

ARTIGO ORIGINAL

Impacto da autofagia no prognóstico de pacientes com cardiomiopatia dilatada



Hiromitsu Kanamori, MD, PHD,^a Akihiro Yoshida, MD, PHD,^a Genki Naruse, MD, PHD,^a Susumu Endo, MD,^a Shingo Minatoguchi, MD, PHD,^a Takatomo Watanabe, MD, PHD,^a Tomonori Kawaguchi, MD, PHD,^a Toshiki Tanaka, MD, PHD,^a Yoshihisa Yamada, MD, PHD,^a Nobuhiro Takasugi, MD, PHD,^a Takuma Ishihara, MSC,^b Atsushi Mikami, MD, PHD,^a Nagisa Miyazaki, MD, PHD,^c Kazuhiko Nishigaki, MD, PHD,^a Shinya Minatoguchi, MD, PHD,^a Tatsuhiko Miyazaki, MD, PHD,^d Hiroyuki Okura, MD, PHD^a

RESUMO

CONTEXTO A autofagia é um processo celular que degrada os componentes citoplasmáticos da própria célula para o fornecimento de energia e para manter um ambiente intracelular adequado. O remodelamento reverso do ventrículo esquerdo (RRVE) promete melhorar o prognóstico de pacientes com cardiomiopatia dilatada (CMD).

OBJETIVOS Os autores testaram a hipótese de que a autofagia está envolvida no RRVE e tem valor prognóstico no coração humano com insuficiência.

MÉTODOS Utilizando amostra de biópsia endomiocárdica do ventrículo esquerdo de 42 pacientes com CMD (21 com RRVE e 21 sem RRVE) e sete pacientes com função cardíaca normal (controle), os autores realizaram marcação por imunohistoquímica e por imunofluorescência de cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos e de catepsina D e observação por microscopia eletrônica, além de morfometria geral através de microscopia óptica.

RESULTADOS As características clínicas dos pacientes com RRVE foram semelhantes às das dos pacientes sem RRVE, exceto para pressão arterial pulmonar e dimensão do átrio esquerdo. Não foi observada diferença na morfometria por microscopia óptica entre as amostras de pacientes com CMD, independentemente da presença ou não de RRVE. A microscopia eletrônica revelou que os vacúolos autofágicos (autofagossomos e autolisossomos) e os lisossomos eram abundantes no interior dos cardiomiócitos de pacientes com CMD. Além disso, os cardiomiócitos de pacientes com RRVE continham um número significativamente maior de vacúolos autofágicos, com maior taxa de autolisossomos e de níveis de expressão de catepsina D, quando comparados aos pacientes sem RRVE. A análise de regressão logística ajustada para idade demonstrou que o aumento do número de vacúolos autofágicos e da expressão de catepsina D foram preditores de RRVE. Os pacientes com CMD que alcançaram o RRVE apresentaram menos eventos cardiovasculares durante o período de seguimento.

CONCLUSÕES Os autores demonstram que a autofagia é um marcador preditivo útil de RRVE em pacientes com CMD. Isso fornece novas informações patológicas, transformando-as em uma estratégia para o tratamento da insuficiência cardíaca por CMD. (J Am Coll Cardiol 2022;79:789-801) © 2022 pela American College of Cardiology Foundation.



Ouçá o áudio com o resumo deste artigo, apresentado pelo editor-chefe, Dr. Valentin Fuster, em JACC.org.

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é um distúrbio heterogêneo do miocárdio caracterizado pela dilatação do ventrículo esquerdo (VE) ou biventricular e pela redução do desempenho miocárdico na ausência de hipertensão ou cardiopatia valvular, congênita ou isquêmica¹. A CMD é progressiva

^aDepartamento de Cardiologia, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, Japão; ^bCentro de Promoção de Pesquisas Clínicas e Inovadoras, Gifu University Hospital, Gifu, Japão; ^cDepartamento de Medicina Interna, Asahi University School of Dentistry, Mizuho, Japão; e ^dDepartamento de Patologia, Gifu University Hospital, Gifu, Japão.

Os autores atestam que estão em conformidade com os comitês de estudos humanos e regulamentos de bem-estar animal das instituições dos autores a que estão vinculados e com as diretrizes da agência norte-americana *Food and Drug Administration*, incluindo o consentimento dos pacientes quando apropriado. Para obter mais informações, acesse o [Author Center](#).

Manuscrito recebido em 23 de agosto de 2021; manuscrito revisado recebido em 1 de novembro de 2021, aceito em 29 de novembro de 2021.

**ABREVIATURAS
E ACRÔNIMOS**

AVC = acidente vascular cerebral
BEM = biópsia endomiocárdica
BNP = peptídeo natriurético tipo B
BRA = bloqueador do receptor tipo 1 da angiotensina II
CMD = cardiomiopatia dilatada
ECA = enzima conversora de angiotensina
FEVE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo
LC3 = cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
RRVE = remodelamento reverso do ventrículo esquerdo
VE = ventrículo esquerdo

e, muitas vezes, causa insuficiência cardíaca e aumento do risco de arritmia ventricular potencialmente letal e também de bloqueio atrioventricular, síncope e morte súbita². O prognóstico da CMD melhorou consideravelmente nas últimas décadas^{3,4}. Essa melhoria ocorre em paralelo a um maior índice de remodelamento reverso do VE (RRVE) com terapias farmacológicas e não farmacológicas otimizadas⁴⁻⁶. Aproximadamente 40% dos pacientes apresentam RRVE significativo quando são administrados tratamentos apropriados, sejam farmacológicos e/ou baseados em dispositivos⁵. Visto que pacientes com RRVE apresentam, em sua maioria, bom prognóstico^{5,7,8}, acredita-se que o RRVE seja um determinante essencial do prognóstico

na CMD e deve ser considerado uma meta importante para casos diagnosticados recentemente. Foram realizados muitos estudos envolvendo biópsia endomiocárdica (BEM) em um esforço para identificar um fator prognóstico em pacientes com CMD⁹⁻¹³. BEMs são úteis para detectar danos miocárdicos e descartar miocardite e cardiomiopatias infiltrativas¹⁴. Entretanto, tentativas de utilizar apenas microscopia óptica para o diagnóstico foram muitas vezes malsucedidas devido a alterações miocárdicas sutis e inespecíficas. De fato, avaliações morfológicas convencionais da fibrose miocárdica utilizando microscopia óptica não conseguiram prever o RRVE^{8,10,12}.

Por outro lado, a microscopia eletrônica possibilita a detecção de alterações miocárdicas intracelulares causadas por autofagia¹⁵. A autofagia é um mecanismo conservado que contribui para a manutenção da homeostase intracelular através da degradação de proteínas de vida longa e organelas danificadas^{15,16}. Além disso, atualmente acredita-se que seja um alvo terapêutico útil em várias cardiopatias¹⁶. Vacúolos autofágicos são observados com maior frequência nos cardiomiócitos de pacientes com cardiomiopatia^{17,18}. Nosso grupo relatou anteriormente que a autofagia desempenha um papel protetor na insuficiência cardíaca causada por infarto do miocárdio, cardiomiopatia induzida por doxorubicina, cardiomiopatia diabética e cardiomiopatia induzida por deficiência de delta sarcoglicano¹⁹⁻²³. Nesses estudos, o aumento da autofagia promoveu RRVE e melhorou a disfunção cardíaca^{19,23}. Entretanto, todos esses estudos foram realizados utilizando modelos animais. Pouco se sabe sobre a autofagia associada ao RRVE na insuficiência cardíaca humana. Neste estudo, relatamos a significância da autofagia miocárdica em pacientes com CMD e elucidamos os indicadores úteis preditores da resposta à terapia para insuficiência cardíaca.

MÉTODOS

Os protocolos utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da *Gifu University Graduate School of Medicine* (aprovação n.º 30-059). Este estudo foi realizado em conformidade com os princípios descritos na Declaração de Helsinque.

