



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

JOÃO PAULO ANDRADE FONSECA

**INTERLEUCINA-10 E ENDOTELINA-1 COMO BIOMARCADORES DE  
DOENÇA VALVAR REUMÁTICA**

ARACAJU  
2018

JOÃO PAULO ANDRADE FONSECA

INTERLEUCINA-10 E ENDOTELINA-1 COMO BIOMARCADORES DE  
DOENÇA VALVAR REUMÁTICA

Monografia apresentada à Universidade Federal de Sergipe  
como requisito parcial à conclusão do curso de Medicina do  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Tania Maria de Andrade Rodrigues

Coorientador: Dr. Sydney Correia Leão

ARACAJU  
2018

JOÃO PAULO ANDRADE FONSECA

INTERLEUCINA-10 E ENDOTELINA-1 COMO BIOMARCADORES DE  
DOENÇA VALVAR REUMÁTICA

Monografia apresentada à Universidade Federal de  
Sergipe como requisito parcial à conclusão do curso de  
Medicina do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

---

Autor: João Paulo Andrade Fonseca

---

Orientadora: Profa. Dra. Tania Maria de Andrade Rodrigues

---

Coorientador: Dr. Sydney Correia Leão

ARACAJU  
2018

JOÃO PAULO ANDRADE FONSECA

INTERLEUCINA-10 E ENDOTELINA-1 COMO BIOMARCADORES DE  
DOENÇA VALVAR REUMÁTICA

Monografia apresentada à Universidade Federal de Sergipe  
como requisito parcial à conclusão do curso de Medicina do  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Tania Maria de Andrade Rodrigues

Coorientador: Dr. Sydney Correia Leão

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Universidade Federal de Sergipe

---

Universidade Federal de Sergipe

---

Universidade Federal de Sergipe

ARACAJU  
2018

## AGRADECIMENTOS

É com imenso sentimento de gratidão que dedico essas palavras às pessoas que tiveram contribuição fundamental neste trabalho.

Agradeço aos meus pais, Maria de Lourdes e José Américo, por todo o apoio, educação e amor incondicional. Também aos demais familiares, que compuseram uma grande torcida.

A todos os meus amigos, por todo o suporte que serviu de base à perseverança.

A minha orientadora, Dra. Tania Rodrigues, querida amiga, responsável por grande parte da minha produção acadêmica. Obrigado por acreditar que eu poderia superar os obstáculos. A senhora fez a diferença.

A Sydney Correia Leão, pela parceria, atenção e disponibilidade. Não poupou esforços para a realização deste trabalho.

A todos que compuseram o Grupo de Anatomia Molecular, pelo companheirismo e por terem se dedicado muito ao longo de todos esses anos, visando o crescimento e ganho coletivo.

Por fim, agradeço principalmente a Deus, que me deu forças para superar todas as adversidades. “Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum, porque tu estás comigo: a tua vara e o teu cajado me consolam.” (Salmo 23:4)

Minha gratidão a todos!

## LISTAS DE TABELAS E FIGURAS

### I - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

**Tabela 1.** Limites por tipo de artigo.

### II - ARTIGO ORIGINAL

**Tabela 1.**Quantificação do RNA total, cDNA e espectrofotometria a partir de valvas cardíacas.

**Figura 1.** Gráfico mostrando a expressão relativa de endotelina (ET-1) nas amostras de valvas cardíacas 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 10.

**Figura 2.** Gráfico mostrando a expressão média da citocina IL-10 (Interleucina-10).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: Microlitros

μg: Microgramas

A260: Absorvância em 260 nanômetros

A260/A280: Proporção entre as absorvâncias em 260 e 280 nanômetros

A280: Absorvância em 280 nanômetros

ACC: American College of Cardiology

AE: Átrio esquerdo

AHA: American Heart Association

ASLO: Antiestreptolisina O

AU: Unidades de absorvância

AV: Área valvar

AVCI: Acidente Vascular Cerebral Isquêmico

B2: Segunda bulha cardíaca

BA: Bahia

bFGF: Fator de crescimento de fibroblastos básico

CCBS: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

CD4: Linfócito com grupamento de diferenciação 4

CD8: Linfócito com grupamento de diferenciação 8

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CEP: Código de Endereçamento Postal

CI: Consentimento informado

cm: Centímetros

cm<sup>2</sup>: Centímetros quadrados

CRC: Cardiopatia reumática crônica

Ct: Cycle Threshold (Limiar de ciclo)

DALY: Esperança de vida corrigida pela incapacidade

DC: Débito cardíaco

DF: Distrito Federal

DMO: Departamento de Morfologia

ECE-1: Enzima conversora da endotelina 1

ECE-2: Enzima conversora da endotelina 2

ECE-3: Enzima conversora da endotelina 3  
ECG: Eletrocardiograma  
EM: Estenose Mitral  
ET: Endotelina  
ET-1: Endotelina 1  
ET-2: Endotelina 2  
ET-3: Endotelina 3  
ETr-A: Receptor de endotelina A  
ETr-B: Receptor de endotelina B  
EUA: Estados Unidos da América  
FA: Fibrilação Atrial  
FR: Febre reumática  
FRA: França  
g: Gramas  
GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase humano  
HCl: Ácido clorídrico  
HE: Hematoxilina-eosina  
HLA: Antígeno Leucocitário Humano  
IFN-gama: Interferon gama  
IL-4: Interleucina 4  
IL-10: Interleucina 10  
ING: Inglaterra  
LAM: Laboratório de Anatomia Molecular  
mg: Miligramas  
MG: Minas Gerais  
ml: Mililitros  
mmHg: Milímetros de mercúrio  
mRNA: Acido ribonucleico mensageiro  
ng: Nanogramas  
nm: Nanômetros  
NO: Oxido nítrico  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
p: Nível de significância estatística  
P2: Componente pulmonar da segunda bulha cardíaca



PCR: Proteína C reativa

PCR\*: Reação em Cadeia de Polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

PSAP: Pressão sistólica em artéria pulmonar

R: Teste de correlação parcial de Pearson

RBCCV: Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular

RNA: Ácido ribonucleico

RT: Transcriptase reversa

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa

R\$: Reais

®: Marca Registrada

SBC: Sociedade Brasileira de Cardiologia

SE: Sergipe

s/n: Sem número

SUS: Sistema Único de Saúde

TGF-beta: Fator de crescimento tecidual beta

™: Trade Market (Marca Registrada)

TNF-alfa: Fator de necrose tecidual alfa

U: Unidades de medida

UFS: Universidade Federal de Sergipe

V1: Primeira derivação precordial do Eletrocardiograma

VD: Ventrículo direito

VE: Ventrículo esquerdo

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular

VHS: Velocidade de Hemossedimentação

## SUMÁRIO

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                             | 10 |
| 1. FEBRE REUMÁTICA .....                                    | 10 |
| 1.1. Introdução.....                                        | 10 |
| 1.2. Diagnóstico e tratamento .....                         | 12 |
| 1.3. Patogênese .....                                       | 13 |
| 1.3.2. Suscetibilidade genética .....                       | 13 |
| 1.3.2. Resposta Imune .....                                 | 15 |
| 1.3.2.1. Citocinas .....                                    | 16 |
| 1.3.2.1.1. Interleucina 10 (IL-10) .....                    | 17 |
| 2. ESTENOSE VALVAR MITRAL .....                             | 18 |
| 2.1. A valva mitral.....                                    | 18 |
| 2.2. A estenose da valva mitral.....                        | 20 |
| 3. ENDOTELINAS.....                                         | 24 |
| 4. REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL ..... | 27 |
| 5. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) .....          | 29 |
| II – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                       | 31 |
| III – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO .....                          | 38 |
| IV – ARTIGO ORIGINAL .....                                  | 47 |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                         | 50 |
| 2. MÉTODOS .....                                            | 51 |
| 3. RESULTADOS .....                                         | 54 |
| 4. DISCUSSÃO .....                                          | 55 |
| 5. CONCLUSÃO .....                                          | 56 |
| 6. REFERÊNCIAS.....                                         | 57 |

# **I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **1. Febre Reumática**

### **1.1. Introdução**

Febre Reumática (FR) é uma doença inflamatória, recorrente, de origem autoimune, que tem como agente etiológico, o estreptococo beta-hemolítico do grupo A de Lancefield (*Streptococcus pyogenes*). Esta doença representa uma complicação ou sequela não supurativa de uma faringoamigdalite bacteriana por cepas específicas de estreptococo (ditas reumatogênicas) em indivíduos que tem predisposição genética. Os sorotipos do estreptococo mais associados com a febre reumática aguda são 3, 5, 6, 14, 18, 19 e o 24. Porém há alguns autores que acreditam que qualquer sorotipo estreptocócico poderia desencadear a fase aguda da febre reumática (BISNO, 2008; MOURA, 2008; MOURA *et al*, 2010; LONGO *et al*, 2011; SECKELER, 2011).

A FR é uma doença que afeta predominantemente crianças e jovens, com idades variando entre os cinco aos 18 anos, determinando manifestações variadas em órgãos distintos do corpo, tais como a pele e tecido subcutâneo, cérebro, grandes articulações e o coração. Por acometer sistemas orgânicos distintos, a FR tem servido há mais de um século como objeto de estudo de variados profissionais da área médica, tais como cardiologistas, cirurgiões cardíacos, reumatologistas, epidemiologistas, infectologistas, pediatras e patologistas. Sem sombra de dúvidas é uma doença que exige abordagem multidisciplinar (PROKOPOWITSCH *et al*, 2005; KISS, 2008; LEAO, 2012).

A FR possui distribuição universal, mas com marcada diferença nas taxas de incidência e prevalência entre os diversos países. Em países desenvolvidos, observa-se acentuada queda da prevalência da doença (0,5 caso para 1.000 crianças em idade escolar), certamente graças às melhorias das condições socioeconômicas e culturais e à maior abrangência da atenção básica à saúde – com diagnóstico precoce e uso de antibioticoterapia para infecções respiratórias altas. Porém em nações pobres ou em desenvolvimento, a FR corresponde a uma das principais causas de mortes prematuras (233.000 por ano), impondo um peso substancial nos sistemas de saúde. Estimativas da OMS para o ano de 2005 indicavam que existiria no mundo um total de 15,6 milhões de indivíduos portadores de cardite reumática crônica. A cada ano, surgem 470.000 novos casos, e em torno de 332.000

peças vão a óbito devido a complicações da febre reumática, tais como a insuficiência cardíaca congestiva. Segundo o índice DALY (Disability-adjusted life year), indivíduos portadores de febre reumática têm uma expectativa média de vida 26 anos menor em relação ao restante da população (WHO, 2004; CARAPETIS *et al*, 2005; PROKOPOWITSCH *et al*, 2005; CARAPETIS, 2007; MARIJON *et al*, 2007).

Estima-se que houve cerca de 319.400 mortes por doença cardíaca reumática, mais grave complicação da FR, em todo o mundo no ano de 2015. Entretanto, a mortalidade mundial padronizada por idade devido a esta afecção diminuiu em 47,8% de 1990 a 2015. Contudo, grandes diferenças foram observadas em todas as regiões do mundo. Em 2015, a maior mortalidade padronizada por idade e a maior prevalência de doença cardíaca reumática foram observadas na Oceania, no sul da Ásia e na África central subsaariana. Calcula-se que naquele ano houve cerca de 33,4 milhões de casos de doença cardíaca reumática. Na análise de morbidade, entre 1990 e 2015, o cálculo do índice DALYs – disability-adjusted life years (anos potenciais de vida perdidos ajustados para incapacidade) – demonstrou o total de 10,5 milhões de anos de vida perdidos em decorrência dessa complicação. A carga relacionada à saúde da doença cardíaca reumática diminuiu em todo o mundo, mas altas taxas de doença persistem em algumas das mais pobres regiões do mundo (WATKINS, 2017).

No Brasil, no ano de 2002, foram reportados 5.000 novos casos de febre reumática. A prevalência de febre reumática em nosso país foi estimada em torno de 1-7 casos/1000 crianças em idade escolar, o que equivale a 3% das crianças e adolescentes afetados por faringites. A frequência da FR aguda no Brasil difere de acordo com a região geográfica, porém em todas as regiões observa-se uma redução progressiva do total de internações por esta doença. Mesmo assim, devido a sua elevada prevalência, a cardite reumática crônica (uma seqüela da FR aguda) corresponde a 40% das cirurgias cardíacas em nosso país. A taxa de mortalidade por doença cardíaca reumática crônica em pacientes internados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) foi de 6,8% em 2005 e de 7,5% em 2007. (KISS, 2008; BARBOSA *et al*, 2009; COSTA; DOMICIANO; PEREIRA, 2009).

A FR implica grandes gastos com a saúde por se tratar de doença crônica que necessita de acompanhamento clínico e, muitas vezes, abordagem das lesões valvares através do cateterismo cardíaco para realização de valvoplastia com cateter balão ou tratamento cirúrgico para reparo ou substituição valvar. Os gastos gerados pela assistência aos pacientes com febre reumática e cardiopatia reumática crônica (CRC) no Brasil são significativos: em 2007, foram gastos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) cerca de R\$ 157.578.000,00 em internações decorrentes de FR ou CRC. Destes, cerca de 55 milhões foram gastos em

tratamentos clínicos e um pouco mais de 102 milhões foram gastos em procedimentos cirúrgicos ou intervencionistas. Em Sergipe, a cardite reumática é a principal causa das indicações de cirurgias cardíacas, sendo que em 2006, as internações cirúrgicas trouxeram um custo aproximado de R\$ 32.000.000,00 para o SUS destinado ao nosso estado (BRASIL, 2006; MEIRA *et al*, 2006; BARBOSA *et al*, 2009). Desde então, não foram encontradas novas pesquisas epidemiológicas no Brasil e em Sergipe, a respeito da FR e da CRC.

