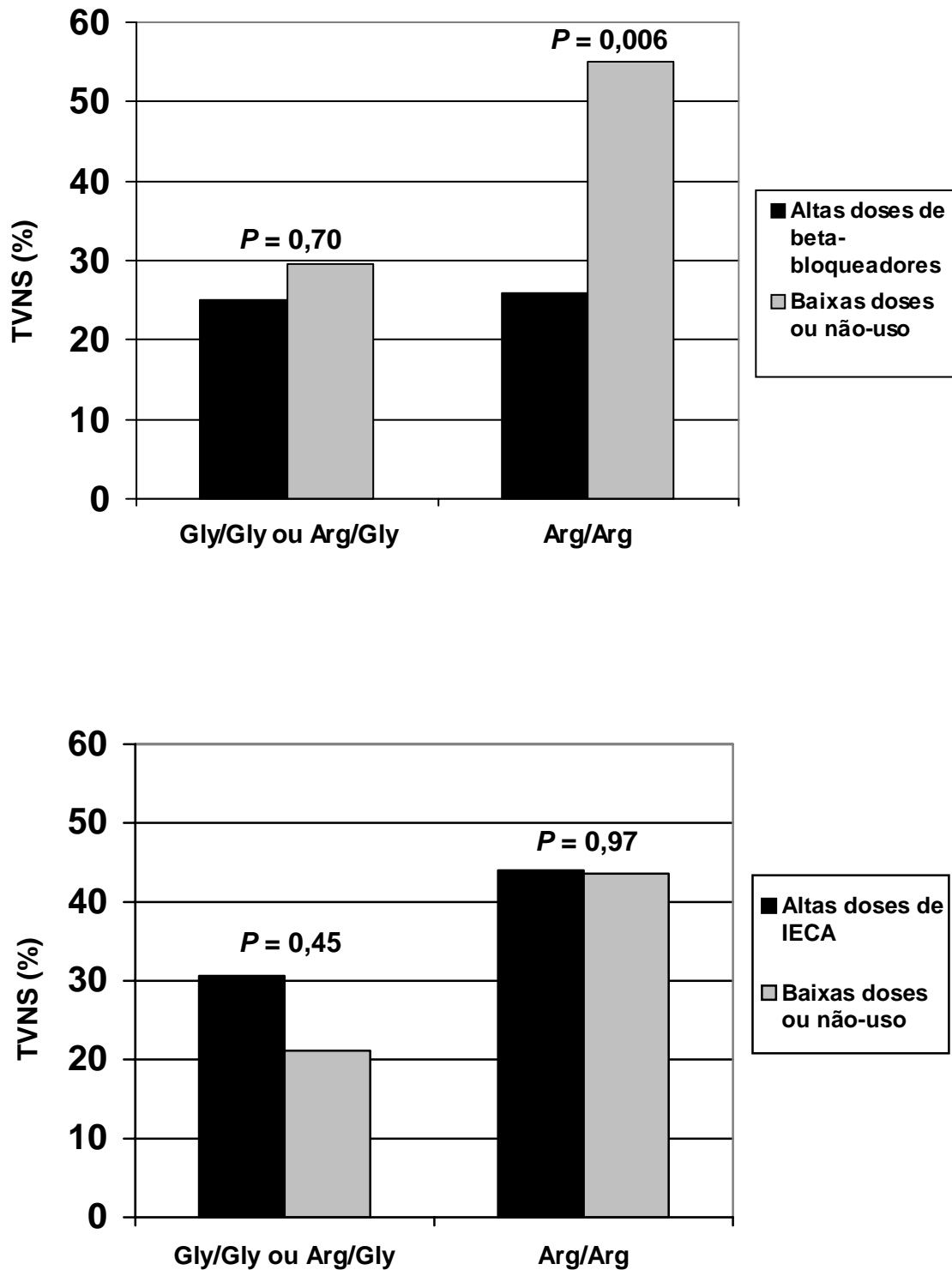
O presente estudo sustenta a hipótese farmacogenética de que o polimorfismo  $\beta$ 1-Arg389Gly pode ter um papel significativo na regulação dos efeitos da terapia com beta-bloqueadores em pacientes com IC, em concordância com estudos funcionais que demonstraram os efeitos do alelo  $\beta$ 1-389Gly na regulação do receptor  $\beta$ 1-adrenérgico. Se esta interação clínica for confirmada examinando-se desfechos primordiais em IC, aproximadamente 40% dos pacientes (aqueles com o alelo  $\beta$ 1-389Gly) poderiam estar naturalmente protegidos, não tendo benefícios com o uso de beta-bloqueadores para controle de arritmias, enquanto aqueles sem este alelo deveriam receber esforços intensificados para iniciar e manter o tratamento em altas doses. Ensaios clínicos prospectivos em larga escala serão necessários para esclarecer esta possibilidade. Em vista da complexidade das estratégias contemporâneas de tratamento da IC, as abordagens individualizadas, em um futuro próximo, serão provavelmente inevitáveis e não apenas opções atrativas. Estudos farmacogenéticos que estabeleçam as potenciais ligações entre polimorfismos genéticos, respostas individualizadas às intervenções e prognóstico são a base que poderá determinar a melhor abordagem a ser desenvolvida e validada.

Em conclusão, nosso estudo não demonstrou associação entre os polimorfismos  $\beta$ 1-Arg389Gly e  $\beta$ 2-Thr164Ile e o desenvolvimento de IC. Adicionalmente, a presença do alelo  $\beta$ 1-389Gly parece exercer um efeito protetor no desenvolvimento de TVNS, influenciando o benefício do uso de

altas doses de beta-bloqueadores sobre a redução desta arritmia (benefício este que é dependente da ausência do alelo  $\beta$ 1-389Gly). Nossos dados sugerem que o desenvolvimento de terapias individualizadas possa envolver a avaliação genotípica, com o objetivo de delinear o melhor regime terapêutico paciente-a-paciente.



**Figura 1. Produtos da reação em cadeia da polimerase – polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP).** *A*, Gel de policrilamida com produtos da amplificação do gene do RA- $\beta$ 2 incluindo a posição 164. A amplificação por PCR resulta em um fragmento de 280 pb, um sítio para restrição para a enzima *MnI* é inserido quando o alelo  $\beta$ 2-164Ile está presente, resultando em fragmentos de restrição de 230 e 50 pb para pacientes heterozigotos (setas). *B*, Gel em 2% agarose mostra o produto do PCR para o gene do RA- $\beta$ 1 na posição 389. O alelo  $\beta$ 1-389Arg resulta em um produto de restrição de 221 pb e o alelo  $\beta$ 1-389Gly insere um sítio de restrição originando fragmentos de 154 e 67 pb após clivagem com a enzima *MvaI*. Para homozigotos  $\beta$ 1-389Arg somente fragmentos de 221 pb são observados; para homozigotos  $\beta$ 1-389Gly, fragmentos de 154 pb e 67 pb são observados e para os heterozigotos todos os três fragmentos são observados (setas).



**Figura 2.** Comparação da prevalência de taquicardia ventricular não-sustentada (TVNS) entre pacientes utilizando altas doses de beta-bloqueadores (superior) e de inibidores da ECA (inferior) em relação a pacientes com baixas doses ou sem as referidas medicações, de acordo com a presença do alelo  $\beta$ 1-389Gly.

**Tabela 1.** Características dos pacientes com insuficiência cardíaca.

<b>Característica</b>	<b>Grupo total (n=151)</b>
Idade (anos)	61,4 ± 12,4
Sexo masculino	99 (66)
Branco	105 (69)
Etiologia	
Isquêmica	63 (42)
Idiopática	57 (38)
Hipertensiva	36 (24)
NYHA classe I ou II	119 (79)
Idade de início da IC (anos)	55,6 ± 12,3
FEVE (%)	31,7 ± 8,1
Fatores de risco	
Hipertensão	84 (55)
Diabete melito	57 (38)
Hipercolesterolemia	60 (40)
Obesidade	15 (10)
Tabagismo atual	18 (12)
Medicações em uso	
Digoxina	112 (74)
Inibidores da ECA	137 (91)
Beta-bloqueadores	129 (85)
Diuréticos	136 (91)
Espironolactona	49 (32)
Monitorização por Holter de 24 horas*	
TVNS	50 (37)
Extra-sístoles ventriculares (n)	389 (40-2171)
SDNN (ms)	103 ± 50

Os valores são expressos como média ± DP, mediana (intervalo interquartil) ou n (%). NYHA - *New York Heart Association*, FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo, ECA – enzima conversora da angiotensina, TVNS – taquicardia ventricular não-sustentada e SDNN – desvio-padrão dos intervalos R-R.