POPULAÇÃO E DELINEAMENTO DO ESTUDO. Após o estudo ter sido aprovado por nossos comitês de ética locais, os pacientes com CMD foram selecionados retrospectivamente entre aqueles submetidos a BEM do VE no *Gifu University Hospital* de 2005 a 2017. RRVE foi definido como um aumento absoluto na fração de ejeção do VE (FEVE) de $\geq 10\%$ para $>35\%$, acompanhado de uma redução no diâmetro diastólico final do VE $\geq 10\%$, avaliados por ecocardiografia realizada 48 meses (intervalo interquartil [IIQ]: 28-63 meses) após a BEM^{5,7,9}. Com base nesses critérios, os pacientes foram alocados para os grupos com RRVE e sem RRVE. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente utilizando tanto métodos invasivos quanto não invasivos. O diagnóstico de CMD foi realizado de acordo com a definição e classificação propostas pela Organização Mundial da Saúde/*International Society and Federation of Cardiology Task Force*^{24,25}. Todos os pacientes incluídos no estudo apresentavam disfunção sistólica (FEVE $<50\%$). Foram excluídos deste estudo pacientes com estenose coronariana ($>75\%$ estreitamento luminal) ou cardiopatia congênita, metabólica secundária, induzida por medicamentos ou valvular grave e também aqueles com histórico de hipertensão aparente ou cardiomiopatia inflamatória. Dados demográficos que, segundo relatos anteriores, estiveram associados a RRVE em pacientes com CMD foram coletados de prontuários médicos. Tais dados incluíam idade, sexo, índice de massa corporal, pressão sanguínea, histórico familiar, duração dos sintomas e análises sanguíneas. A duração dos sintomas foi definida como o período desde o início dos sintomas ou a detecção de anomalias cardíacas utilizadas para o diagnóstico da CMD até o momento da BEM, e a CMD foi dividida entre aquela de início recente (duração dos sintomas <90 dias) e crônica (≥ 90 dias)²⁶. A CMD foi definida como familiar quando havia pelo menos mais um familiar com CMD. Além disso, foi incluído neste estudo um grupo controle, que apresentava função cardíaca normal. Esse grupo incluiu sete pacientes que tinham suspeita clínica de cardiopatia, incluindo cardiomiopatia hipertrófica apical leve ou sarcoidose cardíaca, devido a desconforto no peito, alteração eletrocardiográfica sutil ou arritmia, mas cujo diagnóstico não foi confirmado nem por exames invasivos de angiografia coronariana nem por resultados de biópsia.

TABELA 1 Características demográficas e clínicas dos pacientes acompanhados

	Total (n = 42)	Com RRVE (n = 21)	Sem RRVE (n = 21)	Valor de P*
Idade, anos	55,5 (45,2-67,0)	54,0 (46,0-66,6)	56,0 (44,0-67,0)	0,980
Sexo masculino	27 (64,3)	13 (61,9)	14 (66,7)	>0,999
IMC, kg/m ²	23,1 (21,3-27,5)	22,8 (19,2-27,6)	23,5 (21,5-27,1)	0,325
Histórico familiar	2 (4,8)	1 (4,8)	1 (4,8)	>0,999
Hipertensão	8 (19,0)	5 (23,8)	3 (14,3)	0,697
Diabetes melito	14 (33,3)	4 (19,0)	10 (47,6)	0,100
Dislipidemia	12 (28,6)	5 (23,8)	7 (33,3)	0,734
Duração da IC >90 dias	12 (28,6)	5 (23,8)	7 (33,3)	0,734
Classe funcional da NYHA I/II/III/IV	10/16/16/0	4/7/10/0	6/9/6/0	0,570
PAS, mmHg	125,5 (101,0-146,2)	128,0 (118,0-149,0)	120,0 (90,0-140,0)	0,227
PAD, mmHg	69,5 (60,8-77,8)	69,0 (64,0-80,0)	70,0 (60,0-75,0)	0,357
FC, batimentos/min	76,0 (67,2-87,8)	78,0 (70,0-92,0)	75,0 (67,0-83,0)	0,159
Química clínica				
Hb, g/dL	13,7 (12,0-14,9)	13,5 (11,7-14,9)	13,7 (12,2-14,2)	0,940
HbA _{1c} , %	6,2 (5,7-7,0)	5,8 (5,6-6,5)	6,3 (6,0-7,2)	0,104
BNP, pg/mL	355,0 (108,6-697,2)	365,5 (79,3-653,0)	352,3 (178,0-923,7)	0,382
TGFe, mL/min/1,73 m ²	64,4 (52,8-78,3)	61,8 (50,7-70,5)	72,3 (55,5-87,8)	0,166
Dados eletromiográficos e ecocardiográficos				
Fibrilação atrial	7 (16,7)	3 (14,3)	4 (19,0)	>0,999
BCRE	2 (4,8)	0 (0,0)	2 (9,5)	0,448
Duração do QRS, ms	100,0 (95,0-109,5)	99,0 (95,0-110,0)	100,0 (95,0-108,0)	0,762
DAE, mm	45,5 (41,0-49,8)	44,0 (39,0-47,0)	47,0 (42,0-55,0)	0,038
ESVI, mm	9,0 (8,0-10,0)	9,0 (8,0-11,0)	9,0 (7,0-11,0)	0,295
EPPVE, mm	9,0 (8,0-11,0)	10,0 (8,0-11,0)	9,0 (8,0-11,0)	0,295
DDFVE, mm	60,5 (56,0-66,0)	60,0 (54,0-64,0)	61,0 (56,0-72,0)	0,377
FEVE, %	32,5 (25,0-40,5)	37,0 (25,0-41,0)	30,0 (24,0-39,0)	0,268
Gravidade da RM				0,410
O (sem RM), I, II	35 (83,3)	19 (90,5)	16 (76,2)	
III, IV	7 (16,7)	2 (9,5)	5 (23,8)	
Dados do cateterismo				
iVDFVE, mL/m ²	132,0 (123,0-164,0)	131,5 (122,2; 148,2)	144,0 (125,0-183,0)	0,272
iVSFVE, mL/m ²	89,0 (71,9-112,0)	85,9 (75,7-102,3)	103,0 (71,9-135,5)	0,270
PPCP, mmHg	12,5 (8,0-22,8)	9,0 (6,0-15,0)	18,0 (12,0-27,0)	0,026
Índice cardíaco, L/min/m ²	2,7 (2,2-3,4)	3,1 (2,4-4,3)	2,5 (2,1-3,0)	0,058
Medicamentos na BEM				
Inibidor de ECA ou BRA	36 (85,7)	20 (95,2)	16 (76,2)	0,184
Betabloqueador	26 (61,9)	9 (42,9)	17 (81,0)	0,025
Antagonistas do receptor de aldosterona	26 (61,9)	12 (57,1)	14 (66,7)	0,751
Medicamentos durante o seguimento				
Inibidor de ECA ou BRA	38 (90,5)	19 (90,5)	19 (90,5)	>0,999
Betabloqueador	38 (90,5)	18 (85,7)	20 (95,2)	0,606
Carvedilol, mg	10,0 (5,0-17,5)	5,0 (5,0-15,0)	12,5 (8,8-16,2)	0,515
Bisoprolol, mg	2,5 (1,9-5,0)	2,5 (2,5-5,0)	2,5 (1,2-5,0)	0,298
Antagonista do receptor da aldosterona	30 (71,4)	14 (66,7)	16 (76,2)	0,73430
Diurético	33 (78,6)	16 (76,2)	17 (81,0)	>0,999
Agente anticoagulante	14 (33,3)	4 (19,0)	10 (47,6)	0,100
Reabilitação cardíaca	21 (50,0)	10,0 (47,6)	11 (52,4)	>0,999

Os valores são mediana (IQ), n (%) ou n. *As diferenças entre pacientes com e sem RRVE foram avaliadas por meio do teste U de Mann-Whitney para variáveis contínuas e do teste exato de Fisher para variáveis categóricas.

BCRE = bloqueio completo do ramo esquerdo; BEM = biópsia endomiocárdica; BNP = peptídeo natriurético tipo B (do inglês *B-type natriuretic peptide*); BRA = bloqueador do receptor da angiotensina II; DAE = desvio do eixo para esquerda; DDFVE = diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; ECA = enzima conversora da angiotensina; EPPVE = espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo; ESVI = espessura do septo intraventricular; FC = frequência cardíaca; FEVE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo; Hb = hemoglobina; HbA_{1c} = hemoglobina A1c; IC = insuficiência cardíaca; IMC = índice de massa corporal; NYHA = classe funcional da *New York Heart Association*; PAD = pressão arterial diastólica; PAS = pressão arterial sistólica; PPCP = pressão propulsora capilar pulmonar; RM = regurgitação mitral; RRVE = remodelamento reverso do ventrículo esquerdo; TGFe = taxa de filtração glomerular estimada; iVDFVE = - índice de volume diastólico final do ventrículo esquerdo; iVSFVE = - índice de volume sistólico final do ventrículo esquerdo.