## **1.2. Diagnóstico e tratamento**

O diagnóstico da FR é baseado no reconhecimento das combinações de alguns achados clínicos. Os critérios de T. Duckett Jones (1944), revisados pelo American Heart Association (AHA) em 1965 e 1992, são atualmente utilizados como guia para o diagnóstico da FR. Eles baseiam-se na divisão dos achados clínicos e laboratoriais da doença em sinais maiores ou menores, segundo as respectivas importâncias diagnósticas, sem significado prognóstico por si só. Os cinco critérios maiores são artrite migratória (com envolvimento predominante de grandes articulações), cardite e valvulite (pancardite), nódulos subcutâneos, eritema marginado e envolvimento de sistema nervoso central (coreia de Sydenham). Já os critérios menores são febre, artralgia, aumento do intervalo PR no eletrocardiograma e elevação nos valores laboratoriais do VHS (velocidade de hemossedimentação), do PCR (proteína C reativa) e de outros reagentes de fase aguda (DAJANI *et al*, 1992; FERRIERI, 2002; MENEGHELO, 2007; SPINA, 2008).

A presença de dois critérios maiores (ou de um critério maior e dois menores) indica alta probabilidade diagnóstica, se acompanhados por evidência de infecção estreptocócica prévia (através de cultura de estreptococo em orofaringe ou exames sorológicos como o ASLO). Curiosamente não se considera histórico de faringoamigdalite como critério diagnóstico, pois a maioria delas é de origem viral. Na verdade, somente 1-5% das faringoamigdalites por estreptococo do grupo A desencadeia a febre reumática. Além disso, em torno de 30 a 40% dos pacientes com FR aguda não tiveram evidência de infecção faríngea prévia. Não se considera também como critério diagnóstico as alterações ecocardiográficas características de febre reumática (tais como calcificação e fusão de comissuras) sem outros achados clínicos sugestivos dessa doença (DAJANI *et al*, 1992; FERRIERI, 2002; MENEGHELO, 2007; BISNO, 2008; MOURA, 2008).

A cardite reumática é a mais grave e a mais importante de todas as manifestações da febre reumática aguda. Cerca de 30-45% dos indivíduos com FR aguda apresentam lesões

com envolvimento de pericárdio, miocárdio e endocárdio, além das valvas cardíacas. Segundo Meira *et al* (2006) cerca de 40-70% das alterações cardíacas já acontecem durante o primeiro surto. A importância do acometimento cardíaco se deve a possibilidade de evolução para a doença valvar reumática crônica ou para o óbito na fase aguda por insuficiência cardíaca grave. A cardite pode ser classificada como leve, moderada ou grave. Na cardite leve, observa-se taquicardia sinusal (desproporcional à febre), alargamento do PR e sopros discretos. Na cardite moderada, aparecem sinais de pericardite aguda, com sopros exuberantes e aumento da área cardíaca na radiografia de tórax. Finalmente na cardite grave, há sinais e sintomas de insuficiência cardíaca (tais como astenia, palidez, taquipneia, hepatomegalia e estase jugular). (PORTO, 2005; MEIRA *et al*, 2006; MARIJON, 2007; SBC, 2009).

O tratamento da febre reumática pode ser dividido em tratamento sintomático, profilaxia primária e profilaxia secundária. O tratamento sintomático é feito através da utilização de salicilatos (excelentes para o tratamento da artrite, podendo ser utilizados no tratamento da cardite) e de corticoterapia (eficaz no tratamento da cardite e da coreia). A profilaxia primária tem como intenção evitar o primeiro surto de febre reumática aguda. Neste tipo de profilaxia, é utilizada dose única de 1.200.000 U de penicilina benzatina. Já a profilaxia secundária tem como intenção evitar recidivas de episódios agudos de febre reumática. Nela, também é utilizada a mesma dose de penicilina benzatina, porém em intervalos regulares de 21 dias. Para pacientes alérgicos à penicilina, recomenda-se a utilização de estearato de eritromicina ou amoxicilina. A duração da profilaxia secundária varia a depender do acometimento da doença. Para pacientes sem cardite, ela deverá durar por cinco anos, ou até 21 anos de idade; para pacientes com cardite, porém sem envolvimento valvular, o tratamento deverá durar até 10 anos e para pacientes com cardite e envolvimento valvular, o tratamento deverá durar por pelo menos 10 anos desde o último episódio, ou até os 40 anos de idade. Novas formas de profilaxia, tais como vacina contra o estreptococo beta-hemolítico do grupo A vem sendo testadas, porém sem resultados eficazes (BISNO, 2008; KISS, 2008; LONGO *et al*, 2011).

### **1.3. Patogênese**

#### **1.3.1. Suscetibilidade genética**

A patogênese da FR/ CRC envolve uma rede complexa de interações genéticas, ambientais e imunológicas; os fatores genéticos predis põem ao desenvolvimento de reações

autoimunes (GUILHERME, 2010). A FR/ CRC é o exemplo mais convincente de mimetismo molecular entre as doenças autoimunes; a reação cruzada entre antígenos estreptocócicos e a proteína do tecido cardíaco humano após infecção da faringe por estreptococos em indivíduos suscetíveis (GULHERME *et al*, 2007). A proteína M é a estrutura antigênica mais importante da bactéria, auxilia na evasão da fagocitose através do bloqueio da produção da proteína C3 do Sistema Complemento, impedindo a opsonização da bactéria. Estruturalmente, a proteína M se apresenta em módulos de sete aminoácidos, dispostos em  $\alpha$ -hélice, que se projetam na superfície da bactéria em forma fibrilar dupla. Contêm aproximadamente 450 resíduos de aminoácidos, dispostos em quatro regiões (A, B, C e D), que apresentam repetições de alguns resíduos de aminoácidos. A porção N-terminal é a mais polimórfica e diferenças no bloco A permitem classificar as diferentes cepas do estreptococo. As regiões C e D são conservadas, localizadas na região C-terminal. A proteína M apresenta similaridades com proteínas fibrilares do tecido humano como miosina, tropomiosina, proteínas valvulares e outras proteínas (GULHERME *et al* 2010).

Vários marcadores genéticos da FR/CRC foram estudados até agora e apenas associações com o Antígeno Leucocitário Humano (HLA) classe II foram consistentemente encontrados. Genes HLA classe II estão localizados no cromossomo 6, que são frequentemente associados com a autoimunidade. Alelos de HLA associados com a FR/ CRC em diferentes países foram analisados, as diferenças nas populações estudadas provavelmente são devido à capacidade do HLA de Classe II de apresentar epítomos específicos de estirpes de estreptococos. Entre os alelos de classe II encontrados, o HLA – DR7 e o DR53 foram os mais associados à FR/CRC em várias partes do mundo e inclusive no Brasil, independente de etnia. (GULHERME *et al* 2010).

Estudos populacionais confirmam que há uma associação da doença com os antígenos de classe II e que cada população tem seu próprio marcador (HLA-DR) para suscetibilidade à FR. É interessante notar que o alelo encontrado com mais frequência, independentemente da origem étnica, é o HLA-DR7. Esse achado, de diferentes marcadores para cada população, é corroborado pela observação de que a incidência de FR após faringoamigdalite estreptocócica é praticamente a mesma em todo o mundo (entre 1%-5%), não variando em populações diferentes. É possível que diferentes cepas de estreptococos estejam envolvidas e que as diversas moléculas HLA de classe II reconheçam peptídeos antigênicos diferentes. Outros marcadores genéticos associados ao desenvolvimento da FR e relacionados com a resposta inflamatória foram identificados, recentemente, por metodologias de biologia molecular, como alelos que codificam a produção de proteínas pró-inflamatórias,

como o fator de necrose tumoral  $\alpha$ , (TNF- $\alpha$ ) e o alelo responsável pela deficiência na produção da lecitina ligadora da manose (MBL), que tem a função de eliminar a bactéria pela ativação do complemento na fase inicial da infecção (BARBOSA PJB *et al*, 2009).

### 1.3.2. Resposta Imune

A proteção contra patógenos humanos deve-se a uma complexa interação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. A existência de processo autoimune na FR foi postulada após a observação de que as lesões no coração estavam associadas a anticorpos que reconheciam o tecido cardíaco. Kaplan confirmou essa observação experimentalmente utilizando extratos de parede celular de estreptococo e mostrando que os anti-soros obtidos reconheciam tanto o tecido cardíaco quanto o estreptococo (SPINA, 2008).

A resposta imune contra antígenos do estreptococo em indivíduos predispostos geneticamente ao desenvolvimento da CRC pode levar ao reconhecimento cruzado de proteínas próprias, por reação autoimune, desencadeando lesão tecidual. Esse reconhecimento cruzado é entendido como mimetismo molecular (GULIHERME *et al*, 2010).

Na cardite reumática, anticorpos reativos ao tecido cardíaco, por reação cruzada com antígenos do estreptococo, se fixam à parede do endotélio valvar e aumentam a expressão da molécula de adesão celular vascular -1 (VCAM I), que atrai determinadas quimiocinas e favorecem a infiltração celular por neutrófilos, macrófagos e, principalmente, linfócitos T, gerando inflamação local, destruição tecidual e necrose (BARBOSA PJB, *et al*, 2009).

Spina (2008), afirmou que assim acontece o reconhecimento e a reação cruzada celular, com linfócitos T ativados com epítomos estreptocócicos passando a reconhecer epítomos próprios, causando uma agressão celular a tecidos próprios. Esta resposta celular parece ser especialmente importante em pacientes que desenvolvem a cardite grave. O papel dos anticorpos na FR parece ser mais importante durante a fase inicial da FR, causando entre outros, artrite por depósito de imunocomplexos nas articulações. Então, as manifestações de artrite e coréia de Sydenham da FR estariam mais envolvidas com a resposta humoral, enquanto que a cardite grave estaria mais ligada à resposta celular.

Na cardite reumática, não é claro o papel da resposta humoral, sendo possível que ela cause alguma forma de lesão na fase aguda da doença. Estudos histológicos de pacientes CRC mostraram células plasmáticas cercadas por linfócitos T CD4+, próximos a fibroblastos, sugerindo interação entre a célula plasmática (linfócito B) e o linfócito T. Os nódulos de



Aschoff, considerados patognomônicos da doença, são compostos por agregados de células semelhantes a macrófagos e monócitos, que exercem a função de células apresentadoras de antígeno para as células T. Desta forma, além da reação cruzada inicial, existe uma apresentação continuada de antígenos no sítio da lesão, contribuindo para uma amplificação da resposta imune e ativação de maior número de clones autorreativos de linfócitos T. A presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em grande quantidade foi demonstrada em pacientes com CRC, o que sugere um papel direto destas células na patologia da doença (GUILHERME *et al* 2006).

O papel funcional destes linfócitos foi demonstrado a partir do isolamento de clones de linfócitos T infiltrantes do tecido cardíaco (miocárdio e valvas), provenientes de pacientes submetidos à cirurgia para correção valvar. Observou-se que eles são capazes de reconhecer tanto antígenos da proteína M do estreptococo quanto antígenos cardíacos, evidenciando, pela primeira vez, o mimetismo molecular que ocorre entre o tecido cardíaco e o estreptococo, com ativação de linfócitos CD4<sup>+</sup> levando a processo de auto-agressão. Os mesmos epítomos da proteína M e as mesmas frações de proteínas infiltrantes são reconhecidos tanto em linfócitos intralesionais como em clones isolados do sangue periférico de pacientes com FR. (SPINA 2008; GUILHERME *et al*, 2010).

#### **1.3.2.1. Citocinas**

Citocinas são moléculas proteicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Têm função autócrina agindo na própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas e endócrina quando sua ação é à distância e atuam em concentrações baixíssimas, pois sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antígenica. As citocinas parecem desempenhar um papel central na ativação da resposta imunológica e inflamatória na FR (GUILHERME *et al*, 2007; 2010).

Para Guilherme *et al* 2010, as citocinas são importantes sinalizadores secundários pós infecção pelo estreptococo, pois desencadeiam respostas imunes eficazes. Existem três subconjuntos de citocinas secretadas por células “T helper”, portanto dependendo da citocina secretada ocorrerá resposta Th1 onde as mesmas podem estar envolvidas, com a resposta imune celular produzindo (IL-2), TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Por outro lado, as células Th2 mediam a resposta imune humoral e respostas alérgicas produzindo IL-4, IL-5 e IL-13.