\* realizado em 135 pacientes.

**Tabela 2.** Prevalência dos polimorfismos dos receptores adrenérgicos  $\beta 1$  e  $\beta 2$  em pacientes com insuficiência cardíaca (n=151) e controles (n=154).

	<b>Freqüência Alélica</b>	<b>P</b>	<b>Presença do polimorfismo*</b>	<b>P</b>
<b><math>\beta 1</math>-Arg389Gly</b>				
	<b>Gly</b>		<b>Gly/Gly ou Arg/Gly</b>	
Pacientes com IC	0,22	0,31	64 (42,4)	0,15
Controles	0,18		53 (34,4)	
Etiologia isquêmica	0,23	0,68	27 (42,9)	0,92
Etiologia não-isquêmica	0,21		37 (42)	
<b><math>\beta 2</math>-Thr164Ile</b>				
	<b>Ile</b>		<b>Thr/Ile</b>	
Pacientes com IC	0,013	0,75	4 (2,6)	0,77
Controles	0,016		5 (3,2)	
Etiologia isquêmica	0,008	0,49	1 (1,6)	0,49
Etiologia não-isquêmica	0,017		3 (3,4)	

Os valores de *P* para as comparações das freqüências alélicas e para as comparações da presença ou ausência dos alelos  $\beta 1$ -389Gly e  $\beta 2$ -164Ile foram determinados por teste de qui-quadrado 2x2.

\* n (%) indica a presença de pelo menos um alelo  $\beta 1$ -389Gly ou  $\beta 2$ -164Ile

**Tabela 3.** Características clínicas dos pacientes com e sem taquicardia ventricular não-sustentada.

<b>Característica</b>	<b>Com taquicardia ventricular (n=50)</b>	<b>Sem taquicardia ventricular (n=85)</b>
Idade (anos)	63,4 ± 11,4	60,3 ± 12,9
Sexo masculino	36 (72)	53 (62)
Etiologia isquêmica	17 (34)	41 (48)
Classe Funcional I ou II da NYHA	37 (74)	72 (85)
Branco	35 (70)	58 (68)
Idade de início da IC (anos)	56,5 ± 11,4	55,1 ± 13
FEVE (%)*	29,3 ± 7,8	32,7 ± 8,1
Medicações em uso		
Digoxina	40 (80)	60 (71)
Inibidores da ECA	48 (96)	76 (89)
Beta-bloqueadores	42 (84)	73 (86)
Diuréticos	47 (94)	76 (89)
Espironolactona	19 (38)	23 (27)
Uso de altas doses das medicações		
Beta-bloqueadores*	15 (30)	45 (53)
Inibidores da ECA	35 (70)	56 (66)

Os valores são expressos como média ± DP ou n (%). NYHA - *New York Heart Association*, FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo, ECA – enzima conversora da angiotensina.

\*  $P < 0,05$  para a comparação entre pacientes com e sem taquicardia ventricular.

**Tabela 4.** Prevalência dos genótipos e frequência alélica nos pacientes com e sem taquicardia ventricular não-sustentada.

	Frequência do alelo Gly	P	Genótipo $\beta$ 1-389		P
			Arg/Gly ou Gly/Gly (n=55)	Arg/Arg (n=80)	
<b>Taquicardia Ventricular</b>					
<b>Sim</b>	0,15	0,059	15 (27)	35 (44)	0,05
<b>Não</b>	0,247		40 (73)	45 (56)	

Valores expressos como n (%)

Os valores de *P* para as comparações das frequências alélicas e para a comparação da presença ou ausência do alelo  $\beta$ 1-389Gly foram determinados por teste de qui-quadrado 2x2.



**Tabela 5.** Características dos pacientes de acordo com a presença do alelo  $\beta$ 1-389Gly.

<b>Característica</b>	<b>Pacientes com <math>\beta</math>1-389Gly (Gly/Gly and Arg/Gly)</b>	<b>Pacientes sem <math>\beta</math>1-389Gly (Arg/Arg)</b>
Idade (anos)	61,5 $\pm$ 13	61,4 $\pm$ 11,9
Sexo masculino	43 (67)	56 (64)
Etiologia isquêmica	27 (42)	36 (41)
Classe Funcional I ou II da NYHA	51 (80)	68 (78)
Branco	44 (69)	61 (70)
Idade de início da IC (anos)	55,8 $\pm$ 12,6	55,4 $\pm$ 12
FEVE (%)	32,2 $\pm$ 7,8	31,2 $\pm$ 8,4
<b>Medicações em uso</b>		
Digoxina	47 (73)	64 (74)
Beta-bloqueadores	55 (86)	73 (84)
Inibidores da ECA	57 (89)	80 (92)
Diuréticos	59 (92)	79 (91)
Espironolactona	19 (30)	30 (34)
<b>Uso de altas doses das medicações</b>		
Beta-bloqueadores	30 (47)	35 (40)
Inibidores da ECA	40 (62)	57 (65)

Valores expressos como média  $\pm$  DP ou n (%). NYHA - *New York Heart Association*, FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo, ECA – enzima conversora da angiotensina.

**Tabela 6.** Determinantes independentes de taquicardia ventricular não-sustentada na análise de regressão logística.

<b>Variáveis</b>	<b>Razão de Chances</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
FEVE (para incrementos de 1%)	0,94	0,9 – 0,99	0,01
Pacientes Arg/Arg em altas doses de beta-bloqueador	0,21	0,08 – 0,59	0,003
Pacientes com o alelo Gly e em dose baixa ou sem beta-bloqueador	0,29	0,11 – 0,83	0,02
Pacientes Arg/Arg em dose baixa ou sem beta-bloqueador	4,4	0,88 – 22	0,07

IC: intervalo de confiança, FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo

## REFERÊNCIAS

1. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *New Engl J Med*. 2002;347(18):1397-1402.
2. Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation*. 1993;88(1):107-115.
3. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D; Framingham Heart Study. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2002;106(24):3068-3072.
4. The Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial Investigators. A trial of the beta-blocker bucindolol in patients with advanced chronic heart failure. *New Engl J Med*. 2001;344(22):1659-1667.
5. Carson P, Ziesche S, Johnson G, Cohn JN. Racial differences in response to therapy for heart failure: analysis of the vasodilator-heart failure trials. *J Card Fail*. 1999;5(3):178-187.
6. Feldman AM. The emerging role of pharmacogenomics in the treatment of patients with heart failure. *Ann Thorac Surg*. 2003;76(6):S2246-S2253.
7. Cascorbi I, Paul M, Kroemer HK. Pharmacogenomics of heart failure – focus on drug disposition and action. *Cardiovasc Res*. 2004;64(1):32-39.
8. Joseph J, Gilbert EM. The sympathetic nervous system in chronic heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*. 1998;41(1 Suppl 1):9-16.

9. Esler M, Kaye D, Lanberv G, Esler D, Jennings G. Adrenergic nervous system in heart failure. *Am J Cardiol.* 1997;80(11A):7L-14L.
10. Bristow M. Antiadrenergic therapy of chronic heart failure: surprises and new opportunities. *Circulation.* 2003;107(8):1100-1102.
11. Nabel EG. Genomic Medicine: Cardiovascular Disease. *New Engl J Med.* 2003;349(1):60-72.
12. Hajjar RJ, MacRae CA. Adrenergic-receptor polymorphisms and heart failure. *New Engl J Med.* 2002;347(15):1196-1198.
13. Port JD, Bristow MR. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(5):887-905.
14. Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain of function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta-1 adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 1997;274(18):12670-12674.
15. White HL, de Boer RA, Maqbool A, Greenwood D, van Veldhuisen DJ, Cuthbert R, Ball SG, Hall AS, Balmforth AJ; MERIT-HF sub-study. 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(4):463-468.
16. Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SLR, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of  $\beta$ 1-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *New Engl J Med.* 2002;347(15):1135-1142.
17. Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M, Nicaud V, Cambien F, Tiret L, Poirier O, Desnos M, Jullières Y, Amouyel P, Roizès G, Dorent R, Schwartz K, Komajda M. Characterization of a unique genetic variant in the  $\beta$ 1-

- adrenoreceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Moll Cell Cardiol.* 1999;31(5):1025-1032.
18. Perez JM, Rathz DA, Petrashevskaya NN, Hahn HS, Wagoner LE, Schwartz A, Dorn II GW, Liggett SB.  $\beta$ 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med.* 2003;9(10):1300-1305.
19. Wagoner LE, Craft LL, Zengel P, McGuire N, Rathz DA, Dorn II GW, Liggett SB. Polymorphisms of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor predict exercise capacity in heart failure. *Am Heart J.* 2002;144(5): 840-846.
20. Iwai C, Akita H, Shiga N, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M, Kawai H, Takarada A, Kajiyama T, Yokoyama M. Suppressive effect of the Gly389 allele of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J.* 2002;66(8):723-728.
21. Turki J, Lorenz JN, Green AS, 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(19):10483-10488.
22. Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, Hornung RW, Hoit BD, McIntosh TC, Walsh RA. The Ile164  $\beta$ 2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest.* 1998;102(8):1534-1539.
23. Bartlett JM, White A. Extraction of DNA from whole blood. *Methods Mol Biol.* 2003;226:29-32.
24. Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: Standards of

- measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J*. 1996;17(3):354-381.
25. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(7):2101-2113.
26. Forleo C, Resta N, Sorrentino S, Guida P, Manghisi A, De Luca V, Romito R, Iacoviello M, Tommasi E, Troisi F, Rizzon B, Guanti G, Rizzon P, Pitzalis MV. Association of  $\beta$ -adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med*. 2004;117(7):451-458.
27. Aynacioglu AS, Cascorbi KG, Özkur M, Bekir N, Roots I, Brockmüller J. Population frequency, mutation linkage and analytical methodology for the Arg16Gly, Gln27Glu and Thr164Ile polymorphisms in the  $\beta$ 2-adrenergic receptor among Turks. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48(5):761-764.
28. Tiret L, Mallet C, Poirier O, Nicaud V, Millaire A, Bouhour JB, Roizes G, Desnos M, Dorent R, Schwartz K, Cambien R, Komajda M. Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy: the CARDIGENE study. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(1):29-35.
29. Terra SG, Pauly DF, Lee CR, Patterson JH, Adams KF, Schofield RS, Belgado BS, Hamilton KK, Aranda JM, Hill JA, Yarandi HN, Walker JR, Phillips MS, Gelfand CA, Johnson JA.  $\beta$ -adrenergic receptor polymorphisms and responses during titration of metoprolol controlled release/extended release in heart failure. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;77(3):127-137.

30. Terra SG, Hamilton KK, Pauly DF, Lee CR, Patterson JH, Adams KF, Schofield RS, Belgado BS, Hill JA, Aranda JM, Yarandi HN, Johnson JA. Beta 1 – adrenergic receptor polymorphisms and left ventricular remodeling changes in response to beta-blocker therapy. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(4):227-234.
31. de Groote P, Helbecque N, Lamblin N, Hermant X, Mc Fadden E, Foucher-Hossein C, Amouyel P, Dallongeville J, Bauters C. 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(3):137-142.
32. Doval HC, Nul DR, Grancelli HO, Varini SD, Soifer S, Corrado G, Dubner S, Scapin O, Perrone SV. Nonsustained ventricular tachycardia in severe heart failure. Independent marker of increased mortality due to sudden death. GESICA-GEMA investigators. *Circulation*. 1996;94(12):3198-3203.
33. Singh SN, Fisher SG, Carson PE, Fletcher RD. Prevalence and significance of nonsustained ventricular tachycardia in patients with premature ventricular contractions and heart failure treated with vasodilator therapy. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(4):942-947.
34. Teerlink JR, Jalaluddin M, Anderson S, Kukin ML, Eichhorn EJ, Francis G, Packer M, Massie BM. Ambulatory ventricular arrhythmias in patients with heart failure do not specifically predict an increased risk of sudden death. *Circulation*. 2000;101(1):40-46.
35. Kearney MT, Fox KA, Lee AJ, Brooksby WP, Shah AM, Flapan A, Prescott Rj, Andrews R, Batin PD, Eckberg DL, Gall N, Zaman AG, Lindsay HS,

- Nolan J. Predicting sudden death in patients with mild to moderate chronic heart failure. *Heart*. 2004;90(10):1137-1143.
36. Cice G, Tagliamonte E, Ferrara L, Iacono A. Efficacy of carvedilol on complex ventricular arrhythmias in dilated cardiomyopathy: double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur Heart J*. 2000;21(15):1259-1264.
37. McMurray J. Beta-blockers, ventricular arrhythmias, and sudden death in heart failure: not as simple as it seems. *Eur Heart J*. 2000;21(17):1214-1215.
38. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, Janosko MSN, MacGowan GA, Mathier M, Murali S, Feldman AM, London B. Pharmacogenetic interactions between angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(10):2019-2026.



**ARTIGO ORIGINAL: VERSÃO EM INGLÊS**

**Role of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Polymorphisms in Patients with Heart  
Failure: Risk of Complex Ventricular Arrhythmias and Potential  
Pharmacogenetic Interactions**

## ABSTRACT

**Background:** In the present study, we evaluated the potential role of  $\beta$ 1-Arg389Gly and  $\beta$ 2-Thr164Ile polymorphisms on heart failure (HF) risk, as well as the potential interaction of  $\beta$ 1-389Gly allele with complex ventricular arrhythmias and HF treatment.

**Methods:** Genotyping of  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 adrenergic receptors was performed respectively at codons 389 and 164 in 151 outpatients with systolic HF and 154 control subjects. Holter monitoring was performed in 135 (89%) HF patients to evaluate the presence of complex ventricular arrhythmias and heart rate variability indices.

**Results:** Patients were  $61 \pm 12$  years-old, 42% of ischemic etiology, 66% male and 79% in New York Heart Association class I or II.  $\beta$ 1-389Gly and  $\beta$ 2-164Ile allele frequencies in patients were 0.22 and 0.013, respectively. There was no influence of either polymorphism on HF risk in this sample. However, patients with at least one  $\beta$ 1-389Gly allele had a lower occurrence of non-sustained ventricular tachycardia (NSVT) (27% versus 44% for those without this allele,  $P=0.05$ ). Furthermore, high-dose use of beta-blockers was associated with a lower prevalence of NSVT, and a significant pharmacogenetic interaction was observed according to  $\beta$ 1-389 genotype. Patients who were homozygous for  $\beta$ 1-389Arg had a two-fold reduction on NSVT occurrence when using high-dose beta-blockers (26% versus 55% for those on low-dose or non-users,  $P=0.006$ ),

with no effect for those with at least one  $\beta$ 1-389Gly allele (25% versus 29%  $P=0.7$ ).

**Conclusions:**  $\beta$ 1-Arg389Gly and  $\beta$ 2-Thr164Ile polymorphisms are not associated with HF susceptibility. The  $\beta$ 1-389Gly allele had a suppressive effect on ventricular arrhythmia and patients without this allele (Arg/Arg patients) seemed to benefit the most from intense beta-blockade regarding reduction of NSVT. Evaluation of  $\beta$ 1-389 genotype may provide a new tool to design individualized therapy for HF patients.

## INTRODUCTION

Heart failure (HF) is a significant health problem worldwide and despite many recent treatment advances, HF related morbidity and mortality remain elevated.<sup>1-3</sup> The sustained morbid impact of HF occurs, in part, because the majority of patients may not benefit from all available therapeutic strategies. Significant individual variability not only on response to pharmacological therapies, but also on clinical presentation has been observed by several investigators.<sup>4,5</sup> Race, gender and environment may be implicated, but genetically mediated variability has also emerged as a central aspect on risk, prognosis and response to different therapies in HF patients.<sup>6,7</sup>

Regardless of the initial insult, depressed cardiac output results in sympathetic activation. Several experimental and clinical studies demonstrate that this sustained adrenergic drive can be deleterious to the failing heart, contributing to HF progression, perpetuation and presentation.<sup>8,9</sup> Adrenergic receptors provide a limiting step of the adrenergic pathway; recently the role of adrenergic receptor polymorphisms has been focus of intense investigation.<sup>6,10-12</sup>  $\beta$ 1-adrenergic receptor is the predominant receptor subtype in healthy subjects, and its activation results in increased inotropic, lusitropic, and chronotropic properties.<sup>13</sup> A common polymorphism of  $\beta$ 1-adrenergic receptor leads to either a Glycine ( $\beta$ 1-389Gly) or an Arginine ( $\beta$ 1-389Arg) at amino acid position 389, a critical point for G protein coupling.<sup>14,15</sup> Although this polymorphism may be related to the risk of HF development in specific populations, this association remains controversial.<sup>16,17</sup> The  $\beta$ 1-389Arg variant receptor has higher coupling affinity being associated with hyperactive signaling

and enhanced beta-blockade response in experimental HF models.<sup>18</sup> Conversely, HF patients with the  $\beta$ 1-389Gly allele had significantly reduced exercise capacity as determined by lower peak oxygen consumption.<sup>19</sup> Furthermore, as the  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism is associated with reduced signaling, it theoretically could result in protective effects on cardiac function and arrhythmogenesis. In fact, one report in Japanese patients with dilated cardiomyopathy suggests that the presence of  $\beta$ 1-389Gly allele is associated with lower frequency of ventricular arrhythmias (NSVT).<sup>20</sup>

A polymorphism of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor - Threonine (Thr) to Isoleucine (Ile) substitution at amino acid 164 - resulting in severely impaired receptor function, has been associated to depressed resting and agonist-stimulated contractile function in transgenic mice *in vivo*.<sup>21</sup> This substitution (Thr to Ile) is associated with significantly worse long-term prognosis in HF patients.<sup>22</sup> Despite these initial findings, the role of  $\beta$ -adrenergic receptor polymorphisms on HF risk and presentation and their potential interaction with therapeutic responses remain to be clarified.