TABELA 2 Morfometria histopatológica

	Total (n = 42)	Com RRVE (n = 21)	Sem RRVE (n = 21)	Valor de P ^a
Tamanho dos cardiomiócitos, μm	22,4 (21,0-25,4)	22,2 (21,0-23,5)	23,3 (21,0-26,0)	0,22
% de fibrose	22,4 (18,6-34,2)	22,8 (19,3-26,9)	22,0 (16,3-36,5)	0,921
Células inflamatórias por CAP	0,8 (0,7-1,0)	0,8 (0,6-0,9)	1,0 (0,8-0,9)	0,075
Degeneração dos cardiomiócitos, grau				0,566
0	1 (2,4)	1 (4,8)	0 (0,0)	
1	24 (57,1)	13 (61,9)	11 (52,4)	
2	10 (23,8)	5 (23,8)	5 (23,8)	
3	7 (16,7)	2 (9,5)	5 (23,8)	
Atipia nuclear, grau				0,788
0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
1	8 (19,0)	3 (14,3)	5 (23,8)	
2	18 (42,9)	10 (47,6)	8 (38,1)	
3	16 (38,1)	8 (38,1)	8 (38,1)	

Os valores são descritos por mediana (IIQ) ou n (%). ^aAs diferenças entre os grupos com e sem RRVE foram avaliadas por meio do teste U de Mann-Whitney para variáveis contínuas e do teste exato de Fisher para variáveis categóricas.
CAP = campo de alta potência; RRVE = remodelamento reverso do ventrículo esquerdo.

MANEJO E SEGUIMENTO DOS PACIENTES. Os pacientes foram observados desde o momento da admissão para a realização da BEM até óbito por qualquer causa; hospitalização devido a piora da insuficiência cardíaca ou arritmia letal, incluindo taquicardia ventricular sustentada ou fibrilação ventricular; ou evento vascular letal, tal como acidente vascular cerebral (AVC), até outubro de 2020. A mediana do período de observação foi de 80 meses (IIQ: 47,5-121,3 meses). Todos os pacientes receberam medicamentos otimizados, incluindo várias combinações de betabloqueador, inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueador do receptor tipo 1 da angiotensina II (BRA), bloqueador do receptor mineralocorticoide, diurético, glicosídeo digitalico, bloqueador do canal de cálcio do tipo L e anticoagulante. Os dados de seguimento foram obtidos a partir dos prontuários médicos das consultas clínicas ambulatoriais de rotina.

ANÁLISE SANGUÍNEA E AVALIAÇÕES ECOCARDIOGRÁFICA, HEMODINÂMICA E ANGIOGRÁFICA. Análises sanguíneas de rotina foram realizadas para todos os pacientes no momento da admissão. Os níveis séricos do peptídeo natriurético do tipo B (BNP, do inglês *B-type natriuretic peptide*) foram mensurados utilizando um kit de imunoenensaio disponível comercialmente (Fujirebio). No momento da admissão, foi realizada ecocardiografia transtorácica. Realizou-se Doppler colorido modo M bidimensional utilizando o método padrão da *American Society of Echocardiography*²⁷. Cateterismo cardíaco direito e esquerdo, ventriculografia esquerda biplano e angiografia coronariana seletiva foram realizados utilizando técnicas padrão. Foram registradas a frequência e a pressão cardíacas, e estimou-se o índice cardíaco através de métodos de termodiluição. Os índices de

volume diastólico e sistólico final do VE foram calculados a partir de cineangiografias do VE obtidas em projeção oblíqua anterior direita.

PROCEDIMENTO DE BEM E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA. Realizou-se BEM em pacientes com insuficiência cardíaca inexplicável para diagnóstico patológico apenas quando a insuficiência cardíaca estava estável e controlada por medicamentos. As BEMs foram realizadas sob orientação fluoroscópica com monitoramento eletrocardiográfico contínuo. Em cada paciente, 1-4 amostras foram coletadas da parede posterolateral do VE utilizando um biótomo 5,5 F (Biopsy Forceps, Cordis Co). Uma ou duas amostras foram imediatamente fixadas em formalina neutra tamponada a 10%, desidratadas, incluídas em parafina, seccionadas em cortes com 4 μm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson ou Sirius red F3BA (solução 0,1% em ácido pícrico aquoso saturado, Sigma-Aldrich). Foram avaliados os seguintes parâmetros: hipertrofia dos cardiomiócitos, degeneração dos cardiomiócitos, atipia nuclear, fibrose e infiltração de células inflamatórias. Essas avaliações quantitativas e semiquantitativas e análises morfométricas foram realizadas em campos de visão aleatórios por corte através de um microscópio óptico (BX53, Olympus Corp) e de um processador de imagem colorido multiúso (Win ROOF, Mitani Co). O tamanho dos cardiomiócitos foi expresso como o diâmetro transversal dos cardiomiócitos seccionados no nível do núcleo. A área de fibrose foi determinada histologicamente em preparações coradas com Sirius red F3BA e expressa como o percentual da área de fibrose na amostra da biópsia. O grau de degeneração dos cardiomiócitos foi avaliado com base na vacuolização (de 0 a 3), e a atipia nuclear foi avaliada com base em evidências de hipertrofia e morfologia (de 0 a 3). Além disso, calculou-se a média do número de células inflamatórias (total de leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e células plasmáticas) por campo ($\times 400$). Essa avaliação histológica, que foi modificada com relação a estudos anteriores^{12,28}, foi realizada de forma cegada por patologistas cardiovasculares com vasta experiência em análise morfométrica.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA. As amostras de BEM que não foram utilizadas para a microscopia óptica foram imediatamente fixadas por imersão durante 4 horas em glutaraldeído a 2,5% em 0,1 mol/L de tampão fosfato (pH 7,4). As amostras foram então pós-fixadas por 1 hora em tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas em séries de etanol graduado e de óxido de propileno e imersas em Epon. Subsequentemente, as amostras foram seccionadas em cortes ultrafinos (70 nm) utilizando um ultramicrotomo, montadas em grades de níquel liso, coradas

duplamente com acetato de uranilo e citrato de chumbo e examinadas com microscópio eletrônico (HT7700, Hitachi). Foram realizadas análises morfológicas com um microscópio eletrônico conforme descrito anteriormente, com uma modificação²². Em resumo, 10 campos aleatórios de cada bloco foram microfotografados em $\times 3.000$, e as microfotografias foram então impressas em uma magnificação final de $\times 6.000$. Os autofagossomos têm uma membrana dupla que é visível como duas bicamadas membranosas paralelas separadas por uma fenda eletrolúcida. Os autolisossomos têm apenas uma membrana circundante e contêm componentes citoplasmáticos em vários estágios de degradação¹⁵. Calculou-se o número de autofagossomos, autolisossomos e lisossomos por campo impresso ($102 \mu\text{m}^2$) no interior dos cardiomiócitos.

IMUNO-HISTOQUÍMICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

DUPLA. Após desparafinização, cortes seriais com $4 \mu\text{m}$ de espessura foram encharcados em tampão citrato (Target Retrieval Solution, S1699, Dako Co) e aquecidos duas vezes por 10 minutos em um forno de micro-ondas para a recuperação antigênica. Os cortes foram então incubados com anticorpo primário contra cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3, do inglês *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) (LC3, PM036, diluição 1/100, MBL Co) e catepsina D (C-20, diluição 1/100, Santa Cruz Biotechnology). Um sistema *Vectastain Elite ABC* (Vector Laboratories) foi então utilizado para imunocorar os cortes; diaminobenzidina serviu como cromógeno, e os núcleos foram contracolorados com hematoxilina. Para quantificar a presença de vacúolos autofágicos, contou-se o número de pontos imunopositivos para LC3 no interior dos cardiomiócitos em cinco campos de alta potência escolhidos aleatoriamente ($\times 400$). Para quantificar a expressão de catepsina D, a intensidade da imagem foi avaliada utilizando o *software* Win ROOF, um processador de imagem colorido multiúso. Em resumo, as imagens que incluíam a maior parte da área da amostra de biópsia em um campo visual foram obtidas aleatoriamente por microscopia óptica ($\times 200$, BX-53). Os dados brutos de imagem foram então analisados utilizando o Win ROOF para quantificar a imunopositividade para catepsina D no interior dos cardiomiócitos.