Na CRC a presença de infiltrado celular mediado por linfócitos T CD4<sup>+</sup> caracteriza uma reação de hipersensibilidade tardia e é indicativa da participação de células produtoras de citocinas do tipo inflamatório (Th1). A análise por imunohistoquímica do perfil de citocinas produzidas por células mononucleares infiltrantes da lesão cardíaca (miocárdio e válvulas) mostrou a produção predominante de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . As citocinas IL-10 e IL-4, caracterizadas como reguladoras da resposta imune, foram igualmente produzidas pelas células infiltrantes do miocárdio de pacientes com DCR grave, entretanto, raras células mononucleares infiltrantes das valvas produzem IL-4. Esta baixa produção de IL-4 pelas células infiltrantes das lesões valvares provavelmente contribui para a progressão e manutenção da inflamação local. No miocárdio, em que há maior frequência de células produtoras de IL-4, ocorre cura da miocardite após algumas semanas (GUILHERME *et al*, 2009; 2011).

Com base nesses dados, postula-se que a produção de citocinas direciona para uma resposta celular (Th1), causando quadros de cardite grave e sequela valvar e, provavelmente, para uma resposta predominantemente humoral (Th2), que causaria quadro clínico com coreia e artrite reumática. (AGAPITOV, 2002).

#### **1.3.2.1.1. Interleucina 10 (IL-10)**

A IL-10 é produzida principalmente por células CD8<sup>+</sup> ativadas. Células Th0, Th1, Th2 ativadas, linfócitos B, mastócitos e monócitos ativados por lipossacarídeo bacteriano (LPS) também podem produzir IL-10, sendo fontes menos importantes. Pacientes com AIDS e linfoma de Burkitt secretam grandes quantidades de IL-10. A síntese é inibida por IL-4 e pela própria IL-10. O efeito principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, como o IL-2, IFN- $\gamma$  IL-12, TNF- $\beta$ . Inibe ainda a proliferação de células Th1, mas não de Th2, diminuindo ainda a função citolítica e secretora de citocinas por Th1 e facilitando o desenvolvimento de respostas Th2. IL-10 atua como um co-estimulador para a proliferação de mastócitos e seus progenitores. É ainda co-estimuladora do crescimento dos timócitos imaturos, agindo como fator de diferenciação para as células T citotóxicas, sendo esta ação de menos intensidade (CORDEIRO, 2008).

Portanto, a IL-10 é reguladora da resposta inflamatória na CRC, pois é produzida por células que infiltram o miocárdio de pacientes com doença reumática cardíaca grave (pacientes em fase crônica e alguns em atividade reumática) (CHANG 2012).

## 2. Estenose Valvar Mitral

### 2.1. A Valva Mitral

A valva mitral é composta por cinco estruturas, a saber: anel, folhetos, comissuras, cordas tendíneas, e músculos papilares. Além deles, existe o orifício mitral, que é uma zona bem definida de transição entre a parede atrial esquerda e as bases das cúspides (zona de transição atrioventricular esquerda), servindo primariamente para separar a cavidade atrial da ventricular. Normalmente, o orifício valvar mitral apresenta área entre 4 a 5 cm<sup>2</sup> e circunferência média de 9 cm (em homens) e de 7,2 cm (em mulheres), localizando-se posteriormente ao esterno ao nível da quarta cartilagem costal. O orifício valvar fica em posição aproximadamente vertical na diástole e a 45° em relação ao plano sagital na sístole, porém com uma pequena inclinação para frente. Em relação aos outros orifícios valvares, o orifício mitral é praticamente coplanar, porém posterossuperior em relação ao orifício tricúspide e posteroinferior em relação ao orifício aórtico. Os três orifícios supracitados encontram-se intimamente conectados em uma estrutura denominada corpo fibroso central (STANDRING, 2005; FUSTER; WALSH; O' ROURKE, 2008; PATIL; MEHTA; PRAJAPATI, 2009).

A valva mitral possui dois folhetos (também denominados de cúspides): o anterior, também denominado de folheto maior, aórtico ou septal e o posterior, também chamado de folheto menor, mural ou ventricular. Entre as duas cúspides maiores geralmente são encontradas cúspides acessórias. O folheto posterior corresponde a dois terços de todo o anel mitral e possui duas ou mais reentrâncias marginais; enquanto que o anterior só corresponde a um terço dessa estrutura, possui formato triangular ou circular e geralmente não tem reentrâncias marginais. O folheto anterior se continua com as cúspides da valva aórtica e a própria aorta; já o folheto posterior é primariamente uma continuação da porção mural do átrio esquerdo. Ambos os folhetos são divididos em zonas denominadas rugosa e lisa. A zona rugosa representa a parte mais ampla das porções menores de cada folheto, recebendo varias cordoalhas tendíneas; já a zona lisa irá formar um ângulo em relação à borda livre da valva. Em relação ao ciclo cardíaco, o folheto anterior recebe grande parte do fluxo de sangue emergente, impedindo que ele reflua para o átrio e ao mesmo tempo direciona o fluxo para o orifício aórtico. Já o folheto menor atua com um papel menor, tendo um papel de suporte no fechamento do orifício valvar mitral após a sístole (BROCK, 1952; RANGANATHAN *et al*, 1970; PERLOFF; ROBERTS, 1972; HO, 2002; BONSER; PAGANO; HAVERICH, 2010).

Os dois folhetos são separados pelas comissuras posteromedial e anterolateral no anel fibroso mitral. O anel fibroso mitral (também denominado ânulo mitral) é uma estrutura de consistência fibrocartilaginosa variável que dá origem ao núcleo fibroso das cúspides valvares. A variação na consistência anular possibilita grandes mudanças na forma e dimensões do ânulo em diferentes fases do ciclo cardíaco, garantindo a máxima eficiência na abertura e fechamento da valva mitral. Morfologicamente, o anel fibroso mitral é formado por duas estruturas colagenosas, os trígono fibrosos direito e esquerdo, que são as estruturas mais resistentes do anel fibroso. O trígono fibroso direito está localizado entre o septo membranoso, as valvas atrioventriculares e a raiz aórtica. Já o trígono fibroso esquerdo situa-se na junção da valva mitral com a cúspide coronariana esquerda da valva aórtica (BOLLING, 2001; FANN; INGELS; MILLER, 2003; STANDRING, 2005).

Comunicando a valva mitral ao miocárdio ventricular encontram-se os músculos papilares (anterolateral e posteromedial). Ambos os músculos variam em comprimento e largura, podendo ser bífidos, entalhados no ápice ou divididos em menores porções. O músculo anterolateral origina-se na região mural do miocárdio esternocostal, enquanto que o músculo posteromedial origina-se da porção diafragmática do miocárdio. Ambos os músculos originam as cordoalhas tendíneas geralmente em sua porção apical (1/3 superior), mas também podem se originar em sua base (BROCK, 1952; GOSS, 1977 BOLLING, 2001; STANDRING, 2005).

As cordoalhas tendíneas podem ser classificadas como: cordoalhas de primeira ordem (numerosos segmentos delicados que se inserem nas extremidades livres das valvas); de segunda ordem (mais espessas e menos numerosas, tendo papel de ancorar a valva) e terceira ordem (fibras curtas e largas originadas no sulco perivalvar da parede ventricular, fixando-se no anel mitral posterior), totalizando cerca de 25 feixes tendinosos. Além das cordoalhas tendíneas, existem também outras estruturas musculares, denominadas trabéculas carnosas (também conhecidas como falsas cordoalhas tendíneas). Estas trabéculas ocorrem em torno de 50% dos indivíduos e às vezes acompanham o fluxo sanguíneo subaórtico. Os músculos papilares e as cordoalhas tendíneas sustentam a valva atrioventricular esquerda, permitindo que seus folhetos resistam à pressão desenvolvida durante contrações do ventrículo esquerdo (BROCK, 1952; FANN; INGELS; MILLER, 2003; TAMBURINO; USSIA, 2009).

A análise histológica do tecido valvar revela três camadas. A camada fibrosa possui um núcleo sólido de colágeno formado por fibras paralelas ao folheto e que se direcionam à cordoalha tendínea. Já a camada esponjosa, que cobre a face atrial e forma a

borda da valva, possui grandes quantidades de células conjuntivas, elastina e proteoglicano; além de pequenas porções de colágeno. A terceira camada é formada por uma cobertura fibroelástica, fina na face atrial e espessa na face ventricular. Ela é chamada de camada fibroelástica ventricular ou simplesmente ventricularis. Essa última camada produz mais elastina e colágeno com o avançar da idade, tornando-se espessada. Existem, ainda, outras estruturas musculares e neurais, que possuem importância secundária na coaptação valvar (MARRON, 1996; BOUDOULAS; WOOLEY, 2000; FANN; INGELS; MILLER, 2003; TAMBURINO; USSIA, 2009).

## **2.2. A Estenose da Valva Mitral**

Define-se estenose mitral (EM) como a obstrução ao influxo de sangue que passa do átrio para o ventrículo esquerdo pela valva mitral resultante de uma anormalidade estrutural valvular. A febre reumática representa a principal causa de estenose mitral, correspondendo a cerca de 99% dos casos em que houve troca cirúrgica da valva mitral. Deformidades congênitas, síndrome carcinoide, trombo atrial esquerdo, mixoma, endocardite e algumas doenças sistêmicas (tais como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e as doenças de Fabry e de Whipple) representam outras possíveis causas de estenose mitral. Entre os portadores de estenose mitral de origem reumática, observa-se uma predominância de indivíduos do sexo feminino (2:1), entre a quinta e a sexta décadas de vida, residentes em regiões subdesenvolvidas (especialmente o continente Africano). Quando não tratada, a estenose mitral evolui de maneira insidiosa e estável nos primeiros anos. Contudo, é uma doença contínua e pode progredir aceleradamente. Isso ocorre principalmente se a infecção reumática for grave ou os episódios de cardite forem recorrentes (WALLER; HOWARD; FESS, 1994; CARABELLO, 2005; OTTO; BONOW, 2007; MOURA, 2010).

Na fisiopatologia da estenose mitral, a redução da área valvar e consequente obstrução ao enchimento do ventrículo esquerdo (VE) aumenta a pressão atrial esquerda e produz gradiente pressórico persistente entre o átrio esquerdo (AE) e o VE, possibilitando assim a manutenção do débito cardíaco. Em estágios iniciais da doença, nos quais a área valvar encontra-se acima de 2cm<sup>2</sup>, o sangue pode fluir do átrio esquerdo para o ventrículo esquerdo através de um pequeno, porém anormal, gradiente de pressão. Todavia em estágios mais avançados da doença, nos quais a área valvar se encontra abaixo de 1cm<sup>2</sup>, será necessário um gradiente de pressão atrioventricular de aproximadamente 20 mmHg a 25 mmHg para que haja a manutenção do débito cardíaco em repouso. Porém em indivíduos com

átrio esquerdo mais complacente, o gradiente pressórico AE-VE será menor, fazendo com que esses pacientes desenvolvam quadro clínico mais relacionado ao baixo débito cardíaco (GORLIN; GORLIN, 1951; HUGENHOLTZ *et al*, 1962; KAWANISHI; RAHIMTOOLA, 1996; CARABELLO, 2008).

Devido ao exuberante aumento no gradiente de pressão entre AE e VE, ocorrerá elevação da pressão venosa pulmonar levando indiretamente ao aumento da pressão arterial pulmonar. A combinação da pressão atrial esquerda elevada com a restrição de influxo para dentro do VE irá limitar o débito cardíaco (DC). Apesar do processo reumático ocasionalmente afetar a função de músculo do VE (sequela da miocardite reumática), o ventrículo esquerdo costuma ser normal na maioria dos pacientes com estenose mitral. No entanto, em aproximadamente um terço dos pacientes com EM, o desempenho da ejeção do VE é reduzido mesmo com a função muscular normal, devido a uma pré-carga reduzida (decorrente da obstrução ao influxo) e uma pós-carga aumentada como resultado da vasoconstricção reflexa causada pelo DC reduzido (GORLIN, 1954; WOOD, 1954; KAWANISHI; RAHIMTOOLA, 1996; ACC/AHA, 2006; CARABELLO, 2008).

A fisiopatologia da estenose mitral pode ser justificada por alterações morfológicas encontradas na fase crônica da doença reumática. São elas: a fusão e calcificação das comissuras (com erosão superficial e perda de endotélio), além da fibrose e fusão das cordas tendíneas, que irão apresentar aspecto engrossado e retraído. Observam-se também lesões verrucosas ou vegetações reumáticas, predominantes nas margens livres das valvas. A cicatrização é importante na evolução da doença valvar, sendo acompanhada pela neovascularização de uma estrutura outrora avascular. Aumento da celularidade (com predomínio de polimorfonucleares) e da deposição de colágeno tecidual são também encontrados. Os corpos de Aschoff, usualmente visualizados na miocardite reumática, raramente são encontrados em valvas mitrais reumáticas. Outras alterações histopatológicas podem ser encontradas na vasculatura pulmonar, tais como o aumento da espessura da camada média das artérias pulmonares, levando ao desenvolvimento da vasculopatia congestiva (DELGADO *et al*, 2005; LEONG; SOOR; BUTANY *et al*, 2006; VEINOT, 2006; SCHOEN; MITCHEL, 2010).