As genetic polymorphisms may have distinct prevalence and impact on phenotypic characteristics according to the genetic background of the studied population, the present prospective observational study was undertaken to evaluate the relationship of  $\beta$ 1-Arg389Gly and  $\beta$ 2-Thr164Ile polymorphisms with (1) the risk of HF development (in a case-control design), (2) clinical markers of sympathetic activation (presence of complex ventricular arrhythmias and heart rate variability indices) and (3) specific pharmacological responses to common HF drugs, in a Brazilian sample of HF patients.

## METHODS

### Study Subjects

HF patients and control subjects were recruited from a tertiary care university hospital from Porto Alegre, Brazil. Consecutive eligible patients who agreed to participate were enrolled from the Heart Failure Clinic between October, 2003 and November, 2004. The eligibility criteria were age  $\geq 18$  years and left ventricular ejection fraction (LVEF) less than 45%, irrespective of functional class. We included only patients with diagnosis of ischemic, hypertensive and idiopathic dilated cardiomyopathy. Patients whose heart failure was due to primary valvular disease, myocarditis or infectious (Chagas' disease), toxic (alcohol, doxorubicin), obstructive or hypertrophic cardiomyopathies were not included in the present evaluation. Patients with reduced life-expectancy and those with auto-immune diseases were also excluded. Controls were recruited prior to voluntary blood donation and consisted of unrelated and apparently healthy subjects (as assessed by questionnaire). Blood donors with a history of cardiovascular disease or cardiovascular related symptoms and those with a positive family history of premature sudden death were excluded. 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. All subjects provided written informed consent. Demographic, clinical, and routine laboratory data of all patients were collected.

## Genotyping

Genomic DNA was extracted from samples of peripheral blood by standard procedures.<sup>23</sup> The adrenergic-receptor genotypes were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. For the  $\beta$ 2- Thr164Ile polymorphism, PCR reactions were carried out in a total volume of 25  $\mu$ l containing 100-200 ng genomic DNA, 1.6  $\mu$ mol each primer, 4 units Taq DNA polymerase, 400 mmol dNTP, 4 mmol  $MgCl_2$  and 10% DMSO. A 280-bp fragment including the polymorphic site at codon 164 was amplified using the sense primer (5'-TTACTTCACCTTTCAAGTA-CCAGAGC-3') and the antisense primer (5'-CATAGCAGTTGAT-GGCTTCCTG-3'). PCR conditions were as follows: 2 min initial denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 30 s; primer annealing at 57°C for 1 min, primer extension at 72°C for 1 min) followed by a final extension (7 min at 72°C). After amplification, 10  $\mu$ l of the PCR product were digested with 10 U *Mn*/l at 37°C for 3 hours. All fragments were separated on a 29:1 polyacrilamide gel and visualized with silver staining (Figure 1, A).

For the  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism, the sense and antisense PCR primers 5'-TGGGCTACGCCAACTCGG-3' and 5'-GGCCCCGACGACATCGTC-3' originated a 221 bp amplification product. In brief, 100-200 ng genomic DNA was amplified using 400 nmol dNTP, 4 mmol  $MgCl_2$ , 3 units Taq DNA polymerase, 10% DMSO and 1.6  $\mu$ mol each primer in a final volume of 25  $\mu$ l. Touch-down PCR was performed with temperatures of 58-52°C, including an initial denaturation at 94°C for 2 min followed by 30 cycles of amplification

starting with 58°C, 56°C, 54°C and then continuing for 27 cycles at 52°C annealing temperature and extension at 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. After amplification, PCR product was digested with 2 units of *Mva*I at 57°C for 2 hours and the products of digestion were separated on 2% agarose gels which were analyzed after ethidium bromide staining (Figure 1, B).

A known positive control (confirmed by sequencing) was run in all experiments concomitantly with samples.

### **Assessment of Arrhythmias**

We also evaluated data from 24-hour Holter monitoring for the presence of complex ventricular arrhythmia and heart-rate variability indices. Patients were instructed to maintain their current medical regimen and to continue with their normal everyday activities during recordings, but to avoid intense physical exercise. Holter tracings were analyzed by a staff cardiologist, who was unaware of  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 genotypes, using a semiautomatic technique (Mars 8000 analyzer, Marquette Medical Systems, Milwaukee, Wis). This analyzer identifies and counts the total number of normal beats, artifacts, and ectopies, and creates a time series of normal R-R intervals, with a resolution of 8 ms. Ventricular premature beats (VPBs) were classified as isolated beats, pairs or runs of non-sustained ventricular tachycardia (NSVT), defined as three or more consecutive ventricular ectopic beats with a heart rate > 100 beats/min. Standard deviation of all normal R-R intervals (SDNN) was calculated using files containing normal R-R intervals, according to the recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology.<sup>24</sup>



## Drug Therapy Classification

Regarding beta-blocker and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor treatments, patients were classified according target doses defined by heart failure treatment guidelines as high-dose users (at or above 50 mg/day of carvedilol, 150 mg/day of metoprolol tartarate or 200 mg/d of metoprolol succinate for beta-blockers, and at or above 20 mg/day of enalapril or 150 mg/day of captopril for ACE inhibitors) or as low-dose or non-users (those on lower doses or without respective treatments).<sup>25</sup>

## 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. Allele frequencies were computed by standard gene-counting methods. Two-by-two chi-square tests were used to test for association between risk of heart failure and genotype or allele frequency, and to evaluate the possible interactions between polymorphisms and HF etiology. Differences on clinical characteristics between groups (presence or absence of NSVT [Table 3] or  $\beta$ 1-AR genotype [Table 5]) were assessed by the Student *t* test or chi-square test, as appropriate. Finally, potential interactions between dosing of commonly prescribed HF drugs (beta-blockers and ACE inhibitors),  $\beta$ 1-adrenergic receptor polymorphism and the presence of NSVT on Holter monitoring were also evaluated. Logistic regression analysis was performed to identify independent determinant of NSVT and clinically relevant interaction terms were tested in the models. For all analyses, a bi-caudal *P*-value  $< 0.05$

was considered statistically significant. All statistical analysis were performed using SPSS version 12.0.

## RESULTS

### Clinical Characteristics of HF Patients and Controls

We evaluated 151 HF patients and 154 healthy controls. HF patients were predominantly white (69%), male (66%), with moderate to severe left ventricular dysfunction and in New York Heart Association Class I or II (79%), with 42% of ischemic etiology (Table 1). As expected, the majority of patients were on ACE inhibitors (91%) and beta-blocker (85%) therapy. Holter monitoring was available for 135 (89%) patients, and NSVT was observed in 50 (33%) of them. Controls were younger than patients ( $41.4 \pm 7.8$  versus  $61.4 \pm 12.4$  years old,  $P < 0.01$ ); 117 (75%) were males and 122 (78%) were white.

### $\beta 1$ and $\beta 2$ Adrenergic Receptor Polymorphisms and HF Risk

Table 2 shows the prevalence of  $\beta 1$ -Arg389Gly and  $\beta 2$ -Thr164Ile polymorphisms and the respective allele frequencies in the sample. For both polymorphisms there were no differences on genotype or allele frequency between HF patients and control subjects. In analysis stratified by etiology (ischemic and non-ischemic HF patients) we also did not observe significant differences between patients and controls. The prevalence of the  $\beta 2$ -164Ile allele was relatively low (2.6%).

There was no association between race (white and non-white) and both polymorphisms ( $\beta 1$ -389Gly present in 43% of white versus 42% of non-white

patients,  $\beta$ 2-164Ile present in 2.9% versus 2.2%, respectively). Also, there was no association between genotypes and HF risk in white and non-white subjects, when examined separately. The  $\beta$ 1-389Gly allele was present in 42% of HF white patients and 35% of white controls ( $P=0.34$ ) and in 43% and 30% of non-white patients and controls, respectively ( $P=0.23$ ). The percentage of patients and controls with the  $\beta$ 2-164Ile allele was 2.8% and 3.3% for whites ( $P=0.82$ ), and 2.2% and 2.9% for non-whites ( $P=0.83$ ), respectively.