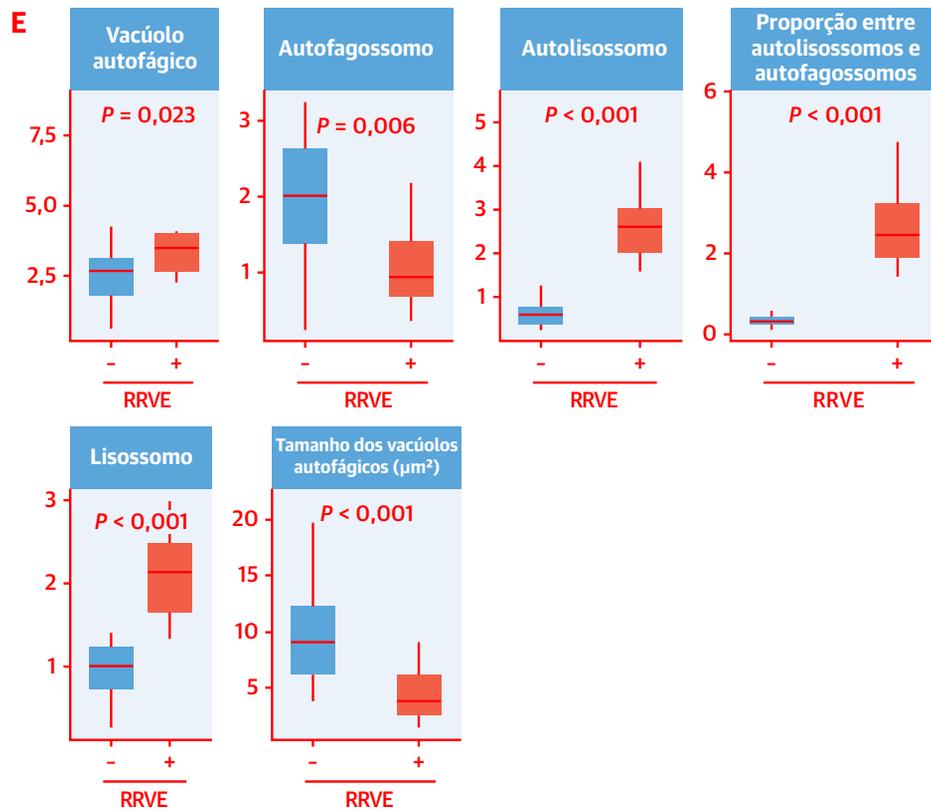
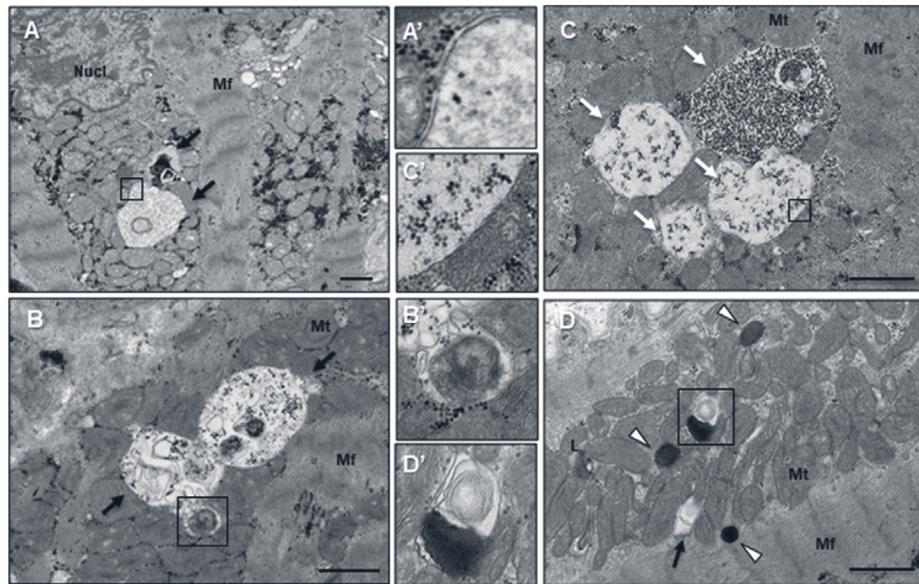
Para avaliar a atividade autofágica no interior dos cardiomiócitos por meio de imunofluorescência, os cortes imunocorados com anti-LC3 seguido por Alexa Fluor 488 (verde; Molecular Probes, ThermoFisher Scientific) também foram marcados com anticorpo anti-catepsina D seguido por Alexa 568 (vermelho, Molecular Probes). Esses cortes foram então contracolorados com Hoechst 3342 (Setareh Biotec) e observados sob um microscópio confocal a laser (C2, Nikon Corp).

ANÁLISE ESTATÍSTICA. As características demográficas e clínicas dos pacientes com RRVE e sem RRVE foram descritas como mediana e IIQ para variáveis contínuas e contagem e proporção para variáveis categóricas. As diferenças nas variáveis clínicas entre os dois grupos foram avaliadas por meio do teste *U* de Mann-Whitney ou do teste exato de Fisher. Foi utilizado um modelo de regressão logística ajustado para idade a fim de estimar a probabilidade de RRVE para cada valor dos pontos positivos para LC3 e de catepsina D. Para avaliar o efeito da positividade do RRVE nos eventos cardiovasculares (insuficiência cardíaca, arritmia letal ou AVC) e na mortalidade, as taxas de incidência e as razões das taxas de incidência dos grupos foram estimadas utilizando modelos de regressão de Poisson não ajustados e ajustados por idade com o logaritmo de pessoas-ano em risco como variável *offset*. O impacto da autofagia nos desfechos clínicos acima também foi confirmado por modelos de regressão de Poisson não ajustados e ajustados por idade. Visto que o número de pacientes sem dados sobre a quantidade de pontos positivos para LC3 e catepsina D era pequeno ($n = 1$), os valores ausentes não foram imputados, sendo utilizados apenas os valores observados. Um valor de *P* bilateral $< 0,05$ foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas GraphPad Prizm 8.0 (GraphPad Software) e R 4.0.3 (The R Project for Statistical Computing).

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.

Foram analisados 42 pacientes com CMD (21 com RRVE e 21 sem RRVE). As características clínicas basais e os achados laboratoriais, ecocardiográficos, hemodinâmicos e angiográficos estão apresentados na [Tabela 1](#). A mediana de idade dos pacientes foi de 56 anos (IIQ: 45-67 anos). Mais da metade dos participantes (61,9%) pertencia à classe funcional I ou II da *New York Heart Association* (NYHA), com insuficiência cardíaca relativamente estável e bem controlada. Não houve pacientes com classe funcional IV da NYHA ou com regurgitação mitral grave coexistente em nenhum dos grupos. Diabetes melito foi ligeiramente mais prevalente entre pacientes sem RRVE do que naqueles com RRVE (48% vs. 19%; $P = 0,100$). A doença estava bem controlada em ambos os grupos, a julgar por seus níveis de hemoglobina glicada (total 6,2%) ([Tabela 1](#)), embora os pacientes com RRVE estivessem com a doença ligeiramente mais bem controlada do que aqueles sem RRVE (5,8% vs. 6,3%, respectivamente; $P = 0,104$). Nenhum paciente estava sendo tratado com terapia de ressincronização cardíaca, cardioversor-desfibrilador implantável ou dispositivo auxiliar ventricular. O coração de todos

FIGURA 1 Micrografias eletrônicas de vacúolos autofágicos em cardiomiócitos

(A, B) Pacientes sem RRVE; (C, D) pacientes com RRVE; (A', B', C', D') imagens aumentadas das áreas delimitadas por um quadrado em A, B, C e D. São mostrados vacúolos autofágicos de tamanhos variados e com vários conteúdos. Autofagossomos (**setas pretas**) são mostrados em A, B e D; eles apresentam membranas duplas, como pode ser observado na imagem ampliada em A'. Uma membrana dupla circunda uma mitocôndria degenerada em B'. Autolisossomos (**setas brancas**) são mostrados em C; eles apresentam uma única membrana, como pode ser observado na imagem ampliada em C'. Um autofagossomo está se fundindo com um lisossomo para formar um autolisossomo em D'. Pontas de seta brancas indicam lisossomos (corpos esféricos eletrodensos). Barras da escala = 1 μm . Mf = miofibrila; Mt = mitocôndria; L = lipofuscina; Núcl = núcleo. (E) Nos gráficos, os eixos y indicam o número de vacúolos autofágicos, autofagossomos, autolisossomos ou lisossomos, a proporção entre autolisossomos e autofagossomos e o tamanho dos vacúolos autofágicos no interior dos cardiomiócitos. RRVE = remodelamento reverso do ventrículo esquerdo.

os pacientes com CMD apresentava dilatação do VE, caracterizada por aumento do VE (diâmetro diastólico final do VE 60,5 mm [IIQ: 56,0-66,0 mm], e índice de volume diastólico final do VE 132,0 mL/m² [IIQ: 123,0-164,0 mL/m²]) acompanhado por função sistólica do VE reduzida (FEVE 32,5% [IIQ: 25,0%-40,5%]) em comparação aos controles com função cardíaca normal (Tabela 1, Tabelas Suplementares 1 e 2). Pacientes sem RRVE apresentaram pressão propulsora capilar pulmonar mais elevada e átrio esquerdo com dimensão aumentada. Não foi observada diferença estatística entre os dois grupos em relação a outros parâmetros clínicos, incluindo pressão arterial sistólica, BNP plasmático, bloqueio completo do ramo esquerdo, duração de QRS ou gravidade da regurgitação mitral funcional, todos com relatos anteriores de correlação com gravidade da insuficiência cardíaca^{3,5,8,9,29}. No momento da BEM, 86% dos pacientes estavam utilizando inibidor de ECA/BRA, e 62% estavam utilizando um betabloqueador. Betabloqueadores foram prescritos para pacientes sem RRVE com maior frequência do que para pacientes com RRVE. Durante os períodos de seguimento, entretanto, não foi observada diferença estatística entre os dois grupos quanto à preferência do inibidor de ECA/BRA ou dos betabloqueadores.