O paciente com estenose mitral pode permanecer assintomático por longos períodos de tempo (média de 10-20 anos), apesar do débito cardíaco decrescente e da resistência venosa e arteriolar do pulmão aumentadas. A sintomatologia, quando existente, associa-se com a área valvar mitral encontrada, ainda que tal correlação nem sempre seja confiável. Os principais sintomas encontrados na EM são a dispneia aos esforços, a ortopneia

e a dispneia paroxística noturna. Atividades cotidianas (tais como exercício físico e atividade sexual), infecções, febre e fibrilação atrial podem desencadear dispneia quando a área valvar for inferior a 2,5 cm<sup>2</sup>. Surgirá sintomatologia em repouso quando essa área for inferior a 1,5 cm<sup>2</sup>. Edema e ascite usualmente são encontrados nos pacientes em estágios mais avançados da doença, associando-se diretamente a síndrome do baixo débito (fadiga, cansaço e lipotimia desencadeadas por esforços). A fibrilação atrial é um fenômeno relativamente comum em portadores de EM e se deve a dilatação, fibrose e hipertrofia das paredes do átrio esquerdo. A hemoptise, comum na estenose mitral, mas atípica em outras causas de hipertensão atrial esquerda, desenvolve-se quando elevados níveis de pressão em átrio esquerdo rompem anastomoses das pequenas veias brônquicas. Eventualmente, a hemoptise (que possui aspecto espumoso e róseo) encontra-se associada com tosse e emagrecimento, sendo importante nesse caso descartar possível diagnóstico diferencial de tuberculose. Em alguns pacientes, o grande aumento do átrio esquerdo, associado aos linfonodos traqueobronquiais ingurgitados leva a compressão do nervo laríngeo recorrente contra o brônquio fonte, acarretando rouquidão (Síndrome de Ortner), além de disfagia para sólidos. Já em outros pacientes (em torno de 15%), ocorre o aparecimento de dor precordial atípica, geralmente desencadeada por embolização coronariana (CARAPETIS, 2007; AMATO; MOFFA, 2008; FUSTER; WALSH; O'ROURKE, 2008; MOURA, 2010).

No exame físico de portadores de estenose mitral, geralmente o pulso arterial é normal, podendo estar com a sua amplitude reduzida, devido à diminuição do débito cardíaco na EM crítica. Já o pulso venoso jugular exibe uma onda A proeminente em pacientes com ritmo sinusal e aumento da resistência vascular pulmonar. Em pacientes que apresentam fibrilação atrial, a parte descendente da onda X desaparece, somente havendo uma onda C por ciclo cardíaco. Caso o paciente apresente insuficiência ventricular direita, pode-se observar turgência patológica da jugular externa. A palpação de precórdio irá revelar um ictus de VE fraco ou até mesmo impalpável. Nos casos em que houver sobrecarga de ventrículo direito (VD) devido à hipertensão arterial pulmonar, o seu ictus será palpável e importante, podendo até mesmo ocupar o lugar do ictus de VE, caso o VD esteja muito dilatado. Apesar de ser atualmente pouco comum, a fâcies mitralis (manchas róseo-purpúricas em bochechas) ocorre em pacientes com EM grave, devido ao baixo débito cardíaco e vasoconstricção sistêmica (PORTO, 2005; OTTO; BONOW, 2007; CARABELLO, 2008; FUSTER; WALSH; O'ROURKE, 2008).

Na ausculta, geralmente é encontrada hiperfonese e prolongamento da primeira bulha, porém esta característica desaparece caso haja fibrose ou calcificação valvar. Ao

mesmo tempo, há também um desdobramento em B2, com hiperfonese do seu componente P2, decorrente da hipertensão arterial pulmonar. Geralmente, o sopro de estenose mitral é de baixa frequência, com caráter em ruflar, sendo geralmente audível no ictus cordis. Porém eventualmente pode se irradiar para a axila ou para a borda esternal média. Na fase aguda da febre reumática, este sopro é denominado sopro de Carey-Coombs. Outros achados auscultatórios em pacientes com EM são: o estalido de abertura da valva mitral (que ocorre logo após B2, lembrando o desdobramento da segunda bulha ou a terceira bulha), o sopro diastólico de regurgitação pulmonar (sopro de Graham Steel) e o sinal de Rivero-Cavallo (BARRINGTON; BASHORE; WOOLEY, 1988; PORTO, 2005; OTTO; BONOW, 2007; ENGEL, 2012).

Dos exames complementares, o eletrocardiograma (ECG) será útil para determinar se o paciente encontra-se em ritmo sinusal ou em fibrilação atrial. Além disso, este exame poderá mostrar sinais indiretos de aumento de átrio esquerdo, tais como a onda P larga e bífida (P mitrale) e o índice de Morris em V1. Na radiografia de tórax, o sinal mais precoce de EM é o aumento atrial esquerdo. Este aumento pode ser evidenciado por alguns critérios, tais como o duplo contorno da silhueta cardíaca do coração e o sinal da bailarina (deslocamento superior do brônquio-fonte esquerdo). As alterações pulmonares decorrentes da EM são proeminentes: inversão do padrão vascular, aparecimento das linhas B de Kerley, edema intersticial e em quadros mais graves, pequenos nódulos intersticiais difusos, devido ao acúmulo de hemossiderina no interstício pulmonar. No ecocardiograma, é possível a visualização do aspecto das cúspides e de todo o aparato valvar. A etiologia reumática é confirmada pelo aspecto do folheto posterior da valva mitral que se encontra espessado. O grau de comprometimento valvar é estabelecido pelo escore de Block, que representa a junção de quatro critérios, a saber: o grau de calcificação valvar; o grau de espessamento; o acometimento do aparelho subvalvar e a mobilidade das cúspides (AMATO; MOFFA, 2008; LONGO *et al*, 2011; ENGEL, 2012).

O tratamento pode ser dividido em medicamentoso, intervencionista ou cirúrgico. Os principais medicamentos utilizados são os betabloqueadores (para melhora dos sintomas dispneicos), os antagonistas de canal de cálcio (quando o paciente tiver contraindicação ao uso do betabloqueador), os diuréticos (em associação ao betabloqueador para compensação do quadro dispneico) os digitálicos (quando o paciente apresentar ritmo sinusal). Em pacientes com fibrilação atrial (FA), pode-se utilizar a warfarina ou os inibidores do fator Xa com o intuito de se fazer uma anticoagulação eficaz, mesmo naqueles pacientes sem histórico de acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI). O tratamento intervencionista



comprovadamente diminui sintomas e aumenta a sobrevida dos pacientes. Ele é indicado para aqueles pacientes sintomáticos e com estenose mitral moderada ou grave. O tratamento cirúrgico (troca valvar) é reservado para pacientes com escore de Block elevado ( $>11$ ), presença de valva calcificada ou quando há insuficiência mitral de moderada a grave associada (dupla lesão mitral) (ACC/AHA, 2006; AMATO; MOFFA, 2008; ENGEL, 2012).

De acordo com alguns parâmetros, tais como gradiente médio, a pressão sistólica de artéria pulmonar e área valvar, a gravidade da estenose mitral é avaliada, embora ainda não haja valores exatos que a definam. Em pacientes com área valvar maior que 1,5 cm<sup>2</sup>, gradiente médio menor que 5 mmHg e pressão sistólica da artéria pulmonar (PSAP) menor que 30 mmHg, a estenose mitral é classificada como leve. Aqueles com área valvar entre 1-1,5cm<sup>2</sup>, gradiente médio entre 5-10 mmHg e pressão sistólica da artéria pulmonar entre 30-50 mmHg, encontram-se classificados como portadores de EM moderada. Finalmente, dados de área valvar menores que 1cm<sup>2</sup>, gradiente médio maior que 10 mmHg e pressão sistólica da artéria pulmonar maior que 50 mmHg irão definir a EM como grave. A sobrevida em dez anos dos pacientes que atingem esse estágio da doença é de 80%, 50% ou 15%, se a sintomatologia for mínima, moderada ou limitante, respectivamente. A mortalidade em 65% dos casos se deve a congestão sistêmica e pulmonar, embolia sistêmica em 25%, embolia pulmonar em 10% e infecção em 1-5% (ACC/AHA, 2006; CARAPETIS, 2007; MOURA, 2008).

### **3. Endotelinas**

As endotelinas (ETs), inicialmente descritas por Yanagisawa em 1988, representam uma família composta de três isopeptídeos endógenos, denominados endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). Cada um destes peptídeos é composto por 21 aminoácidos, sendo produzidos em vários tecidos e células. A ET predominantemente produzida pela célula endotelial cardíaca é a ET-1. A endotelina-1 está presente normalmente em níveis séricos baixos (entre 0,3-3 picogramas por dl) e apresenta múltiplos efeitos na vasculatura, estando envolvido no desenvolvimento e regulação de funções fisiológicas incluindo homeostase cardiovascular, produção hormonal, balanço hidroeletrólítico, proliferação celular e desenvolvimento respiratório. No entanto em níveis elevados, age como mediador patogênico levando a vasoconstricção, fibrose, hipertrofia vascular e inflamação. A sua ação vasoconstrictora é extremamente potente, sendo aproximadamente dez vezes maior em relação à angiotensina II. Porém a sua vida média plasmática é inferior a dois minutos,

sendo geralmente degradada nos pulmões, rins, fígado e coração. Em relação aos outros dois peptídeos, até hoje não foi encontrada função para o ET-2. Já o ET-3, encontrado abundantemente em tecido cerebral, futuramente poderá ser considerada a endotelina neural (YANAGISAWA *et al*, 1988; YANAGISAWA *et al*, 1990; LEVIN, 1995; JAIN; YADAVA; RAIKAR, 2002; MAYES, 2003; GARNCARCZYK; JURZAK; GOJNICZEK, 2008).

Das três isoformas de endotelina, derivadas de três genes distintos em cromossomos separados, a ET-1 é a melhor caracterizada e desempenha o papel mais importante na regulação do tônus vascular. A ET-1 é inicialmente produzida como uma precursora inativa de 212 aminoácidos, a preproET-1, que é clivada proteoliticamente por proteases específicas a outro peptídeo inativo de 38 aminoácidos chamado "big" ET-1. Esta última molécula precursora, sob o efeito proteolítico das enzimas de conversão de endotelina (ECE-1 e ECE-2), que realiza uma hidrólise incomum da ligação Trp21 -Val22, é eventualmente transformada na forma madura bioativa da ET-1, peptídeo de 21 aminoácidos. Cada uma das ECE's, em seres humanos, existe em quatro isoformas e a ECE-2 difere da ECE-1 ao exigir um pH ácido para uma atividade ótima. Uma terceira ECE, a ECE-3, é altamente específica para a "big" ET-3. Embora a "big" ET-1 possa se ligar aos receptores de endotelina, esta molécula não tem função biológica além da proteção de ET-1 da clivagem por proteólise (KAOUKIS, 2013).

Em 1990, foi publicada a descoberta de receptores destes peptídeos, os quais deram os nomes de receptores de endotelina A (ETr-A) e receptores de endotelina B (ETr-B). De modo geral, o receptor ETr-A tem maior afinidade pelo ET-1 e ET-2 do que pelo ET-3, enquanto que o receptor ETr-B tem igual afinidade pelos três peptídeos. Tem-se constatado, porém, que as células endoteliais são particularmente sensíveis a ação do ET-3. Os receptores ETr-A são expressos em várias células do sistema cardiovascular, nas células musculares lisas, nas células do músculo cardíaco e nos fibroblastos, enquanto que os receptores ETr-B são expressos predominantemente nas células endoteliais e em menor quantidade no músculo liso, nos fibroblastos e nos cardiomiócitos. Eventualmente, estes receptores apresentam ações opostas. Os efeitos dos receptores ETr-A, mais presentes no sistema cardiovascular, promovem vasoconstrição, aumento do inotropismo e da mitogênese. Já os receptores ETr-B apresentam duplo efeito no tônus vascular: propriedades vasodilatadoras quando são ativados no endotélio, mediadas pela liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina e propriedades vasoconstrictoras, quando estes receptores são ativados na musculatura lisa vascular. No endotélio, o ETr-B além de suas funções vasodilatadoras, detém um papel importante na remoção do excesso da ET-1, sendo o responsável pela manutenção de concentrações

plasmáticas normais deste peptídeo. Há uma maior concentração destes receptores no endotélio vascular pulmonar, tornando o pulmão um dos órgãos responsáveis pela depuração de ET-1. Nas artérias coronárias a expressão de receptores ETr-B a nível endotelial é reduzida, levando a ET-1, que está aumentada neste sítio, a se tornar um vasoconstritor coronário (HEDNER, 1991; MILLER *et al*, 1993; SCHNEIDER *et al*, 2000; MASAKI, 2004; ROS *et al*, 2005; POLIKEPAHAD; MOORE; VENUGOPAL, 2006; BRÁS-SILVA; LEITE-MOREIRA, 2008).

O perfil da localização da endotelina nos diversos tecidos cardíacos revela importantes informações, tais como a de que os miócitos cardíacos não expressam o gene da preproendotelina, a proteína precursora da endotelina. Por isso, eles não são produtores de ET-1 na espécie humana. Existem ao menos duas hipóteses que tentam explicar a produção de endotelina. Uma delas sugere que as células endoteliais endocárdicas seriam as maiores responsáveis pela liberação de endotelina-1, modulando a ação de células vizinhas, como os miócitos. Já a outra, sugere que a produção de ET-1 ocorre nas células endoteliais da vasculatura cardíaca, sendo mediada por sinais enviados pelos miócitos cardíacos. De qualquer forma, existem alguns fatores que atuam no aumento da expressão dos genes da preproendotelina. São eles: a angiotensina-II, as catecolaminas, algumas citocinas, os radicais livres, a insulina e a hipóxia. Por sua vez, heparinas, óxido nítrico e prostaglandinas atuam inibindo a sua produção (DAVENPORT, 1998; RUSSEL, 2000; MAYES, 2003; MERKUS *et al*, 2005).