### **$\beta$ 1 Adrenergic Receptor Polymorphism, Ventricular Arrhythmia and Heart Rate Variability**

We further evaluated HF patients according to the presence of NSVT and SDNN values on Holter monitoring. Table 3 shows clinical characteristics of patients with and without NSVT. Patients with NSVT had lower LVEF (29% versus 33%,  $P=0.02$ ) and were less frequently on high-dose beta-blockers (30% versus 52%,  $P=0.01$ ). All other characteristics were similar between patients with and without NSVT. The presence of NSVT according to the  $\beta$ 1-389 genotype and allele frequency in HF patients is shown in Table 4. Patients with  $\beta$ 1-389Gly allele had a lower occurrence of NSVT, with borderline statistical significance (odds ratio = 0.64, 95% confidence interval = 0.39 – 1.0;  $P=0.05$ ).

SDNN analysis was technically possible in 88 patients (exclusions mostly due to atrial fibrillation). There was no significant difference in SDNN values between patients with and without  $\beta$ 1-389Gly allele ( $105 \pm 38$  versus  $113 \pm 50$  ms, respectively,  $P=0.43$ ). Similar findings were observed in analysis using different cut-offs of SDNN values (SDNN < 70 ms or SDNN < 100 ms). We also

did not find any significant effect of HF drugs on SDNN values, although patients on high-dose beta-blockers tended to have higher values than those using low-dose or non-users ( $117 \pm 44$  versus  $101 \pm 44$  ms,  $P=0.09$ ).

### **$\beta$ 1-389Gly Allele, NSVT and Pharmacogenetic Interactions**

To explore the potential pharmacogenetic interaction between ACE inhibitor or beta-blocker therapy and the  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism, we compared the effects of these pharmacological interventions on NSVT prevalence according to the presence of  $\beta$ 1-389Gly. Firstly, we analyzed all patients according to the presence of  $\beta$ 1-389Gly allele; no particular clinical characteristic was associated with this polymorphism (Table 5).

For beta-blocker therapy, the intensity of beta-blockade had no effect on the percentage of NSVT for patients with at least one  $\beta$ 1-389Gly allele (protective genotype). On the other hand, patients without this variant (Arg/Arg patients) had a two-fold reduction of NSVT prevalence if they were on high-dose beta-blockers in comparison to low-dose or non-use (Figure 2, top). In multivariate logistic regression adjusted for LVEF (Table 6), patients receiving high-dose beta-blocker and that with at least one Gly allele were highly protected from NSVT (odds ratio = 0.21, 95% confidence interval = 0.08 – 0.59, and 0.29, 95% CI = 0.11 – 0.83 respectively,  $c$  statistics = 0.72).

Regarding ACE inhibitor therapy, there was no difference on NSVT percentage between patients on high-dose ACE-inhibitors and those on lower doses or non-use, both for patients with and without the  $\beta$ 1-389Gly allele (Figure 2, bottom).

## DISCUSSION

In the present study, the  $\beta$ 1-Arg389Gly and  $\beta$ 2-Thr164Ile adrenergic receptor polymorphisms were not related to risk of HF in a Brazilian sample of HF patients. The prevalence of these polymorphisms in both patients and controls was similar to that previously described, with a low prevalence for the  $\beta$ 2-164Ile allele and a relatively common presence of  $\beta$ 1-389Gly.<sup>22,26,27</sup> In particular, our analysis showed a significant association between the  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism and complex ventricular arrhythmias, with a suppressive effect of  $\beta$ 1-389Gly allele on development of NSVT. Finally, we also demonstrated a pharmacogenetic interaction between the  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism and the effect of beta-blockers on NSVT.

Several investigators have evaluated the role of genetic polymorphisms on risk for HF, but findings are not uniform and most studies failed to find a significant association for both ischemic and idiopathic etiologies.<sup>22,26,28</sup> The CARDIGENE study, for instance, was an European initiative that did not identify increased susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy associated with 8 candidate genes.<sup>28</sup> None of these polymorphisms, however, involved genetically mediated variations of adrenergic receptors. Recently, a landmark study by Small et al. found a significant 10-fold increase in HF risk for patients who were simultaneously homozygous for the  $\beta$ 1-389Gly allele and had a four-amino acid deletion on  $\alpha$ 2c-adrenergic receptor, suggesting a synergistic action on the adrenergic pathway to increase HF susceptibility, specially in black patients.<sup>16</sup> For clinical purposes, genotyping these *loci* might be a useful approach to

identify sub-groups at risk for HF and consequently candidates for early preventive measures.

Functional consequences of  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism may influence progression and specific characteristics of HF. Hearts from transgenic mice expressing  $\beta$ 1-389Arg show increased contractility acutely, but a marked contractile impairment and no responsiveness to inotropic stimulus after six months; moreover, hearts from  $\beta$ 1-389Gly mice are less sensitive to beta-blockade.<sup>18</sup> Studies in humans that evaluated a potential interaction between this allele and response to beta-blocker therapy are not consensual. Perez et al. studied the response to carvedilol in HF patients and observed that Arg/Arg patients showed a substantially greater improvement in LVEF than  $\beta$ 1-389Gly carriers.<sup>18</sup> Other studies demonstrated that patients with the  $\beta$ 1-389Gly allele were more likely to require increases in HF medications during titration of metoprolol<sup>29</sup>, and that Arg/Arg patients had greater improvements in left ventricular remodeling from beta-blocker treatment<sup>30</sup>, suggesting a possible effect of this allele in the interindividual variability related to the tolerability and response to beta-blockers. However, these findings were not confirmed in a recent study that evaluated five  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 adrenergic receptor polymorphisms (including  $\beta$ 1-Arg389Gly) which found no interaction between these polymorphisms and variations of heart rate and LVEF after beta-blockade.<sup>31</sup> Accordingly, a sub-study of the MERIT-HF trial failed to demonstrate a significant association between  $\beta$ 1-389 genotype and prognosis.<sup>15</sup> This sub-analysis, nevertheless, did not explore thoroughly the potential interaction of randomization groups and the  $\beta$ 1-389 status. These studies taken together

suggest a possible pharmacogenetic interaction between the effect of beta-blockers on surrogate end-points and the  $\beta 1$ -Arg389Gly polymorphism, although the impact of this interaction on HF prognosis has not been well established.

Theoretically, the reduced signaling seen for the  $\beta 1$ -389Gly variant could in fact act in a similar way to the expected effects of beta-blockade, conferring protection for arrhythmogenesis. Our finding of a protective profile of the  $\beta 1$ -389Gly allele on the presence of NSVT in HF patients supports this concept. Although the relationship between NSVT and sudden death in HF is not definitively proven,<sup>32-35</sup> the efficacy of beta-blockers in reducing complex ventricular arrhythmias may be one possible mechanism for the decrease in sudden death observed with this therapy in several clinical trials.<sup>36,37</sup> This so-called “protective behavior of the  $\beta 1$ -389Gly allele” on ventricular arrhythmia has been previously suggested in a study of Japanese patients with dilated cardiomyopathy.<sup>20</sup>

In the present study, we found a significant pharmacogenetic interaction of the suppressive effects of beta-blocker therapy on NSVT with  $\beta 1$ -Arg389Gly polymorphism. Interestingly, patients with the  $\beta 1$ -389Gly allele had a lower frequency of NSVT and no arrhythmia suppression of high-dose beta-blockers, while patients without this allele (Arg/Arg patients) had a higher frequency of NSVT and a significant two-fold reduction on NSVT frequency with high-dose beta-blocker therapy. Our findings support the concept that patients harboring the  $\beta 1$ -389Gly allele may be naturally protected and have lesser benefit with beta-blockade. A similar interaction has been shown between ACE inhibitors

and the ACE insertion/deletion polymorphism (ACE-I/D). McNamara et al. have demonstrated that the ACE-D allele was associated with an increased risk of events in HF patients that was markedly diminished in patients receiving high-dose ACE inhibitors.<sup>38</sup> These studies taken together provide foundation for development and validation of new therapeutical strategies that take into account the inter-individual response to HF drugs based on genetically mediated variability.