ACHADOS MORFOLÓGICOS POR MICROSCOPIA ÓPTICA. As amostras de BEM de todos os pacientes com CMD apresentaram presença notavelmente maior de hipertrofia dos cardiomiócitos, degeneração, atipia nuclear e fibrose miocárdica quando comparadas às amostras controle (Tabela 2, Tabela Suplementar 3). Entre os pacientes com CMD, não foram observadas diferenças entre os grupos com e sem RRVE em relação a diâmetro dos cardiomiócitos, degeneração dos cardiomiócitos, atipia nuclear, infiltração de células inflamatórias ou percentual de fibrose.

ACHADOS ULTRAESTRUTURAIS EM CARDIOMIÓCITOS DE PACIENTES COM CMD. No interior dos cardiomiócitos de pacientes com CMD, numerosos vacúolos autofágicos de vários tamanhos (1-10 µm) foram facilmente observados através de um microscópio eletrônico de transmissão (Figuras 1A a 1D). Esses vacúolos autofágicos continham grânulos de glicogênio, ribossomos, mitocôndrias danificadas, corpos mielínicos e organelas degeneradas. A autofagia tem início com a formação de vesículas com membranas duplas (autofagossomos), que sequestram os componentes celulares mencionados acima. Autofagossomos maduros se fundem com lisossomos para formar autolisossomos, no interior dos quais os conteúdos sequestrados e a membrana interna são degradados por hidrolases lisossômicas. Portanto, os autofagossomos apresentam membranas externas duplas, ao passo que os autolisossomos são circundados

por uma única membrana. Tanto os autofagossomos quanto os autolisossomos são referidos como vacúolos autofágicos. Devido às suas diferentes estruturas, pode-se distinguir facilmente os autofagossomos dos autolisossomos através da microscopia eletrônica¹⁵. Os cardiomiócitos de pacientes com CMD continham mais vacúolos autofágicos e lisossomos quando comparados aos do grupo controle. Entre os pacientes com CMD, o número de vacúolos autofágicos e lisossomos, assim como a proporção entre autolisossomos e autofagossomos, foi significativamente mais elevado nos cardiomiócitos do grupo com RRVE do que naquele sem RRVE. Além disso, o tamanho dos vacúolos autofágicos foi maior no grupo sem RRVE do que naquele com RRVE (Figura 1E, Tabela Suplementar 3).

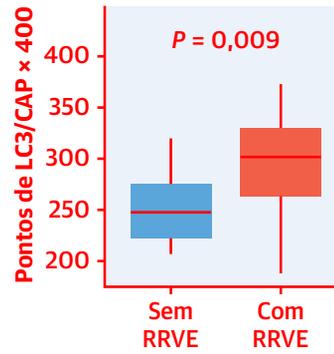
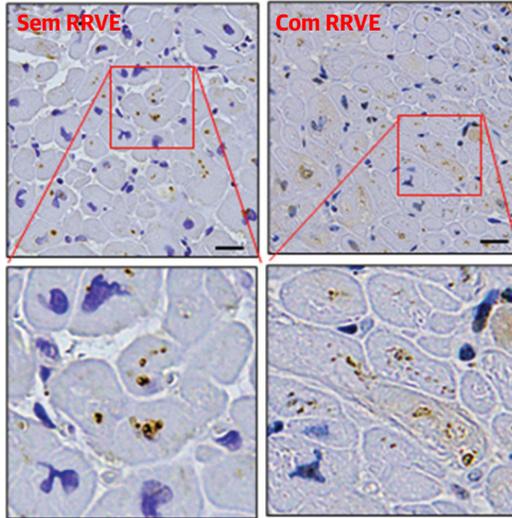
MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DUPLA DAS AMOSTRAS DE BEM. Para avaliar a atividade autofágica sem utilizar microscopia eletrônica, empregamos imuno-histoquímica para detectar LC3, um componente dos vacúolos autofágicos. Também buscamos detectar catepsina D, uma proteína lisossômica, para avaliar a atividade lisossômica. O número de partículas positivas para LC3, indicando vacúolos autofágicos, foi significativamente mais elevado no interior dos cardiomiócitos de corações com CMD comparados aos corações controle (Tabela Suplementar 3). Em amostras de pacientes com CMD, o número de vacúolos autofágicos foi significativamente mais elevado no grupo com RRVE do que naquele sem RRVE ($P = 0,009$) (Figura 2A). Além disso, as partículas positivas para LC3 apresentaram maior tamanho no interior dos cardiomiócitos do grupo sem RRVE do que naquele com RRVE. A expressão de catepsina D nos cardiomiócitos dos corações com CMD não diferiu significativamente do observado nos corações controle ($P = 0,621$) (Tabela Suplementar 3). Entretanto, em amostras de pacientes com CMD, o nível de expressão de catepsina D foi significativamente mais elevado no grupo com RRVE do que naquele sem RRVE ($P = 0,001$) (Figura 2B).

Em seguida, utilizamos marcação por imunofluorescência para fazer a distinção entre autolisossomos e autofagossomos no interior dos cardiomiócitos (Figura 2C). No interior dos cardiomiócitos de corações com RRVE, houve um aumento do número de pontos positivos para LC3 e da expressão de catepsina D. Vale destacar que foram detectados diversos pontos duplamente positivos, indicando autolisossomos. Em contrapartida, dentro dos cardiomiócitos de corações sem RRVE, a proporção de pontos duplamente positivos era reduzida.

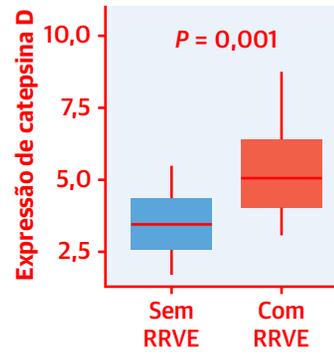
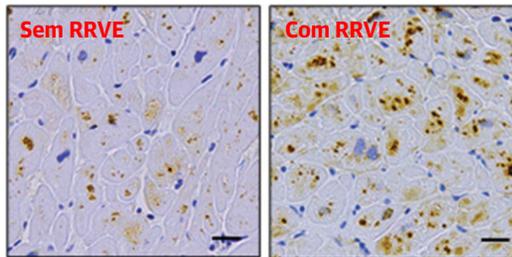
VALOR PREDITIVO DA AUTOFAGIA PARA RRVE. Em seguida, enfocamos o valor preditivo dos achados

FIGURA 2 Imunocoloração relacionada a autofagia em amostras de pacientes com CMD

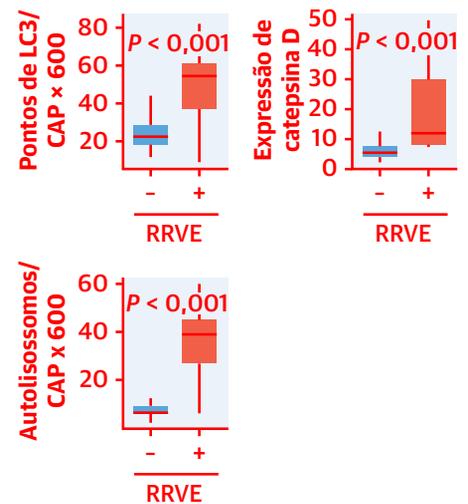
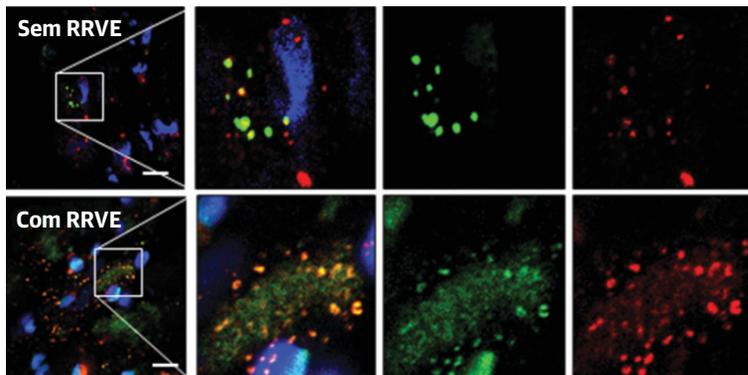
A