Em relação aos efeitos cardiovasculares, sabe-se que a ET induz uma potente resposta inotrópica e cronotrópica positiva, dose-dependente além de promover a liberação do peptídeo natriurético atrial das células miocárdicas. Eventualmente, devido à potente ação vasoconstrictora, pode promover isquemia fatal em cobaias. Além disso, ela estimula a mitogênese de células musculares lisas e de fibroblastos e intervém na regulação de proto-oncogenes, c-fos e c-myc, envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda. Estudos conduzidos em animais, com a utilização de valvas mitrais mixomatosas (que são bastante semelhantes às valvas mitrais reumáticas), mostraram correlação positiva entre a densidade de receptores de endotelinas com mudanças na composição dos folhetos valvares. Em humanos, a endotelina tem alguma influência sobre as características histopatológicas encontradas em válvulas mitrais estenosadas, tais como a neoangiogênese (através da expressão de receptores de ETr-A que leva ao aumento do VEGF) e a calcificação (através do aumento da expressão dos genes da osteocalcina e da osteopontina). No que diz respeito à fibrose, a endotelina estimula a produção de colágeno do tipo I, a inibição da atividade da collagenase e a produção anormal

da matriz extracelular promovendo uma fibrose reativa. Este mecanismo pode ser mediado pelo fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), que regula positivamente a expressão de ETr-A e talvez de ETr-B. A endotelina também ativa neutrófilos, mastócitos e estimula monócitos para libertar algumas citocinas, tais como o TGF-beta e o TNF-alfa (SIMONSON *et al*, 1989; KING, 1990; HEDNER, 1991; MOW; PEDERSEN, 1999; RAMIRES *et al*, 2003; WU, 2003; PEDERSEN *et al*, 2007; SHIMOJO, 2007).

A crescente pesquisa laboratorial envolvendo as endotelinas (e seus receptores) se justifica por sua resposta farmacológica única e por sua provável correlação com várias doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose, hipertensão arterial, doença de Chagas, isquemia miocárdica e finalmente a própria estenose valvar reumática. Neste caso, as endotelinas podem atuar ora como via final de várias cardiopatias, ora como perpetuadoras dessas condições mórbidas, contribuindo na patogênese de uma variedade de doenças cardiovasculares. (RUSSELL, 2000; MOLERO *et al*, 2003; CHEN, 2004; MASAKI, 2004; DAMMANAHALLI; SUN, 2008; KIRBY, 2008; MACHADO; CAMARGOS, 2008).

Situando a endotelina-1 na FR, vários estudiosos relataram nível sérico elevado deste peptídeo em pacientes com doença reumática, justamente associada à mitogênese, fibrose e atividade inflamatória (MAYES, 2003). Chen *et.al* (2006) relataram em seus estudos, aumento do nível sérico de endotelina-1 em pacientes com estenose mitral reumática.

Neste sentido, Moura *et.al* (2010) verificaram que válvulas cardíacas (fibrosadas, estenosadas) trocadas de pacientes com febre reumática, apresentavam ET-1 assim como seus receptores. Encontrou-se uma manifestação do gene ET-1 em 40,7% das amostras de valvas reumáticas, dos receptores ETA em todas as amostras (100%) e 22,2% dos receptores ETB. Desta forma, sugeriu-se a existência de uma associação do metabolismo acelerado do colágeno com o processo fibrótico valvar reumático, pois há expressão destes mesmos receptores nos fibroblastos, podendo, esse mecanismo patológico, ser relevante na valvopatia reumática.

#### **4. Reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real**

A análise quantitativa da sequência de ácido nucleico (DNA ou RNA) tem tido um importante papel em muitos campos de pesquisa médica. Medidas de expressão gênica têm sido utilizadas para a monitorização de respostas biológicas a estímulos diversos; já a análise quantitativa de um determinado gene tem sido usada para mensurar a amplificação de genes como HER-2 e BRCA 1 e 2, que são encontrados em pacientes com câncer de mama. A

combinação entre as quantificações gênica e genômica tem sido utilizada há mais de 15 anos para a análise dos níveis do vírus da imunodeficiência humana durante as diferentes fases da síndrome de imunodeficiência humana adquirida (AIDS). (TAN *et al*, 1994; FURTADO *et al*, 1995; HEID *et al*, 1996).

A reação em cadeia de polimerase em tempo real compreende duas reações sequenciais que são a transcrição reversa (RT) e a reação em cadeia de polimerase (PCR). Ela é a técnica preferida para analisar a expressão de mRNA derivado de diversas fontes. Além disso, é uma técnica fácil de ser reproduzida, possui uma boa acurácia, apresentando resultados confiáveis e ao mesmo tempo, rápidos. A síntese de DNA é feita com uma transcriptase reversa que atua em RNA total ou numa fração enriquecida de RNA poliadenilado. Já a reação de PCR é feita com uma polimerase de DNA, tendo como molde o cDNA da reação anterior. Para a atuação de cada uma destas enzimas, é necessária a presença de iniciadores de síntese (“primers”) cuja sequência vai condicionar a especificidade do fragmento amplificado. Na reação da transcriptase reversa podem ser usados “primers” específicos para o gene em análise, oligo(dT) ou, então, oligonucleótidos de constituição aleatória. Independentemente do tipo de “primers” usados na primeira reação, no PCR subsequente são sempre usados “primers” específicos para o gene em análise (OLIVEIRA, 2000, PFAFFL, 2001, NOVAIS, 2004).

Devido ao caráter exponencial da reação de PCR, a sensibilidade desta técnica é consideravelmente maior do que outras técnicas de análise de expressão gênica (“Northern” e ensaio de proteção de ribonucleases), requerendo quantidades menores de RNA para análise. Por outro lado, a contaminação do RNA por quantidades ínfimas de DNA genômico leva a falsos positivos ou à impossibilidade de distinção da amplificação obtida a partir de cDNA ou de DNA genômico. Adicionalmente, as duas reações que constituem o PCR em tempo real, são reações enzimáticas que dependem do emparelhamento de “primers”, sendo a sua eficiência fortemente dependente de condições ambientais como a temperatura, pH e força iônica. Por isso, deve-se fazer um cuidadoso planejamento das reações, que deve passar pela seleção de um método apropriado de extração e purificação de RNA, escolha correta das enzimas a utilizar, “design” dos “primers”, temperatura de atuação da transcriptase reversa e programa de PCR (RAEYMAEKERS, 1995; NOVAIS, 2004; CARVALHO, 2010).

A PCR possibilita a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima DNapolimerase, a mesma que participa da replicação do material genético nas células. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento (o iniciador, ou primer) já esteja ligado a uma das cadeias do DNA no ponto escolhido para o

início da síntese. Os iniciadores definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência DNA com bilhões de cópias (HEID, 1996; OLIVEIRA, 2000).

Os equipamentos destinados à realização de PCR em tempo real associam um termociclador a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente de uma reação de amplificação. A metodologia utiliza os mesmos reagentes de uma PCR convencional acrescido de fluorocromos, intercalados em cadeias de DNA (metodologia SybrGreen) ou presentes em sondas de hibridização específicas (metodologia TaqMan). Na presença de produto amplificado, os fluorocromos, excitados por uma fonte de luz (laser), emitem um sinal proporcional à quantidade de produto sintetizado que, por sua vez, será proporcional à quantidade inicial de seqüências-alvo presentes na reação de amplificação (RAEYMAEKERS, 1995; NOVAIS, 2004).

Os sinais são detectados por um sistema óptico e analisados por software específico. Os sinais de fluorescências, produzidos à medida que o produto é amplificado, são expressos graficamente (sinais de fluorescência versus número de ciclos) permitindo monitorar, em tempo real, a cinética e a eficiência da reação de amplificação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Cycle Threshold (Ct) (OLIVEIRA, 2000; CARVALHO, 2010).

## **5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Devido à técnica do ELISA ter um alto nível de sensibilidade e reprodutibilidade e permitir automação, tornou-se um método de eleição para exame de um grande número de amostras. Têm-se vários tipos de ELISA, como o direto, indireto, duplo sanduíche direto e o ELISA duplo sanduíche indireto. O Elisa se baseia na identificação de anticorpos e ou antígenos, por anticorpos marcados com uma enzima, de maneira que esta enzima age sobre um substrato e a reação faz com que o cromógeno (microorganismo que produz coloração no meio onde se encontra) mude de cor. O produto da reação, além de colorido, é insolúvel para não difundir do local da formação. Foi inicialmente desenvolvido por Engvall & Perlman e por Van Weeman & Schuurse, posteriormente, muito utilizado como teste diagnóstico em várias doenças. Quando o sistema imunológico do corpo encontra um antígeno específico (por exemplo, uma proteína característica na superfície de um vírus ou bactéria), os anticorpos que são específicos para o antígeno interceptam-no com uma ligação física a ele em uma "chave e fechadura", neutralizando assim o antígeno. O ELISA é uma técnica fundamental para

avaliações imunológicas e bioquímicas, utilizada para detectar o antígeno ou anticorpo em uma amostra, com base em interações anticorpo-antígeno. Se um antígeno (ou da mesma forma, um anticorpo) é detectada, um sinal é produzido na forma de uma mudança mensurável (DANTAS, 2004).

O ELISA sanduíche é utilizado para detectar antígenos. Envolve primeiramente o revestimento de placas de poliestireno com anticorpos de captura. Acrescenta-se então a solução de antígenos, de forma que o antígeno se conjugue com o anticorpo de captura. Isso é seguido, após uma lavagem, pela adição de um anticorpo específico, uma antiglobulina marcada com enzima e um substrato. Neste teste, a intensidade da reação de cor se relaciona diretamente com a quantidade de antígeno conjugado (MEIRELLES, 2006).

## II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACC/AHA. Guidelines for the management of patients with valvular heart disease. **J of the Am Col of Cardiol.** 48: 1-148, 2006.

AGAPITOV, A. V.; HAYNES, W. G. Role of endothelin in cardiovascular. **JRAAS**, v. 3, n. 1, p. 1 – 15, Março 2002.

AMATO, M.; MOFFA, P.J. Cardiopatias Valvares. In: LOPES, A.C. **Tratado de Clínica Médica**, Roca, 2008.

BARBOSA, P.J.B.; MÜLLER, R.E.; LATADO, A.L.; ACHUTTI, A.C.; RAMOS, A.I.O.; WEKSLER, C., *et al.* Diretrizes Brasileiras para Diagnóstico, Tratamento e Prevenção da Febre Reumática da Sociedade Brasileira de Cardiologia, da Sociedade Brasileira de Pediatria e da Sociedade Brasileira de Reumatologia. **Arq. Bras Cardiol.** 93(3 supl.4):1-18, 2009.

BARRINGTON, W.W.; BASHORE, T.; WOOLEY, C.E. Mitral stenosis: mitral dome excursion at M1 and the mitral opening snap — the concept of reciprocal heart sounds. **Am Heart J.** 115: 1280–1290, 1988.

BISNO, A.L. Rheumatic Fever. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil Medicine**, 23th ed., Elsevier, 2008.

BOLLING, S. F. Mitral valve reconstruction in the patient with heart failure. **Heart Failure Reviews.** 6: 177-85, 2001.

BONSER, R.S.; PAGANO, D.; HAVERICH, A. **Mitral valve surgery**. London: Springer-Verlag, 2010.

BOUDOULAS, H.; WOOLEY, C. **Mitral Valve: Floppy Mitral Valve, Mitral Valve Prolapse, Mitral Valvular Regurgitation**. 2nd edition. New York: Futura Publishing Company, 2000.

BRÁS-SILVA, C; LEITE-MOREIRA, A.F. Efeitos Miocárdicos da Endotelina- 1, Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal, **Rev Port Cardiol.** 27 (7-8): 925-51, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS: informações de saúde. Disponível em: <[www.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm](http://www.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm)>. Acesso em: 12 dez. 2017.

BROCK, R.C. The surgical and pathological anatomy of the mitral valve. **Br Heart J.** 14(4): 489–513, 1952.

CARABELLO, B.A. Modern Management of Mitral Stenosis. **Circulation.** 112: 432-37, 2005.

CARABELLO, B.A. Valvular heart disease. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil Medicine**, 23th ed., Elsevier, 2008



CARAPETIS, JR, STEER, A.C.; MULHOLLAND, E.K.; WEBER, M. The global burden of group A streptococcal diseases. **Lancet Infect Dis** 2005; 5:685.

CARAPETIS JR. Rheumatic heart disease in developing countries. **N Engl J Med** 2007; 357: 439-41.

CARVALHO, C.V.; RICC GIANNINA, A. R. **Guia de práticas em biologia molecular**. São Caetano do Sul, Yendes, 2010.

CHANG, C. Cutting Edge Issues in Rheumatic Fever. **Rev. Aller Immunol**, v. 42, p. 213 - 237, 2012.

CHEN, M. *et al.* Increased Circulating Endothelin-1 in Rheumatic Mitral Stenosis: Irrelevance to Left Atrial And Pulmonary Artery Pressures. **Chest**, v. 125, n. 2, p. 390 – 396, Fevereiro 2004.