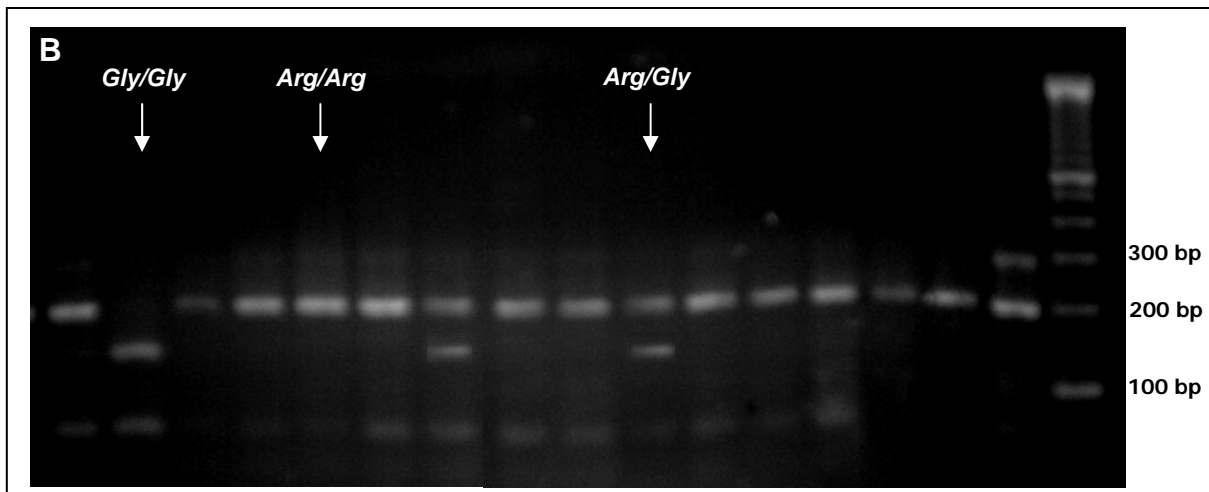
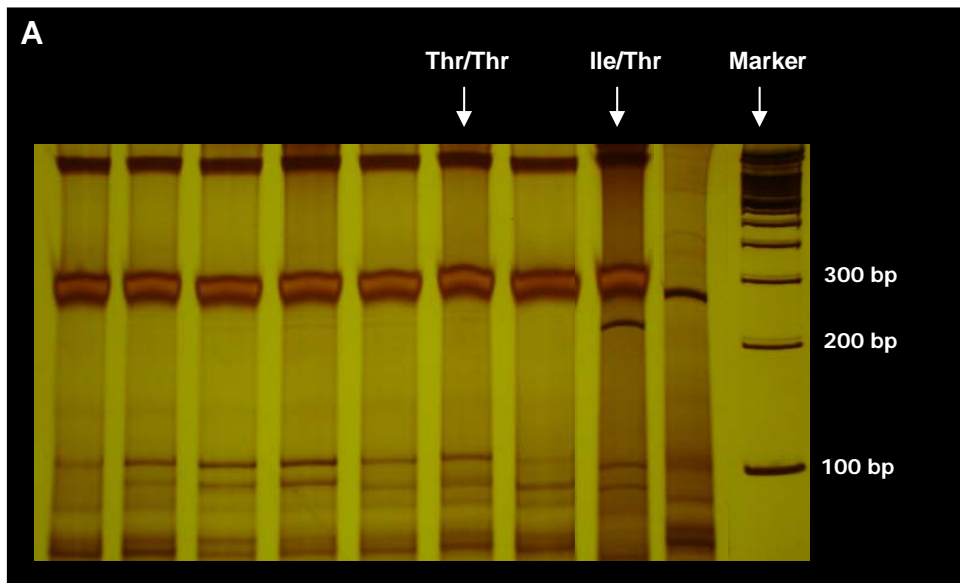
Given the observational design and the absence of randomization to the beta-blocker therapy, these results must be viewed as exploratory findings. We also acknowledge that the suppressive effect of beta-blockers on NSVT is not necessarily the only mechanism responsible for mortality reduction, and even the relationship between NSVT and sudden death or prognosis in HF patients is not clearly defined.<sup>33-36</sup>

This study supports the pharmacogenetic hypothesis that  $\beta$ 1-Arg389Gly polymorphism may play a significant role regulating the effect of beta-blocker therapy in HF patients, in accordance with functional studies of the effect of  $\beta$ 1-389Gly allele on  $\beta$ 1-adrenergic receptor regulation. If this clinical interaction is confirmed examining hard outcomes in HF, approximately forty percent of patients (those with the  $\beta$ 1-389Gly allele) could be naturally protected and have no net benefit with beta-blocker therapy regarding arrhythmia suppression, while those without this allele should receive intensified efforts to initiate and maintain high-dose therapy. Further prospective large-scale clinical studies will clarify this possibility. Given the complexity of contemporary treatment strategies for HF, we believe that individualized approaches will soon become unavoidable, rather than simply an elusive attractive option. Pharmacogenetic

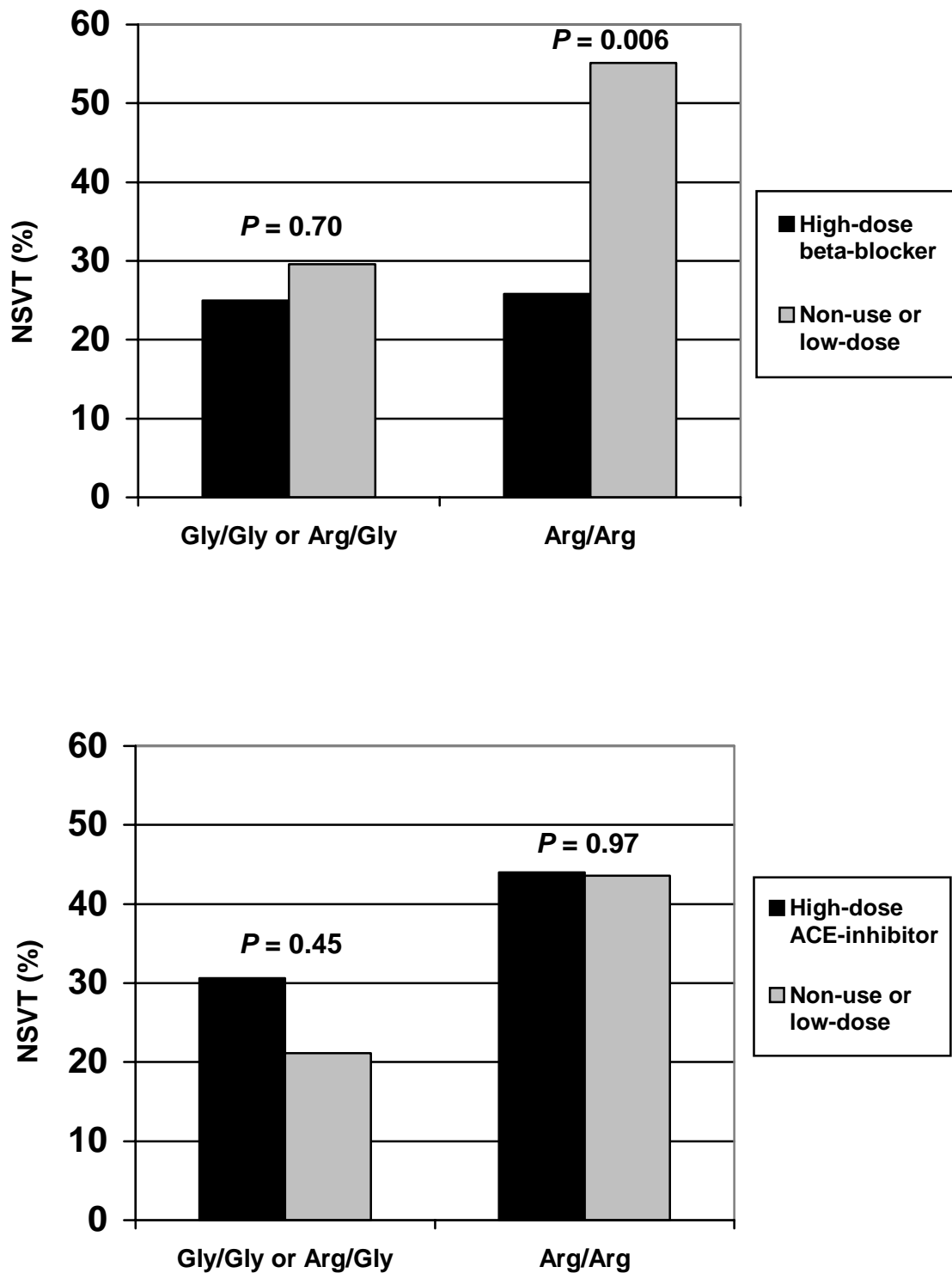


studies that delineate potential links between genetic polymorphisms, inter-individual response to HF drugs and prognosis are the backbone that will point out the best specific approaches to be developed and validated.