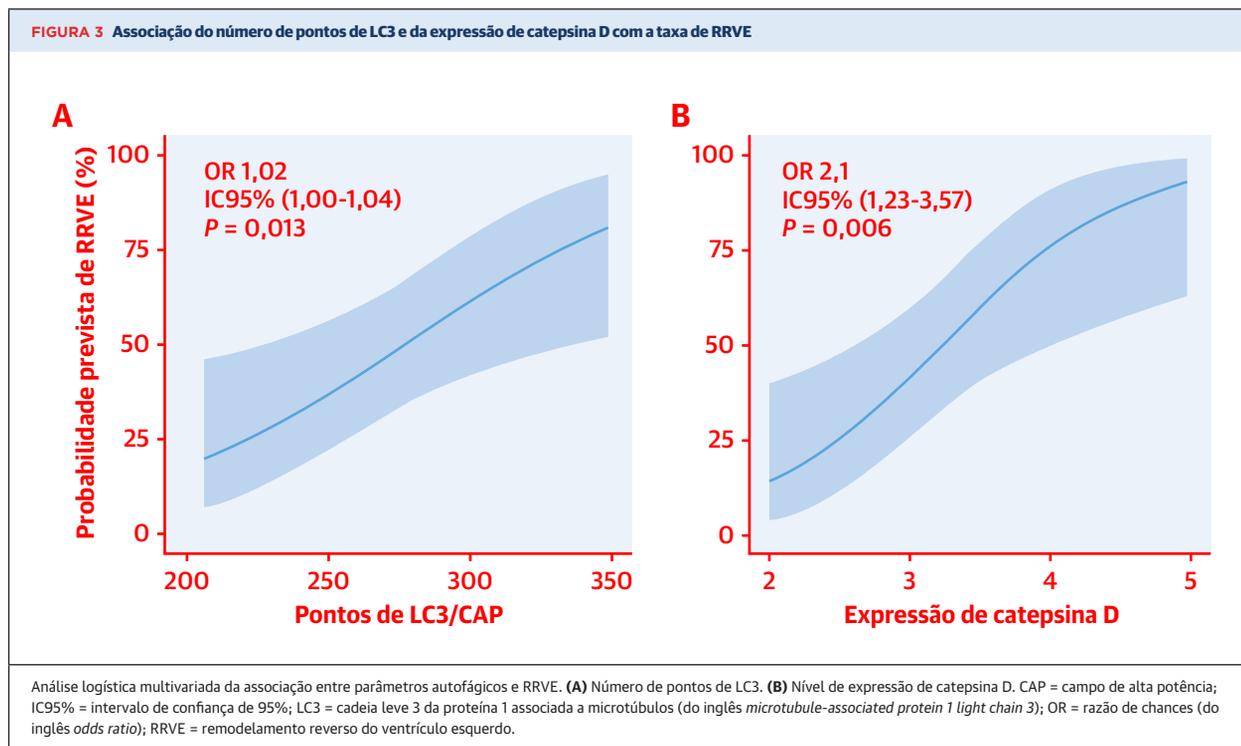


B



C





patológicos para a probabilidade de RRVE na CMD. A morfometria geral por microscopia óptica revelou degeneração miocárdica e fibrose no interior das amostras com CMD, e todos os parâmetros, aparentemente, foram afetados de forma semelhante, independentemente de RRVE. Por outro lado, com base na distribuição dos autolisossomos e lisossomos, a observação por microscópio eletrônico revelou maior autofagia no interior dos cardiomiócitos dos corações com CMD que apresentavam RRVE. Para as análises imuno-histoquímicas, a análise de regressão logística multivariada revelou que o número de pontos positivos para LC3 e o nível de expressão de catepsina D foram fatores preditores para a ocorrência ou não de RRVE em um paciente específico (OR: 1,02; IC95%: 1,00-1,04; [P = 0,013]; OR: 2,1; IC95%: 1,23-3,57 [P = 0,006]; respectivamente) (Figura 3).

DESFECHOS CLÍNICOS. Após a BEM, acompanhamos os pacientes com CMD até outubro de 2020 e analisamos a incidência de eventos cardiovasculares. A duração cumulativa do período de observação foi de 2.082

meses no grupo com RRVE (96,0 meses por pessoa [IIQ: 65,0-137 meses por pessoa]) e 1.474 meses no grupo sem RRVE (54,0 meses por pessoa [IIQ: 35,5-93,0 meses por pessoa]). No grupo com RRVE, um paciente faleceu devido a insuficiência cardíaca, e dois pacientes foram hospitalizados após AVC. No grupo sem RRVE, sete pacientes faleceram devido a insuficiência cardíaca, e 18 pacientes foram hospitalizados com insuficiência cardíaca (n = 14), arritmia potencialmente letal (n = 3) ou AVC (n = 1). A taxa de incidência dos eventos cardiovasculares totais, incluindo mortalidade, foi significativamente mais elevada no grupo sem RRVE do que naquele com RRVE (1,70% vs. 0,144%; razão da taxa de incidência: 11,77; IC95%: 4,13-49,44; P < 0,001) (Tabela 3). O número de pontos de LC3 e a expressão de catepsina D também estiveram associados à incidência de eventos cardiovasculares totais (Tabela Suplementar 4).

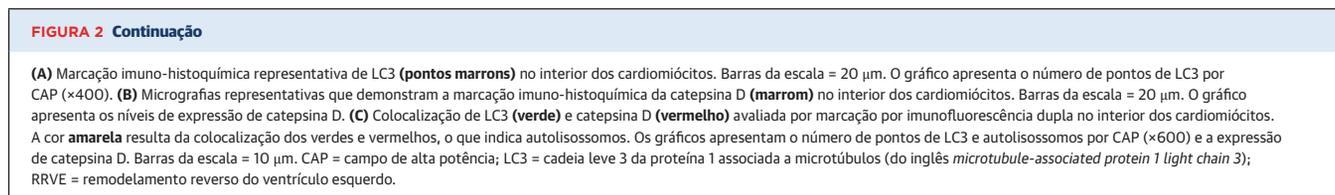


TABELA 3 Desfechos clínicos

	Com RRVE (n = 21)	Sem RRVE (n = 21)	Taxa de incidência no grupo com RRVE, %	Taxa de incidência no grupo sem RRVE, %	Não ajustado			Ajustado para idade		
					RTI	IC95%	Valor de P	RTI	IC95%	Valor de P
Eventos totais	3	25	0,1441	1,6961	11,77	4,13-49,45	<0,001	11,77	4,13-49,44	<0,001
Eventos totais sem óbitos	2	18	0,0961	1,2212	12,71	3,67-79,98	0,001	12,66	3,67-79,68	0,001
Óbito	1	7	0,048	0,4749	9,89	1,76-184,82	0,032	9,88	1,76-184,68	0,32
Insuficiência cardíaca	0	14	0	0,9498	-	-	-	-	-	-
Arritmia letal	0	3	0	0,2035	-	-	-	-	-	-
Acidente vascular cerebral	2	1	0,0961	0,0678	0,71	0,03-7,37	0,776	0,71	0,03-7,37	0,776

As taxas de incidência e as RTIs foram obtidas por um modelo de regressão de Poisson com o logaritmo de pessoas-ano em risco como variável *offset*. A RTI ajustada representa a razão da taxa do grupo sem RRVE em relação à taxa do grupo com RRVE, obtida através de um modelo de regressão de Poisson utilizando a idade como covariável.
IC95% = intervalo de confiança de 95%; RRVE = remodelamento reverso do ventrículo esquerdo; RTI = razão da taxa de incidência.