CHOPRA, P.; GULWANI, H. Pathology and pathogenesis of rheumatic heart disease. **Indian J Pathol Microbiol**. 50(4):685-97, 2007.

CORDEIRO, C. A. Polimorfismos dos genes das citocinas IL-1, IL-10 e TNF alfa na retinocoroidite toxoplásmica. 2008. 110 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Medicina) - Universidade Federal de Minas Gerais.

COSTA, L.P.; DOMICIANO, D.S.; PEREIRA R.M.R. Características demográficas, clínicas, laboratoriais e radiológicas da febre reumática no Brasil: revisão sistemática. **Rev Bras Reumatol**. 49(5):606-16, 2009.

DAJANI AS, AYOUB E, BIERMAN FZ. Special writing group of the comittee on rheumatic fever, endocarditis and Kawasaki disease of the council on cardiovascular disease in the young of the American Heart Association: Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever – Jones Criteria, 1992 Update. **JAMA** 1992; 268: 2069-73.

DAMMANAHALLI, K.J.; SUN, Z. Endothelins and NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 35(1):2-6, 2008.

DANTAS, T. V. M. Desenvolvimento e padronização de elisa indireto para diagnóstico de maedi-visna vírus de ovinos. 2004. 77 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual do Ceará.

DAVENPORT, A. P. Endothelin converting enzyme in human tissues. **Histochem J**. 30: 359-74, 1998.

DELGADO, J.F.; CONDE, E.; SÁNCHEZ, V.; LÓPEZ-RÍOS, F.; GOMÉZSÁNCHEZ, M.A.; ESCRIBANO, P., *et al.* Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension due to chronic heart failure. **The European Journal of Heart Failure** 7: 1011 –16, 2005.

ENGEL, C.L (ed.). **Reumatologia: Formas diversas de lesão reumática**. Editora Medyklin, Rio de Janeiro, 2012.

FAE, K.; KALLIL, J.; TOUBERT, A.; GUILHERME, L. Heart infiltrating T cell clones from a rheumatic Heart disease patient display a common TCR usage and a degenerate antigen recognition pattern. **Mol Immunol.**2004; 40(14-15):1129-35.

FANN, J. I.; INGELS, N. B. J. R.; MILLER, D. C. Pathophysiology of mitral valve disease. **Cardiac Surgery in the Adult**. New York: McGraw-Hill. 901-31, 2003.

FERRIERI P; Jones Criteria Working Group. Proceedings of the Jones Criteria workshop. **Circulation**. 2002 Nov 5;106 (19):2521-3.

FURTADO, M.R.; KINGSLEY, L.A.; WOLINSKY, S.M. Changes in the viral mRNA expression pattern correlate with a rapid rate of CD4 + T-cell number decline in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. **J Virol**. 69: 2092-2100, 1995.

FUSTER, V.; WALSH, R. A.; O'ROURKE, R.A. *et al.* **Hurst's the Heart, 12<sup>th</sup> edition**. McGraw-Hill's, 2008.

GARNCARCZYK, A.; JURZAK, M.; GOJNICZEK, K. Characteristic of the endogenous peptides-endothelins and their role in the connective tissue fibrosis. **Wiad Lek**. 61(4-6):126-34, 2008.

GORLIN, R. The mechanism of the signs and symptoms of mitral valve disease. **Br Heart J**, v.16, p.375-380, 1954.

GORLIN, R.; GORLIN, S.G. Hydraulic formula for calculation of the area of stenotic mitral valve, other cardiac valves and central circulatory shunts. **Am Heart J** 1951, v.41 1-29.

GOSS, C.M. Gray Anatomia. **Guanabara Koogan**, 29<sup>a</sup> ed. 1977.

GUILHERME, L.; *et al.* Human heart infiltrating T cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. **Circulation** 1995; 91: 1250-58.

GUILHERME, L.; RAMASAWMY, R.; KALIL, J. Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease: Genetics and Pathogenesis. **Scandinavian Journal of Immunology**; 2007, (66): 199–207.

GUILHERME, L.; KALIL J. Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease: Cellular Mechanisms Leading Autoimmune Reactivity and Disease. **J Clin Immunol**. 2010; (30):17–23.

HEDNER, T. Endothelin. A bioactive peptide with a role in hypertension? In: Hansson L - **Hypertension Annual**. London, Current Science 1991.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J. *et al.* Real time quantitative PCR. **Genome Res**. 1996 6: 986-994.

HO, S. Y. Anatomy of the mitral valve. **Heart**. 88 (Supl IV): iv5–iv10, 2002.

HUGENHOLTZ, P.G.; RYAN, T.J.; STEIN, S.W, *et al.* The spectrum of pure mitral stenosis: hemodynamic studies in relation to clinical disability. **Am J Cardiol**, v.10, p, 773-84, 1962.

JAIN, S.K.; YADAVA, R.K.; RAIKAR, R. Role of Endothelins in Health and Disease. **JACM**. 3(1): 59-64, 2002.

KAOUKIS, A. *et al.* The role of endothelin system in cardiovascular disease and the potential therapeutic perspectives of its inhibition. **Current topics in medicinal chemistry**, Cidade, v. 13, n. 2, p. 95-114, 2013.

KAWANISHI, D.T.; RAHIMTOOLA, S.H. Mitral stenosis. In: RAHIMTOOLA, S.H. ed. **Valvular Heart Disease II**. St. Louis: Mosby, 1996: 8.1–8.24.

KING, A.J.; MARSDEN, P.A.; BRENNER, B. Endothelin: a potent vasoactive peptide of endothelial origin. In: Laragh JH, Brenner BM - **Hypertension Pathophysiology**, Diagnosis and Management. New York, Raven Press 1990.

KIRBY, N.S.; HADOKE, P.W. F; BAGNALL, A.J; WEBB, D.J. The endothelin system as a therapeutic target in cardiovascular disease: great expectations or bleak house? **Centre for Cardiovascular Science, The Queen's Medical Research Institute**, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK: 2008.

KISS, M.H.B. Febre Reumática. In: LOPES, A.C. **Tratado de Clínica Médica**, Roca, 2008.  
LEURISALO, M. Rheumatic fever: clinical picture, differential diagnosis and sequels. **Ann Clin Res** 1977; 9 (supl 20): 1-79.

LEVIN, E.R. Endothelins. **N Engl J Med**. 333:356-63, 1995.

LEAO, S.C. Perfil Imunológico do portador de estenose valvar severa: Uma integração das visões clínica, histológica e molecular da valvopatia reumática. **Relatório final do Programa de Iniciação Científica da Universidade Federal de Sergipe**, São Cristóvão, 2012.

LEONG, S.W.; SOOR, G.S.; BUTANY, J.; HENRY, J.; THANGAROOPAN, M.; LEASK, R.L. Morphological findings in 192 surgically excised native mitral valves. **Can J Cardiol** 22(12):1055-61, 2006.

LONGO, D.L.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.L.; JAMESON, J.L.; LOSCALZO, J. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 18th edition. Mc Graw Hill, 2011.

MACHADO, C.R.; CAMARGOS, E.R.; Endothelins role in the control of the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. **Mini Rev Med Chem**. 8(8):820-7, 2008.

MARIJON, E.; OU P.; CELERMAJER, D.S.; FERREIRA, B.; MOCUMBI, A.O.; JANI D., *et al.* Prevalence of Rheumatic Heart Disease Detected by Echocardiographic Screening. **N Engl J Med**. 357:470-6, 2007.

MARRON, K.; YACOUB, M. H.; POLAK, J. M. *et al.* Innervation of human atrioventricular and arterial valves. **Circulation**. 94: 368-375, 1996.

MASAKI, T. Historical Review: Endothelin. **Tren Pharmacol Sci**. 25 (4): 219-24, 2004.

MAYES, M.D. Endothelin and Endothelin Receptor Antagonists in Systemic Rheumatic Disease. **Arthritis and Rheumatism**. Vol.48, (5) May 2003, 1190-9.

MEIRA, Z.M.A; GOULART, E.M.A; MOTA, L.C. Estudo comparativo das avaliações clínica e ecocardiográfica Doppler na evolução das lesões valvares em crianças e adolescentes portadores de febre reumática: **Arq. Bras. Cardiol**. 86(1) São Paulo: 2006.

MEIRELLES, P. G. *et al.* Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos Immunoassays: an alternative for toxigenic fungi detection in foods. v. 27, n. 4, p. 617 – 628, Dezembro 2006.

MENEGHELO, Z.M.; RAMOS, A.I.O. Lesões das valvas cardíacas – diagnóstico e tratamento. 1ª edição. São Paulo: **Atheneu**; 2007.

MERKUS, D.; BRZEZINSKA, A.K.; ZHANG, C.; SAITO, S.; CHILLIAN, W.M.; **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 288: H2088–H2092, 2005.

MILLER, R.C, PELTON, J.T, HUGGINS, J.P - Endothelins - from receptors to medicine. **Trends Pharm Sci**, 1993.

MOLERO, L.; FARRÉ, J.; GARCÍA-MENDEZ, A.; MATEOS-CÁCERES, P.J.; MARTÍN, C.C.; MILLÁS, I. *et al.* Endothelin-1 induced proinflammatory markers in the myocardium and leukocytes of guinea-pigs: Role of glycoprotein IIB/ IIIA receptors. **Cardiovascular Research**. 57: 109–18, 2003.

MOW, T.; PEDERSEN, H.D. Increased endothelin-receptor density in myxomatous canine mitral valve leaflets. **J Cardiovasc Pharmacol**. 34(2):254-60, 1999.

MOURA, E.B. Amplificação dos genes que codificam a endotelina-1 e seus receptores em valvas mitrais reumáticas, 2008. 60p. Dissertação (**Mestrado em Ciências Médicas da Universidade de Brasília**).

MOURA, E.B.; GOMES, M.R.; CORSO, R.B.; FABER, C.N.; CARNEIRO, F.P.; PACHECO, Y.G. Amplification of the Genes that Codify Endothelin-1 and its Receptors in Rheumatic Mitral Valves. **Arq Bras Cardiol**. 95(1): 122-30, 2010.

NOVAIS, C.M.; ALVES, M.P. Pesquisa PCR em tempo real, uma inovação tecnológica em Cadeia da Polimerase (PCR). **Rev. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Ed 3ª – julho/dezembro, 2004.

OLIVEIRA, R.P.S. Mestrado em Genética Molecular. Ano lectivo de 2000/2001, edição 2000-2002. **Biologia Molecular – Expressão génica (RT-PCR)**. Protocolo das sessões práticas. Braga, 2000.

OTTO, C.M.; BONOW, R.O. Valvular Heart Disease. In: LIBBY, P.; BONOW, R.O.; MANN, D.L. *et al.* **Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine**, 8th ed. Elsevier, 2007.

PATIL, D.S.; MEHTA, C.D.; PRAJAPATI, P.A. Morphology of Mitral valve in Human cadavers. **The Internet Journal of Cardiology**. 7 (2), 2009.

PEDERSEN, L. G.; OFFENBERG, H.; MOESGAARD, S. G.; THOMSEN, P.D.; PEDERSEN, H. D.; OLSEN, L. H. Transcription levels of endothelin-1 and endothelin receptors are associated with age and leaflet location in porcine mitral valves. **J Vet Med.** 54: 113-8, 2007.

PERLOFF, J.K; ROBERTS, W.C. The Mitral Apparatus: Functional Anatomy of Mitral Regurgitation. **Circulation.** 1972; 46:227-239.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** 2001 May 1; 29(9): e45.

POLIKEPAHAD, S.; MOORE, R.M.; VENUGOPAL, C.S.; Endothelins and airways—a short review. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol.** 119(1-6): 3-51,2006.

PORTO, C.C. – **Doenças do Coração: prevenção e tratamento**, 2ª ed Guanabara Koogan, RJ, 2005.

PROKOPOWITSCH, A.S.; LOTUFO, P.A. Epidemiologia da febre reumática no século XXI. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.** 15:1-6, 2005.

RAEYMAEKERS, L. A commentary on the practical applications of competitive PCR. **Genome Res.** 5: 91-94, 1995.

RAMIRES F.J.; NUNES V.L.; FERNANDES F. *et al.* Endothelins and myocardial fibrosis. **J Card Fail.** 2003 Jun; 9(3):232-7.

RANGANATHAN, N.; LAM, J. H.; WIGLE, E. D.; SILVER, M. D. Morphology of the human mitral valve, II: the valve leaflets. **Circulation.** 41: 459, 1970.

ROS, M.N.; DULCE, R.A.; PÉREZ, N.G.; DE HURTADO, M.C.C.; CINGOLANI, H.E. Endothelin 1 versus endothelin 3 in the development of the slow force response to myocardial stretch. **Can J Cardiol.** 21 (5):435-8, 2005.

RUSSELL, F. D.; MOLENAAR, P. The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. **Trends Pharmacol Sci.** 21:353–359. 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). Diretrizes Brasileiras para o Diagnóstico, tratamento e prevenção da febre reumática. **Arq Bras Cardiol** 2009; 93(3 supl.4): 1-18

SCHNEIDER, M.R. *et al.* Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth factor-binding proteins. **FASEB J**, v. 14, p. 629-640, 2000.

SCHOEN, F.J.; MITCHEL, R. N. The Heart. In: **Robbins & Cotran Pathologic Basis of the Disease.** 8th Edition. Saunders Elsevier. 2010.