In conclusion, our study shows no obvious interaction between  $\beta$ 1-Arg389Gly and  $\beta$ 2-Thr164Ile polymorphisms and HF development. In addition, the presence of the  $\beta$ 1-389Gly allele seemed to exert a protective effect on the development of NSVT associated with diverse benefit on the reduction of this arrhythmia under high-dose beta-blocker strategy according the presence of  $\beta$ 1-389Gly allele. Our data suggest that individual therapy design may involve genotypic profile in order to deliver the best custom-fit therapeutic regimen for HF patients.



**Figure 1. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) products.** A, Polycrilamide gel with  $\beta$ 2-AR gene amplification products including the region of codon 164. PCR amplification results in a 280 bp fragment; a restriction site for the enzyme *MnI* is inserted when the  $\beta$ 2-Ile164 allele is present, resulting in restriction fragments of 230 and 50 bp for the heterozygous patients (arrow). B, 2% agarose gel shows the PCR product for  $\beta$ 1 AR gene surrounding the codon 389. The  $\beta$ 1-389Arg allele results in a 221 bp restriction product, and the  $\beta$ 1-389Gly allele inserts a restriction site originating 154 bp and 67 bp fragments after cleavage with the *MvaI* enzyme. For  $\beta$ 1-389Arg homozygotes only the 221 bp fragment is observed; for  $\beta$ 1-389Gly homozygotes 154 bp and 67 bp fragments are observed; for the heterozygotes all 3 fragments are observed (arrows).



**Figure 2.** Comparison of prevalence of non-sustained ventricular tachycardia (NSVT) between patients with full-dose use of beta-blockers (top) and ACE inhibitors (bottom) in relation to patients with non-use or no full-dose, according to the presence of the  $\beta_1$ -389Gly allele.

**Table 1.** Characteristics of the patients with heart failure.

<b>Characteristic</b>	<b>Total group (n=151)</b>
Age (yr)	61.4 ± 12.4
Male sex	99 (66)
White	105 (69)
Etiology	
Ischemic	63 (42)
Idiopathic	57 (38)
Hypertensive	36 (24)
NYHA class I or II	119 (79)
Age at HF onset (yr)	55.6 ± 12.3
LVEF (%)	31.7 ± 8.1
Risk factors	
Hypertension	84 (55)
Diabetes	57 (38)
Hypercholesterolemia	60 (40)
Obesity	15 (10)
Current smoking	18 (12)
Medications	
Digoxin	112 (74)
ACE inhibitors	137 (91)
Beta-blockers	129 (85)
Diuretics	136 (91)
Spironolactone	49 (32)
24-hour Holter monitoring*	
NSVT	50 (37)
Ventricular premature beats (n)	389 (40-2171)
SDNN (ms)	103 ± 50

Values are expressed as means ± SD, median (interquartile range) or n (%). NYHA - New York Heart Association, LVEF - left ventricular ejection fraction, ACE - angiotensin-converting enzyme, NSVT – Non-sustained ventricular tachycardia and SDNN -standard-deviation of R-R intervals.

\* available for 135 patients.

**Table 2.** Prevalence of  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor and  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor polymorphisms among patients with heart failure (n=151) and controls (n=154).

	Allele frequency	<i>P</i> value	Presence of the polymorphism*	<i>P</i> value
<b><math>\beta</math>1-Arg389Gly</b>				
	<b>Gly</b>		<b>Gly/Gly or Arg/Gly</b>	
Patients with heart failure	0.22	0.31	64 (42.4)	0.15
Controls	0.18		53 (34.4)	
Ischemic	0.23	0.68	27 (42.9)	0.92
Non-ischemic	0.21		37 (42)	
<b><math>\beta</math>2-Thr164Ile</b>				
	<b>Ile</b>		<b>Thr/Ile</b>	
Patients with heart failure	0.013	0.75	4 (2.6)	0.77
Controls	0.016		5 (3.2)	
Ischemic	0.008	0.49	1 (1.6)	0.49
Non-ischemic	0.017		3 (3.4)	

*P* values for the comparisons of allele frequencies and for the comparison of the presence or absence of polymorphisms ( $\beta$ 1-389Gly and  $\beta$ 2-164Ile) were determined by two-by-two chi-square tests.

\* n (%) indicates the presence of at least one  $\beta$ 1-389Gly or  $\beta$ 2-164Ile allele

**Table 3.** Clinical characteristics of patients with and without non-sustained ventricular tachycardia.

Characteristic	Ventricular tachycardia (n=50)	No ventricular tachycardia (n=85)
Age (yr)	63.4 ± 11.4	60.3 ± 12.9
Male sex	36 (72)	53 (62)
Ischemic etiology	17 (34)	41 (48)
NYHA class I or II	37 (74)	72 (85)
White	35 (70)	58 (68)
Age at onset of HF (yr)	56.5 ± 11.4	55.1 ± 13
LVEF (%)*	29.3 ± 7.8	32.7 ± 8.1
Medications		
Digoxin	40 (80)	60 (71)
ACE inhibitors	48 (96)	76 (89)
Beta-blockers	42 (84)	73 (86)
Diuretics	47 (94)	76 (89)
Spironolactone	19 (38)	23 (27)
High-dose use of medications (%)		
Beta-blockers*	15 (30)	45 (53)
ACE inhibitors	35 (70)	56 (66)

Values expressed as means ± SD or n (%). NYHA - New York Heart Association, LVEF - left ventricular ejection fraction, ACE - angiotensin-converting enzyme.

\*  $P < 0,05$  for comparison between patients with and without non-sustained ventricular tachycardia.

**Table 4.** Prevalence of genotypes and allele frequencies in patients with and without non-sustained ventricular tachycardia.

	Gly allele frequency	P value	β1-389 genotype		P value
			Arg/Gly or Gly/Gly (n=55)	Arg/Arg (n=80)	
<b>Ventricular Tachycardia</b>					
<b>Yes</b>	0.15	0.059	15 (27)	35 (44)	0.05
<b>No</b>	0.247		40 (73)	45 (56)	

Values are expressed as n (%)

P values for the comparisons of allele frequencies and for the comparison of the presence or absence of the variant β1-389Gly were determined by two-by-two chi-square tests.

**Table 5.** Characteristics of the patients according to the presence of  $\beta$ 1-389Gly allele.

<b>Characteristic</b>	<b>Patients with <math>\beta</math>1-389Gly (Gly/Gly and Arg/Gly)</b>	<b>Patients without <math>\beta</math>1-389Gly (Arg/Arg)</b>
Age (yr)	61.5 $\pm$ 13	61.4 $\pm$ 11.9
Male sex	43 (67)	56 (64)
Ischemic etiology	27 (42)	36 (41)
NYHA class I or II	51 (80)	68 (78)
White	44 (69)	61 (70)
Age of HF onset (yr)	55.8 $\pm$ 12.6	55.4 $\pm$ 12
LVEF (%)	32.2 $\pm$ 7.8	31.2 $\pm$ 8.4
<b>Medications</b>		
Digoxin	47 (73)	64 (74)
Beta-blockers	55 (86)	73 (84)
ACE inhibitors	57 (89)	80 (92)
Diuretics	59 (92)	79 (91)
Spironolactone	19 (30)	30 (34)
<b>High-dose use of medications</b>		
Beta-blockers	30 (47)	35 (40)
ACE inhibitors	40 (62)	57 (65)

Values expressed as means  $\pm$  SD or n (%). NYHA - New York Heart Association, LVEF - left ventricular ejection fraction, ACE - angiotensin-converting enzyme.



**Table 6.** Independent determinants of non-sustained ventricular tachycardia by logistic regression.

<b>Variables</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>95% CI</b>	<b>P value</b>
LVEF (for increments of 1%)	0.94	0.9 – 0.99	0.01
Arg/Arg patients on high-dose beta-blocker	0.21	0.08 – 0.59	0.003
Patients with at least one Gly allele on low-dose beta-blocker or non-use	0.29	0.11 – 0.83	0.02
Arg/Arg patients on low-dose beta-blocker or non-user	4.4	0.88 – 22	0.07

CI: confidence intervals, LVEF: left ventricular ejection fraction

## REFERENCES

1. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *New Engl J Med*. 2002;347(18):1397-1402.
2. Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation*. 1993;88(1):107-115.
3. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D; Framingham Heart Study. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2002;106(24):3068-3072.
4. The Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial Investigators. A trial of the beta-blocker bucindolol in patients with advanced chronic heart failure. *New Engl J Med*. 2001;344(22):1659-1667.
5. Carson P, Ziesche S, Johnson G, Cohn JN. Racial differences in response to therapy for heart failure: analysis of the vasodilator-heart failure trials. *J Card Fail*. 1999;5(3):178-187.
6. Feldman AM. The emerging role of pharmacogenomics in the treatment of patients with heart failure. *Ann Thorac Surg*. 2003;76(6):S2246-S2253.
7. Cascorbi I, Paul M, Kroemer HK. Pharmacogenomics of heart failure – focus on drug disposition and action. *Cardiovasc Res*. 2004;64(1):32-39.
8. Joseph J, Gilbert EM. The sympathetic nervous system in chronic heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*. 1998;41(1 Suppl 1):9-16.