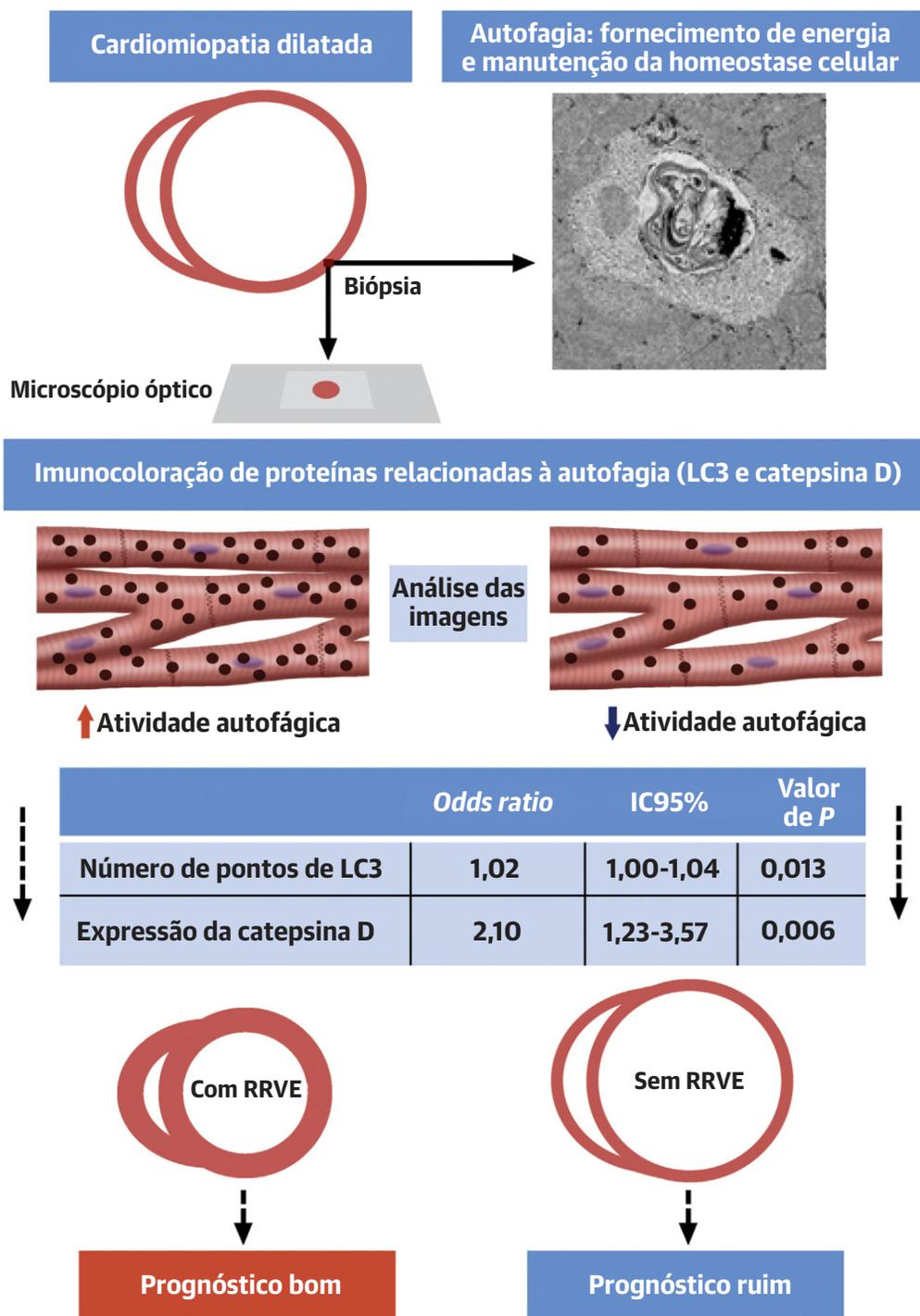
DISCUSSÃO

A autofagia, a atividade de autoalimentação envolvida na manutenção da homeostase celular, é atualmente um alvo terapêutico em várias doenças, inclusive a insuficiência cardíaca¹⁶. O presente estudo revelou que a autofagia responde de forma adaptativa à insuficiência cardíaca e é um fator preditivo para RRVE em pacientes com CMD. Nossos principais achados foram os seguintes: 1) vacúolos autofágicos são abundantes no interior dos cardiomiócitos de pacientes com CMD; 2) a autofagia é mais ativada em pacientes que alcançaram o RRVE durante seu curso clínico posterior; 3) o número dos vacúolos autofágicos e os níveis de expressão de catepsina D são preditores independentes de RRVE; e 4) o risco de eventos cardiovasculares é significativamente maior em pacientes com RRVE (*Ilustração Central*).

AUTOFAGIA NOS CORAÇÕES DE PACIENTES COM CMD. Relatos anteriores descreveram a presença abundante de vacúolos autofágicos nos corações de pacientes com insuficiência cardíaca por CMD^{17,18}, e confirmamos essa observação no presente estudo. A autofagia consiste em dois processos: formação de vesículas com membrana dupla que engolem componentes intracelulares e posterior degradação enzimática dessas vesículas após sua fusão com lisossomos. Portanto, o aumento do número de vesículas autofágicas por si só não informa se esse aumento é uma resposta adaptativa à insuficiência cardíaca ou uma resposta mal adaptativa na qual se inibem uma ou mais etapas digestivas. A aceleração autofágica, que gera um aumento do número de vacúolos autofágicos, pode ser uma resposta para manter a função cardíaca em face do suprimento energético insuficiente na insuficiência cardíaca. Por outro lado, disfunção nas etapas digestivas posteriores na autofagia também pode levar ao acúmulo de vacúolos autofágicos não digestivos. Ou, ainda, a autofagia pode ser um tipo de morte celular caracterizada pela observação em microscópio eletrônico específico do acúmulo intracelular de vacúolos autofágicos³⁰.

No presente estudo, nossa cuidadosa observação por microscopia eletrônica de cada cardiomiócito revelou o acúmulo de autofagossomos, autolisossomos e lisossomos no interior de todos os corações com CMD (*Figura 1*). Vale destacar que observamos que houve maior abundância de vacúolos autofágicos e lisossomos nos cardiomiócitos de pacientes com RRVE quando comparados aos sem RRVE; além disso, a proporção entre autolisossomos e autofagossomos foi maior nos pacientes com RRVE. Isso sugere que as etapas posteriores de digestão autofágica estavam sendo promovidas. Entretanto, é difícil quantificar o número de vacúolos autofágicos e de lisossomos com base apenas em achados de microscopia eletrônica devido à área limitada das imagens. Portanto, também utilizamos imuno-histoquímica para contar o número de vacúolos autofágicos e analisar a expressão de catepsina D (*Figuras 2A e 2B*). Além disso, utilizamos marcação por imunofluorescência dupla para confirmar a presença de autolisossomos (*Figura 2C*). Essa análise revelou que o número de vacúolos autofágicos e a expressão de autolisossomos e de catepsina D apresentaram um aumento nas amostras de BEM obtidas de pacientes com RRVE. Esses achados foram consistentes com os achados com microscopia eletrônica. Além disso, a análise logística multivariada demonstrou que tanto o número de vacúolos autofágicos quanto o nível da expressão de catepsina D são preditores independentes de RRVE. Ademais, os eventos cardiovasculares ocorreram com uma frequência muito menor em pacientes com CMD que apresentavam RRVE do que naqueles que não apresentavam RRVE (*Tabela 3*). Corações com insuficiência devido a infarto do miocárdio e/ou CMD são como motores famintos de energia que não funcionam adequadamente³¹. Em corações com CMD, a autofagia é uma resposta adaptativa para a insuficiência de energia. Portanto, concluímos que corações com atividade autofágica elevada fornecem energia de forma mais eficaz e, por isso, são capazes de alcançar o RRVE e substancialmente evitar eventos cardiovasculares.

ILUSTRAÇÃO CENTRAL Probabilidade de remodelamento reverso do ventrículo esquerdo de acordo com achados autofágicos



Kanamori, H. et al. J Am Coll Cardiol. 2022;79(8):789-801.

Achados autofágicos (número de vacúolos autofágicos e expressão de catepsina D) das BEMs esquerdas de 42 pacientes com cardiomiopatia dilatada predizem remodelamento reverso do ventrículo esquerdo na cardiomiopatia dilatada. O aumento da autofagia promoveria bom prognóstico. IC95% = intervalo de confiança de 95%; LC3 = cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (do inglês *microtubule-associated protein 1 light chain 3*); RRVE = remodelamento reverso do ventrículo esquerdo.

PERSPECTIVA CLÍNICA. Estudos recentes revelaram que quase 40% dos pacientes com CMD apresentam RRVE significativo quando tratados de forma adequada^{3,5}. No presente estudo, entretanto, o tratamento durante o seguimento após BEM foi semelhante entre os pacientes com e sem RRVE. Portanto, supomos que deve haver causas preditoras de RRVE. Com base em nossos estudos ultraestruturais anteriores¹⁹⁻²³, nosso foco se concentrou na autofagia. Observamos que a imunocoloração relacionada à autofagia das amostras de BEM foi preditiva da probabilidade de RRVE. Com os pacientes que apresentavam pouca probabilidade de alcançar o RRVE, ainda podemos tomar decisões benéficas com segurança. Isto é, esses pacientes podem ser preferencialmente encaminhados para terapia de ressincronização cardíaca, cardioversor-desfibrilador implantável ou dispositivo auxiliar ventricular e/ou transplante cardíaco em um estágio anterior. Se esses tratamentos ideais são iniciados de forma precoce, os pacientes com CMD têm maior probabilidade de apresentar melhores desfechos.