SECKELER, D.M.; HOKE, RT. The worldwide epidemiology of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Clinical Epidemiol.** 2011;(3):67- 84.

SHIMOJO, N. Contributory role of VEGF overexpression in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 293: H474–H481, 2007.

SIMONSON, M.S, WANN, S, MENÉ, P *et al* - Endothelin stimulates phospholipase C, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. **J Clin Invest**, 1989.

SPINA, G.S. Doença Reumática. In: LOPES, A.C. **Tratado de Clínica Médica**, Roca, 2008.

STANDRING, S. (editor). **Gray's Anatomy, 39th Edition: The Anatomical Basis of Clinical Practice**. Churchill Livingstone; 2005.

TAMBURINO, C.; USSIA, G. P. **Percutaneous Treatment of Left Side Cardiac Valves: A Practical Guide for the Interventional Cardiologist**. 1st edition. Milan: Springer-Verlag; 2010.

TAN X, SUN X, GONZALEZ-CRUSSI FX *et al*. PAF and TNF increase the precursor of NF-kappa B p50 mRNA in mouse intestine: quantitative analysis by competitive PCR. **Biochim Biophys Acta**. 1994 Nov 17;1215(1-2):157-62.

VEINOT J.P. Pathology of inflammatory native valvular heart disease. **Cardiovascular Pathology** 2006; 15: 243-51. WALLER, B. F.; HOWARD, J.; FESS, S. Pathology of mitral valve stenosis and pure mitral regurgitation, part II. **Clin Cardiol**. 17: 395, 1994.

WATKINS, D. A. *et al*. Global, Regional, and National Burden of Rheumatic Heart Disease, 1990–2015. **The new england journal of medicine**, [S.L], v. 377, n. 8, p. 713-722, ago. 2017.

WOOD, P. An appreciation of mitral stenosis: part II. **BMJ**, v.1, p. 1113-1124, 1954.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Rheumatic fever and rheumatic heart disease. Geneve: **WHO expert consultation**, 2004. (WHO Technical Report – 923).

WU, S.Y. *et al*. Endothelin-1 is a potent regulator in vivo in vascular calcification and in vitro in calcification of vascular smooth muscle cells. **Peptides** 24 (2003) 1149–56.

YANAGISAWA, M, *et al* - A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelium cells. **Nature**, 1988.

YANAGISAWA, M, MASAKI, T - Molecular biology and biochemistry of the endothelins. **Trends Pharm Sci**, 1990.

### III. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

#### 1. INFORMAÇÕES AOS AUTORES

O *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* (BJCVS) é o órgão oficial de divulgação da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular (SBCCV), trata-se de uma publicação bimestral, com circulação regular desde 1986. A RBCCV/BJCVS está indexada na base de dados Thomson Scientific (ISI), PubMed Central, PubMed/Medline, Redalyc, SciELO SCOPUS (SCImago), LILACS, LATINDEX, ProQuest, EBSCO e Google Scholar

O BJCVS tem como objetivo registrar a produção científica em cirurgia cardiovascular e fomentar o estudo, aperfeiçoamento e atualização dos profissionais da especialidade.

Os trabalhos enviados para publicação no BJCVS devem versar sobre temas relacionados à cirurgia cardiovascular e áreas afins. A revista publica as seguintes categorias de artigos: artigo original, editorial, artigo de revisão, artigo especial, relato de caso, "como-eu-faço", comunicações breves, notas prévias, correlação clínico-cirúrgica, trabalho experimental, multimídia e carta ao editor.

A aceitação será feita baseada na originalidade, significância e contribuição científica. Artigos com objetivos meramente propagandísticos ou comerciais não serão aceitos.

Os autores são responsáveis pelo conteúdo e informações contidas em seus manuscritos. **O BJCVS repudia veementemente o plágio e o autoplágio e manuscritos assim identificados, serão sumariamente excluídos do processo de avaliação.**

Na submissão dos manuscritos, os autores deverão manifestar possível conflito de interesse, além da responsabilização por qualquer violação.

A revista será publicada na íntegra no site da revista ([www.bjcv.org](http://www.bjcv.org)) e da SciELO ([www.scielo.br/rbbcv](http://www.scielo.br/rbbcv)), com links específicos no site da SBCCV ([www.sbccv.org.br](http://www.sbccv.org.br)) e da CTSNET ([www.ctsnet.org](http://www.ctsnet.org)).

##### 1.1. Papéis e responsabilidades dos autores

É obrigatório que cada autor ateste ter participado suficientemente do trabalho para assumir a responsabilidade por uma parcela significativa do conteúdo do manuscrito.

Cada um dos autores deve especificar suas contribuições para o trabalho. O autor correspondente ou que encaminhou o trabalho indicará, durante o processo de submissão, que garante a exatidão e a integridade de todos os dados relatados no manuscrito. Exceto para novos artigos de tecnologia, declarações relativas à responsabilidade científica não aparecem no manuscrito publicado.

O BJCVS recomenda que a autoria se baseie nos quatro critérios descritos a seguir:

- contribuições substanciais para concepção ou desenho da obra; ou aquisição, análise ou interpretação dos dados para o trabalho; E
- elaboração do trabalho ou revisão crítica de importante conteúdo intelectual; E
- aprovação final da versão a ser publicada; E
- consentimento em ser responsável por todos os aspectos do trabalho, garantindo que as questões relacionadas à precisão ou à integridade de qualquer parte do trabalho sejam devidamente investigadas e resolvidas.

**Liberdade de investigação:** declaro que o manuscrito foi elaborado livre e independente de interesses externos no controle do desenho do estudo, na aquisição de dados e na coleta, análise e interpretação dos dados, além de liberdade para divulgar plenamente todos os resultados.

## **2. POLÍTICA EDITORIAL**

O BJCVS adota as Normas de Vancouver - Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, organizadas pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), disponíveis em: [www.icmje.org](http://www.icmje.org).

O BJCVS segue as Recomendações de Condutas do ICMJE

### **2.1. Política de Submissão e Publicação**

Os artigos devem ser submetidos somente em inglês, empregando linguagem fácil e precisa e evitando-se a informalidade da linguagem coloquial. Só serão considerados para avaliação os manuscritos cujos dados não estejam sendo avaliados por outros periódicos e/ou que não tenham sido previamente publicados. Os manuscritos aprovados só poderão ser reproduzidos, no todo ou em parte, com o consentimento expresso do editor do BJCVS.



Mantenha seu cadastro atualizado, pois a comunicação com os autores é exclusivamente por e-mail.

## **2.2. Submissão Eletrônica**

Os manuscritos devem ser, obrigatoriamente, submetidos online no sistema ScholarOne <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbccv-scielo>, acompanhado de carta ao Editor, com a exposição dos motivos pelos quais o BJCVS foi selecionado para a submissão, mencionando, inclusive, as contribuições científicas do manuscrito para o tema versado.

## **2.3. Avaliação pelos Pares (*peer review*)**

Todas as contribuições científicas são revisadas pelo Editor, Editores Associados de Área, Membros do Conselho Editorial e/ou Revisores Convidados, com as seguintes fases:

- Fase 1: Análise inicial pela Assistente Editorial, quanto ao cumprimento das normas estabelecidas nas Instruções aos Autores. Caso o manuscrito não atenda às normas estabelecidas, será devolvido para correção.
- Fase 2: Uma vez adequado às normas da Revista, o manuscrito é direcionado ao Editor Chefe;
- Fase 3: O Editor Chefe avalia a qualidade e o interesse do manuscrito e encaminha para o Editor Associado de Área;
- Fase 4: O Editor Associado de Área avalia o manuscrito e o encaminha a três Revisores;
- Fase 5: Os Revisores emitem seus pareceres diretamente no sistema ScholarOne;
- Fase 6: O Editor Associado, tendo por base os pareceres, toma a decisão editorial (aceitar, revisar ou rejeitar) e envia ao Editor Chefe;
- Fase 7: O Editor Chefe decide sobre a aprovação para publicação ou rejeição, sendo comunicado aos autores;
- Fase 8: Em caso de aceite, o manuscrito entra no processo de editoração para publicação;
- Fase 9: Revisão do inglês: o manuscrito é submetido à revisão do idioma;
- Fase 10: Revisão bibliográfica é realizada pela Assistente Científica, que faz a leitura do manuscrito para validar as referências, verifica a sequência das citações no texto e a correlação com a lista final e padroniza as referências segundo as Normas “Vancouver”.

## 2.4. Pesquisa com Seres Humanos e Animais

Investigação em seres humanos deve ser submetida ao Comitê de Ética da instituição, cumprindo a Declaração de Helsinque de 1975, revisada em 2008 (World Medical Association, disponível em: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/17c.pdf>) e a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466\\_12\\_12\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html).

Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitadas as normas estabelecidas no Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C., Estados Unidos), de 1996, e Diretriz Brasileira para o cuidado e a Utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA), do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, disponível em: [www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br), de 2013.

Os estudos randomizados devem seguir as diretrizes CONSORT (disponível em [www.consort-statement.org/consort-statement](http://www.consort-statement.org/consort-statement)).

O BJCVS apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), reconhecendo a importância dessas iniciativas para o registro e divulgação internacional de informação sobre estudos clínicos, em acesso aberto. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação, os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido um número de identificação em um dos Registros de Ensaios Clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE, cujos endereços estão disponíveis no site do ICMJE (<http://www.icmje.org/>) O número de identificação deverá ser registrado ao final do resumo.

## 2.5. Transferência de Direitos Autorais e Declaração de Conflito de Interesses

Os autores deverão encaminhar, após a aceitação do manuscrito para publicação, a declaração de transferência de direitos autorais (*Copyright*) assinada por todos os autores. Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seu editor. Clique no link para baixar o Copyright <https://goo.gl/l6WwQT>

## 2.6. Abreviações e Terminologia

O uso de abreviaturas deve ser mínimo. Quando expressões extensas precisam ser repetidas, recomenda-se que suas iniciais em maiúsculas as substituam após a primeira menção. Esta deve ser seguida das iniciais entre parênteses. Todas as abreviações em tabelas e figuras devem ser definidas nas respectivas legendas.

O BJCVS adota a Terminologia Anatômica Oficial Universal, aprovada pela Federação Internacional de Associações de Anatomistas (FIAA).

### **3. PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO**

#### **3.1. Seções do Manuscrito**

**Título e Autores.** O título do trabalho, em inglês, deve ser conciso e informativo. Devem ser fornecidos os nomes completos dos autores, titulação e vinculação institucional de cada um deles.

**Resumo (*Abstract*).** Deve ser estruturado em quatro seções: Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusão. Devem ser evitadas abreviações. O número máximo de palavras deve seguir as recomendações da tabela. Nos artigos tipo Relatos de Casos e Como-eu-Faço, o abstract deve ser não-estruturado). As Correlações clínico-cirúrgicas e seções Multimídia dispensam abstract.

**Descritores (*Keywords*).** Também devem ser incluídos de três a cinco descritores. Os descritores podem ser consultados no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br/>, que contém termos em português, espanhol e inglês ou [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh), para termos somente em inglês.

**Corpo do manuscrito.** Os Artigos Originais devem ser divididos nas seguintes seções: Introdução, Método, Resultados, Discussão, Conclusão, Agradecimentos (opcional) e Referências. Os Relatos de Caso devem ser estruturados nas seções: Introdução, Relato do Caso e Discussão; e as Correlações clínico-cirúrgicas em Dados Clínicos, Eletrocardiograma, Radiograma, Ecocardiograma, Diagnóstico e Operação. A seção Multimídia deve apresentar as seguintes seções: Caracterização do Paciente e Descrição da Técnica Empregada. Os Artigos de Revisão e Artigos Especiais podem ser estruturados em seções a critério do autor.

As **Cartas ao Editor**, em princípio, deve comentar, discutir ou criticar artigos publicados no BJCVS, mas também pode versar sobre outros temas de interesse geral. Recomenda-se tamanho máximo de 1000 palavras, incluindo referências, que não devem exceder a cinco, podendo ou não incluir título. Sempre que cabível e possível, uma resposta dos autores do artigo em discussão será publicada junto com a carta.

### **3.2. Referências**

As referências dos documentos impressos e eletrônicos devem ser normatizadas de acordo com o estilo Vancouver, elaborado pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, disponível em: <http://www.icmje.org>). As referências devem ser identificadas, no corpo do texto, com algarismos arábicos, sobrescritas, entre colchetes, obedecendo a ordem de citação no texto. A acurácia das referências é de responsabilidade do autor. Se forem citadas mais de duas referências em sequência, apenas a primeira e a última devem ser digitadas, sendo separadas por um traço (Exemplo: [6-9]). Em caso de citação alternada, todas as referências devem ser digitadas, separadas por vírgula (Exemplo: [6,7,9]). Publicações com até 6 autores, devem ser citados todos os autores; publicações com mais de 6 autores, citam-se os 6 primeiros seguidos da expressão latina “*et al.*”. Títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o List of Journals Indexed for MEDLINE (disponível em: <http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html>).

#### **Modelos de Referências Artigo de Revista**

Issa M, Avezum A, Dantas DC, Almeida AFS, Souza LCB, Sousa AGMR. Fatores de risco pré, intra e pós-operatórios para mortalidade hospitalar em pacientes submetidos à cirurgia de aorta. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2013;28(1):10-21.