9. Esler M, Kaye D, Lanberv G, Esler D, Jennings G. Adrenergic nervous system in heart failure. *Am J Cardiol.* 1997;80(11A):7L-14L.
10. Bristow M. Antiadrenergic therapy of chronic heart failure: surprises and new opportunities. *Circulation.* 2003;107(8):1100-1102.
11. Nabel EG. Genomic Medicine: Cardiovascular Disease. *New Engl J Med.* 2003;349(1):60-72.
12. Hajjar RJ, MacRae CA. Adrenergic-receptor polymorphisms and heart failure. *New Engl J Med.* 2002;347(15):1196-1198.
13. Port JD, Bristow MR. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(5):887-905.
14. Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain of function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta-1 adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 1997;274(18):12670-12674.
15. White HL, de Boer RA, Maqbool A, Greenwood D, van Veldhuisen DJ, Cuthbert R, Ball SG, Hall AS, Balmforth AJ; MERIT-HF sub-study. 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(4):463-468.
16. Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SLR, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of  $\beta$ 1-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *New Engl J Med.* 2002;347(15):1135-1142.
17. Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M, Nicaud V, Cambien F, Tiret L, Poirier O, Desnos M, Jullières Y, Amouyel P, Roizès G, Dorent R, Schwartz K, Komajda M. Characterization of a unique genetic variant in the  $\beta$ 1-

- adrenoreceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Moll Cell Cardiol.* 1999;31(5):1025-1032.
18. Perez JM, Rathz DA, Petrashevskaya NN, Hahn HS, Wagoner LE, Schwartz A, Dorn II GW, Liggett SB.  $\beta$ 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med.* 2003;9(10):1300-1305.
19. Wagoner LE, Craft LL, Zengel P, McGuire N, Rathz DA, Dorn II GW, Liggett SB. Polymorphisms of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor predict exercise capacity in heart failure. *Am Heart J.* 2002;144(5): 840-846.
20. Iwai C, Akita H, Shiga N, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M, Kawai H, Takarada A, Kajiyama T, Yokoyama M. Suppressive effect of the Gly389 allele of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J.* 2002;66(8):723-728.
21. Turki J, Lorenz JN, Green AS, 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(19):10483-10488.
22. Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, Hornung RW, Hoit BD, McIntosh TC, Walsh RA. The Ile164  $\beta$ 2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest.* 1998;102(8):1534-1539.
23. Bartlett JM, White A. Extraction of DNA from whole blood. *Methods Mol Biol.* 2003;226:29-32.
24. Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: Standards of

- measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J*. 1996;17(3):354-381.
25. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(7):2101-2113.
26. Forleo C, Resta N, Sorrentino S, Guida P, Manghisi A, De Luca V, Romito R, Iacoviello M, Tommasi E, Troisi F, Rizzon B, Guanti G, Rizzon P, Pitzalis MV. Association of  $\beta$ -adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med*. 2004;117(7):451-458.
27. Aynacioglu AS, Cascorbi KG, Özkur M, Bekir N, Roots I, Brockmüller J. Population frequency, mutation linkage and analytical methodology for the Arg16Gly, Gln27Glu and Thr164Ile polymorphisms in the  $\beta$ 2-adrenergic receptor among Turks. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48(5):761-764.
28. Tiret L, Mallet C, Poirier O, Nicaud V, Millaire A, Bouhour JB, Roizes G, Desnos M, Dorent R, Schwartz K, Cambien R, Komajda M. Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy: the CARDIGENE study. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(1):29-35.
29. Terra SG, Pauly DF, Lee CR, Patterson JH, Adams KF, Schofield RS, Belgado BS, Hamilton KK, Aranda JM, Hill JA, Yarandi HN, Walker JR, Phillips MS, Gelfand CA, Johnson JA.  $\beta$ -adrenergic receptor polymorphisms and responses during titration of metoprolol controlled release/extended release in heart failure. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;77(3):127-137.

30. Terra SG, Hamilton KK, Pauly DF, Lee CR, Patterson JH, Adams KF, Schofield RS, Belgado BS, Hill JA, Aranda JM, Yarandi HN, Johnson JA. Beta 1 – adrenergic receptor polymorphisms and left ventricular remodeling changes in response to beta-blocker therapy. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(4):227-234.
31. de Groote P, Helbecque N, Lamblin N, Hermant X, Mc Fadden E, Foucher-Hossein C, Amouyel P, Dallongeville J, Bauters C. 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(3):137-142.
32. Doval HC, Nul DR, Grancelli HO, Varini SD, Soifer S, Corrado G, Dubner S, Scapin O, Perrone SV. Nonsustained ventricular tachycardia in severe heart failure. Independent marker of increased mortality due to sudden death. GESICA-GEMA investigators. *Circulation*. 1996;94(12):3198-3203.
33. Singh SN, Fisher SG, Carson PE, Fletcher RD. Prevalence and significance of nonsustained ventricular tachycardia in patients with premature ventricular contractions and heart failure treated with vasodilator therapy. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(4):942-947.
34. Teerlink JR, Jalaluddin M, Anderson S, Kukin ML, Eichhorn EJ, Francis G, Packer M, Massie BM. Ambulatory ventricular arrhythmias in patients with heart failure do not specifically predict an increased risk of sudden death. *Circulation*. 2000;101(1):40-46.
35. Kearney MT, Fox KA, Lee AJ, Brooksby WP, Shah AM, Flapan A, Prescott Rj, Andrews R, Batin PD, Eckberg DL, Gall N, Zaman AG, Lindsay HS,

- Nolan J. Predicting sudden death in patients with mild to moderate chronic heart failure. *Heart*. 2004;90(10):1137-1143.
36. Cice G, Tagliamonte E, Ferrara L, Iacono A. Efficacy of carvedilol on complex ventricular arrhythmias in dilated cardiomyopathy: double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur Heart J*. 2000;21(15):1259-1264.
37. McMurray J. Beta-blockers, ventricular arrhythmias, and sudden death in heart failure: not as simple as it seems. *Eur Heart J*. 2000;21(17):1214-1215.
38. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, Janosko MSN, MacGowan GA, Mathier M, Murali S, Feldman AM, London B. Pharmacogenetic interactions between angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(10):2019-2026.

## ANEXOS



**ANEXO I****Termo de Consentimento Informado - Pacientes**

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 alteração 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 a Dra. Nadine Clausell, a Dra Andréia Biolo e o Dr Solano Berger (fone para contato com os pesquisadores 33168344), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Paciente ou responsável:

\_\_\_\_\_  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Assinatura

**ANEXO II****Termo de Consentimento Informado - Controles**

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 alteração que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Para sabermos quais polimorfismos estão associados a esta doença, precisamos conhecer sua frequência em pessoas saudáveis para podermos comparar com os pacientes. Através das perguntas que lhe fizemos, o consideramos saudável do ponto de vista cardiovascular, podendo fazer parte do estudo para a comparação. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue. 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 a Dra. Nadine Clausell, a Dra Andréia Biolo e o Dr Solano Berger (fone para contato com os pesquisadores 33168344), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Paciente ou responsável: \_\_\_\_\_  
Local e data  
\_\_\_\_\_  
Nome  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

## ANEXO III

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

REGISTRO GERAL: \_\_\_\_\_

REGISTRO POLIMORFISMOS: \_\_\_\_\_

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

**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

**CHECKLIST**

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

**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



## ANEXO IV

## QUESTIONÁRIO - CONTROLES

Número controle: _____	Data coleta: ____/____/_____
Nome completo: _____	
Data de nascimento: ____/____/_____	
Sexo: ( ) feminino ( ) masculino	
Cor: ( ) branco ( ) pardo ( ) preto	
Descendência:	
Avó materna: _____	
Avô materno: _____	
Avó paterna: _____	
Avô paterno: _____	

Confirmada ausência de fatores de exclusão: ( ) sim
Angina ou dispnéia aos esforços
HAS
Cardiopatia isquêmica (angina, IAM, angioplastia ou revascularização)
Insuficiência cardíaca
História familiar de morte súbita ou IAM precoce (pai/mãe e irmãos: homens < 55 anos e mulheres < 65 anos)