O presente estudo demonstra que a super-regulação da autofagia está associada a melhor prognóstico, o que sugere que potencializar a autofagia pode ser terapêutico por si só. De fato, fomos capazes de induzir RRVE em antigos modelos de infarto do miocárdio e de CMD genética em ratos através de intervenções farmacológicas^{19,23}. Esses resultados sugerem que potencializar a autofagia utilizando resveratrol¹⁹, restrição calórica²¹ ou metformina²³ pode ser uma estratégia promissora para alcançar RRVE em pacientes com insuficiência cardíaca.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO. Não avaliamos as alterações nos achados autofágicos ao longo do tempo em pacientes individuais. A super-regulação autofágica em corações com insuficiência por CMD poderia ser afetada pelo grau de sobrecarga miocárdica. Consequentemente, a super-regulação autofágica é reversível por dispositivo auxiliar para o VE, o que pode reduzir os marcadores de autofagia através da descarga mecânica do coração com insuficiência³². Para verificar a utilidade clínica desse método, é necessária uma coorte com mais pacientes e períodos de seguimento mais longos. A imunocoloração é um método relativo e com o qual é difícil avaliar a patogênese de forma direta. De fato, no presente estudo, o número de LC3 e a expressão de catepsina D são consideravelmente diferentes, embora os dois marcadores sejam significativos. Novas investigações devem ser realizadas para aplicar esse método em um cenário clínico. Além

disso, não houve indivíduos controle completamente saudáveis. Como resultado, não pudemos comparar os níveis de atividade autofágica entre pacientes com CMD e indivíduos saudáveis.

CONCLUSÕES

O presente estudo revelou a significância da autofagia no coração de pacientes com insuficiência cardíaca por CMD. O número de vacúolos autofágicos e o nível da expressão de catepsina D poderiam servir como preditores independentes de RRVE em pacientes com CMD. Esses achados sugerem que a autofagia deve ser um alvo terapêutico no tratamento da insuficiência cardíaca em pacientes com CMD.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Yasuo Katagiri e Akiko Tsujimoto pela assistência técnica e Kazuho Niwa e Akiho Kimura pela assistência de secretaria na *Gifu University*, e Yasuaki Hotta pela assistência técnica na *Asahi University*.

APOIO FINANCEIRO E DECLARAÇÕES DOS AUTORES

Este estudo foi parcialmente financiado pelo JSPS KAKENHI, subsídio nº JP21K08077 da *Japan Society for the Promotion of Science*, e por um subsídio de pesquisa da Faculdade de Medicina da *Gifu University*. Os autores informaram não ter relações relevantes para os conteúdos deste artigo a serem declaradas.

CORRESPONDÊNCIA: Dr Hiromitsu Kanamori, Department of Cardiology, Gifu University Graduate School of Medicine, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japão. E-mail: hk1973@gifu-u.ac.jp. Twitter: [@deltagifu](https://twitter.com/deltagifu).

PERSPECTIVAS

COMPETÊNCIA EM CONHECIMENTO MÉDICO: A autofagia responde de forma adaptativa à insuficiência cardíaca e está associada ao prognóstico em pacientes com CMD. O aumento do número de vacúolos autofágicos e da expressão de catepsina D nas amostras de BEM prediz RRVE e desfechos favoráveis.

PANORAMA TRANSLACIONAL: São necessários estudos clínicos para avaliar a segurança e a eficácia de potencializar a autofagia especificamente nos cardiomiócitos em pacientes com CMD.

REFERÊNCIAS

1. Bozkurt B, Colvin M, Cook J, et al. Current diagnostic and treatment strategies for specific dilated cardiomyopathies: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;134:e579-e646.
2. Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 2010;375:752-762.
3. Merlo M, Cannatà A, Gobbo M, Stolfo D, Elliott PM, Sinagra G. Evolving concepts in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2018;20:228-239.
4. Merlo M, Pivetta A, Pinamonti B, et al. Long-term prognostic impact of therapeutic strategies in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: changing mortality over the last 30 years. *Eur J Heart Fail*. 2014;16:317-324.
5. Merlo M, Pyxaras SA, Pinamonti B, Barbati G, di Lenarda A, Sinagra G. Prevalence and prognostic significance of left ventricular reverse remodeling in dilated cardiomyopathy receiving tailored medical treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:1468-1476.
6. Zecchin M, Merlo M, Pivetta A, et al. How can optimization of medical treatment avoid unnecessary implantable cardioverter-defibrillator implantations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy presenting with "SCD-HeFT criteria"? *Am J Cardiol*. 2012;109:729-735.
7. Verdonschot JAJ, Hazebroek MR, Wang P, et al. Clinical phenotype and genotype associations with improvement in left ventricular function in dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2018;11:e005220.
8. Kawai K, Takaoka H, Hata K, Yokota Y, Yokoyama M. Prevalence, predictors, and prognosis of reversal of maladaptive remodeling with intensive medical therapy in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1999;84:671-676.
9. Kubanek M, Sramko M, Maluskova J, et al. Novel predictors of left ventricular reverse remodeling in individuals with recent-onset dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:54-63.
10. Grimm W, Rudolph S, Christ M, Pankuweit S, Maisch B. Prognostic significance of morphometric endomyocardial biopsy analysis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*. 2003;146:372-376.
11. Broch K, Murbræch K, Andreassen AK, Hopp E, Aakhus S, Gullestad L. Contemporary outcome in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2015;116:952-959.
12. Ishii S, Inomata T, Fujita T, et al. Clinical significance of endomyocardial biopsy in conjunction with cardiac magnetic resonance imaging to predict left ventricular reverse remodeling in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Heart Vessels*. 2016;31:1960-1968.
13. Ko T, Fujita K, Nomura S, et al. Quantification of DNA damage in heart tissue as a novel prediction tool for therapeutic prognosis of patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol Basic Trans Science*. 2019;4:670-680.
14. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:e147-e239.
15. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abdeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012;8:445-544.
16. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 2013;368:1845-1846.
17. Saito T, Asai K, Sato S, et al. Autophagic vacuoles in cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy with initially decompensated heart failure predict improved prognosis. *Autophagy*. 2016;12:579-587.
18. Kostin S, Pool L, Elsässer A, et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res*. 2003;92:715-724.
19. Kanamori H, Takemura G, Goto K, et al. Resveratrol reverses remodeling in hearts with large, old myocardial infarctions through enhanced autophagy-activating AMP kinase pathway. *Am J Pathol*. 2013;182:701-713.
20. Kawaguchi T, Takemura G, Kanamori H, et al. Prior starvation mitigates acute doxorubicin cardiotoxicity through restoration of autophagy in affected cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2012;96:456-465.
21. Watanabe T, Takemura G, Kanamori H, et al. Restriction of food intake prevents postinfarction heart failure by enhancing autophagy in the surviving cardiomyocytes. *Am J Pathol*. 2014;184:1384-1394.
22. Kanamori H, Takemura G, Goto K, et al. Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes. *Autophagy*. 2015;11:1146-1160.
23. Kanamori H, Naruse G, Yoshida A, et al. Metformin enhances autophagy and provides cardioprotection in d-sarcoglycan deficiency-induced dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2019;12:e005418.
24. Report of the WHO/ISFC Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Br Heart J*. 1980;44:672-673.
25. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841-842.
26. Kimura Y, Okumura T, Morimoto R, et al. A clinical score for predicting left ventricular reverse remodeling in patients with dilated cardiomyopathy. *ESC Heart Fail*. 2021;8:1359-1368.
27. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr*. 1989;2:358-367.
28. Vasiljević JD, Otasević P, Popović ZB, et al. Semiquantitative histomorphometric analysis of myocardium following partial left ventriculectomy: 1-year follow-up. *Eur J Heart Fail*. 2005;7:763-767.
29. Gupta A, Goyal P, Bahl A. Frequency of recovery and relapse in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy on guideline-directed medical therapy. *Am J Cardiol*. 2014;114:883-889.
30. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*. 1990;181:195-213.
31. Stefan N. The failing heart—an engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007;356:1140-1151.
32. Kassiotis C, Ballal K, Wellnitz K, et al. Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation*. 2009;120:S191-S197.

PALAVRAS-CHAVE autofagia, cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca, LC3, remodelamento reverso

APÊNDICE Para acesso a tabelas suplementares, consulte a versão on-line deste artigo.