#### **Organização como Autor**

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. Hypertension. 2002;40(5):679-86.

### **Sem indicação de autoria**

21st century heart solution may have a sting in the tail. BMJ. 2002;325(7357):184.

### **Artigo publicado eletronicamente antes da versão impressa (“ahead of print”)**

Atluri P, Goldstone AB, Fairman AS, Macarthur JW, Shudo Y, Cohen JE, *et al.* Predicting right ventricular failure in the modern, continuous flow left ventricular assist device era. Ann Thorac Surg. 2013 Jun 21. [Epub ahead of print]

### **Artigo de periódico na Internet**

Machado MN, Nakazone MA, Murad-Junior JA, Maia LN. Surgical treatment for infective endocarditis and hospital mortality in a Brazilian single-center. Rev Bras Cir Cardiovasc [online]. 2013[cited 2013 Jun 25];28(1):29-35. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-763820130001000006&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-763820130001000006&lng=en&nrm=iso)>

### **Capítulo de Livro**

Chai PJ. Intraoperative myocardial protection. In: Mavroudis C, Backer C, eds. Pediatric cardiac surgery. 4th ed. Chichester: Wiley-Blackwell; 2013. p.214-24.

### **Livro**

Cohn LH. Cardiac surgery in the adult. 4th ed. New York: McGraw-Hill;2012. p.1472.

### **Tese**

Dalva M. Estudo do remodelamento ventricular e dos anéis valvares na cardiomiopatia dilatada: avaliação anátomo-patológica [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011. 101p.

## **Legislação**

Conselho Nacional de Saúde. Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996. Dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Bioética. 1996;4(2 Supl):15-25.

Outros exemplos de referências podem ser consultados no site: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

### **3.3. Tabelas e Figuras**

As Tabelas e Figuras devem ser numeradas de acordo com a ordem de aparecimento no texto, conter um título e estar em arquivos separados. As tabelas não devem conter dados redundantes já citados no texto. Devem ser abertas nos lados e com fundo totalmente branco.

As abreviaturas utilizadas nas tabelas devem ser mencionadas em ordem alfabética, no rodapé, com as respectivas formas por extenso. Da mesma forma, as abreviaturas empregadas nas figuras devem ser explicitadas nas legendas.

As figuras somente serão publicadas em cores se o autor concordar em arcar com os custos de impressão das páginas coloridas.

Só serão aceitas imagens nos formatos TIFF ou JPEG, com resolução mínima de acordo com o tipo de imagem, tanto para imagens em preto e branco como para imagens em cores, conforme a Tabela abaixo.

O BJCVS/RBCCV solicita que os autores arquivem em seu poder as imagens originais, pois caso as imagens submetidas on-line apresentem algum impedimento para impressão, entraremos em contato para que nos envie estes originais.

### **3.4. Limites por Tipo de Artigo**

Visando racionalizar o espaço da revista e permitir maior número de artigos por edição, devem ser observados os critérios abaixo delineados por tipo de publicação. A contagem eletrônica de palavras deve incluir a página inicial, resumo, texto, referências e legenda de figuras. Os títulos têm limite de 100 caracteres (contando-se os espaços) para Artigos Originais, Artigos de Revisão e Atualização. Os títulos com necessidade de serem mais extensos deverão ser submetidos à aprovação do Editor Chefe.

**Tabela 1.** Limites por tipo de artigo

|                                       | Artigo Original | Editorial      | Artigo de Revisão | Avaliação de Novas Tecnologias | Relato de Caso | Cartas ao Editor | Correlação Clínico-Cirúrgica |
|---------------------------------------|-----------------|----------------|-------------------|--------------------------------|----------------|------------------|------------------------------|
| Resumo –<br>Número máximo de palavras | 250             | -----          | 100               | 250                            | 100            | -----            | -----                        |
| Número máximo de palavras             | 5.000           | 1.000          | 6.500             | 5.000                          | 1.500          | 400              | 800                          |
| Número máximo de referências          | 25              | 10             | 75                | 25                             | 6              | 6                | 10                           |
| Número máximo de figuras e tabelas    | 8               | 2              | 8                 | 8                              | 2              | 1                | 2                            |
| Título resumido                       | 100 caracteres  | 100 caracteres | 100 caracteres    | 100 caracteres                 | 40 caracteres  | -----            | 40 caracteres                |

## **IV. ARTIGO ORIGINAL**

### **INTERLEUCINA-10 E ENDOTELINA-1 COMO BIOMARCADORES DE DOENÇA VALVAR REUMÁTICA**

### **INTERLEUKIN-10 AND ENDOTHELIN-1 AS BIOMARKERS OF RHEUMATIC VALVE DISEASE**

João Paulo Andrade Fonseca<sup>1</sup>, Sydney Correia Leão<sup>2</sup>, Maria Regina Menezes Lima<sup>3</sup>, Hertaline Menezes do Nascimento Rocha<sup>4</sup>, Tania Maria de Andrade Rodrigues<sup>5</sup>

Palavras-chave: Interleucina-10. Perfil imunológico. Doença cardíaca reumática crônica. Endotelina-1. Estenose da valva mitral.

Keywords: Interleukin-10. Immunological profile. Chronic rheumatic heart disease. Endothelin-1. Mitral valve stenosis.

1 Graduando em Medicina pela Universidade Federal de Sergipe (UFS). Pesquisador Associado ao Grupo de Anatomia Molecular, UFS.

2 Graduado em Medicina pela UFS. Patologista pela Universidade Federal de São Paulo. Pesquisador Associado ao Grupo de Anatomia Molecular, UFS.

3 Graduada em Enfermagem e Mestre em Biologia Parasitária pela UFS.

4 Graduada em Enfermagem e Mestre em Biologia Parasitária pela UFS.

5 MD, MSc, PhD, FIACS. Professora Titular do Departamento de Morfologia da UFS. Diretora-presidente do Grupo de Anatomia Molecular, UFS.



## RESUMO

### INTERLEUCINA-10 E ENDOTELINA-1 COMO BIOMARCADORES DE DOENÇA VALVAR REUMÁTICA

**Objetivo:** Avaliar o perfil imunológico e a expressão gênica de endotelina-1 em valvas mitrais de pacientes com febre reumática, originados de um serviço de referência em cirurgia cardiovascular.

**Métodos:** Este foi um estudo quantitativo, observacional e transversal. Trinta e cinco indivíduos (divididos em quatro grupos) participaram do estudo, 25 deles com doença cardíaca reumática crônica, além de 10 controles. A média de idade da amostra estudada foi de 34,5 anos. Dezesete (48,58%) dos indivíduos eram homens, e 18 (51,42%) eram mulheres. Mediu-se a citocina infamatória IL-10 e foram coletadas 10 valvas mitrais de pacientes que se submeteram a primeira troca valvar para determinação da expressão gênica de endotelina-1 pelo PCR real-time.

**Resultados:** Entre os grupos estudados (pacientes e controles), observou-se diferença estatisticamente significante em relação aos níveis de IL-10 ( $p=0,002$ ). Em relação à endotelina-1, foi observada sua expressão em 70% das amostras. Quantitativamente, a expressão média de endotelina-1 foi de  $62,85 \pm 25,63\%$ .

**Conclusão:** A citocina inflamatória IL-10 participa da manutenção da cronicidade da febre reumática em pacientes que se submeteram a troca valvar e naqueles que estão em tratamento médico. A expressão de endotelina-1 nas lesões em valvas cardíacas de pacientes que foram submetidos à troca valvar mitral confirma sua relação com a atividade inflamatória na febre reumática.

## **ABSTRACT**

### **INTERLEUKIN-10 AND ENDOTHELIN-1 AS BIOMARKERS OF RHEUMATIC VALVE DISEASE**

**Objective:** To evaluate the immunological profile and gene expression of endothelin-1 (ET-1) in mitral valves of patients with rheumatic fever originated from a reference service in cardiovascular surgery.

**Methods:** This was a quantitative, observational and cross-sectional study. Thirty-five subjects (divided into four groups) participated in the study, 25 patients with chronic rheumatic heart disease and ten control subjects. The mean age of the sample studied was 34.5 years. Seventeen of them (48.58%) were male and 18 (51.42%) were female. Inflammatory cytokine IL-10 was measured and ten mitral valves of patients who underwent first valve replacement were collected for determination of gene expression of endothelin-1 by real time PCR.

**Results:** Among the groups studied (patients vs. controls), there was a statistically significant difference in IL-10 levels ( $p=0.002$ ). Expression of endothelin-1 was observed in 70% of samples. Quantitatively, average of ET-1 expression was  $62.85 \pm 25.63\%$ .

**Conclusion:** Inflammatory cytokine IL-10 participates in the maintenance of chronicity of rheumatic fever in patients who underwent valve replacement and those who are undergoing medical treatment. The expression of endothelin-1 in heart valve lesions in patients undergoing mitral valve replacement confirms its association with inflammatory activity in rheumatic fever.

## 1 – INTRODUÇÃO

A Febre Reumática (FR) constitui um grave problema de saúde pública. É uma doença reumática e inflamatória, de origem autoimune, que se dá em resposta às infecções por estreptococos do Grupo A (*Streptococcus pyogenes*). Em escala global, este agente é responsável, anualmente, por aproximadamente 15,6 milhões de casos de cardiopatia reumática, com 282 mil novos casos e 233 mil mortes a cada ano. Sob essa perspectiva, os sistemas de saúde apresentam elevados gastos com exames, cirurgias e frequentes hospitalizações frequentes devido à insuficiência cardíaca congestiva [1-4].

A patogênese da FR envolve uma rede complexa de interações genéticas, ambientais e imunológicas. Fatores genéticos predis põem indivíduos ao desenvolvimento de reações autoimunes [5]. Citocinas são moléculas proteicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Estudos apontam que a resposta inflamatória da FR aguda no tecido cardíaco é gerada pelo mimetismo da proteína antigênica M levando a um infiltrado abundante de células T CD4+ [5-7]. Isso leva à produção de IL-10, que influencia de forma decisiva na resposta imune dos pacientes com febre reumática [8-12].

A endotelina é um peptídeo vasoconstrictor muito potente. Este peptídeo é composto por 21 aminoácidos e apresenta três isoformas. As três formas foram denominadas de endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3) [13,14]. A endotelina-1 é o subtipo predominantemente produzido pelo endotélio cardíaco. Alguns estudos evidenciam expressão do gene da endotelina em valvas cardíacas de pacientes submetidos à troca valvar cirúrgica [15,16].

O acometimento cardíaco na FR aguda caracteriza-se na mais grave e mais importante de todas as manifestações da doença, tendo em vista a possibilidade de evolução para a doença valvar reumática crônica ou para o óbito. A valvopatia mitral reumática mais comum é a dupla disfunção não balanceada, ou seja, insuficiência e estenose em diferentes estágios de evolução que podem levar a indicação de reparo ou troca cirúrgica da valva lesada em crianças e jovens em idade produtiva [17,18].

O objetivo deste estudo foi comparar os níveis de IL-10 entre diferentes pacientes com FR. Além disso, buscamos avaliar a expressão gênica de endotelina-1 em valvas mitrais nativas substituídas.

## 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Um estudo quantitativo, de campo, observacional e transversal foi realizado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Sergipe (CAAE 2344.0.000.107.10) e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos participantes. Foram coletados dados sócio-epidemiológicos e sangue venoso periférico de 35 indivíduos, 25 pacientes portadores de FR e cardiopatia reumática crônica (CRC), e 10 controles. Os diferentes grupos de pacientes com FR foram divididos da seguinte forma: G1 (dez pacientes com FR / CRC submetidos à primeira substituição valvar); G2 (cinco pacientes com CRC submetidos à segunda substituição valvar); G3 (dez pacientes com FR em tratamento clínico e acompanhamento médico regular, sem indicação de substituição valvar). O grupo de controle (G4) consistiu em indivíduos saudáveis sem evidência de qualquer doença autoimune e que não usavam antibióticos no momento da coleta de dados. Os critérios de exclusão foram adultos maiores de 65 anos, mulheres grávidas e pacientes com doença autoimune. Todos os participantes responderam a um questionário clínico e sócio-epidemiológico.

O tamanho da amostra foi determinado a partir da quantidade de cirurgias realizadas no local onde esta pesquisa foi conduzida: 107 trocas valvares cirúrgicas em 2009 (75 trocas de valvas nativas e 32 segundas trocas valvares). Usando um nível de confiança de 95% e um nível de heterogeneidade de 99%, chegamos a 13 pacientes para o primeiro grupo e 11 para o segundo grupo. Houve dificuldades relacionadas à composição do grupo 2 (segunda substituição valvar) devido à progressão natural da doença (morte antes da segunda substituição valvar).

### **Perfil Epidemiológico**

Do total de indivíduos, 17 (48,57%) eram do sexo masculino e 18 (51,43%) eram do sexo feminino. Dos 25 pacientes com FR / CRC, 13 (52%) eram do sexo feminino e 12 (48%) eram do sexo masculino. A idade média foi de  $34,5 \pm 2,56$  anos. Entre os diferentes grupos, G1 teve uma idade média de  $43,7 \pm 0,85$  anos, G2 teve uma idade média de  $40 \pm 8,91$  anos e a média de idade de pacientes com FR / CRC sem indicação de substituição cirúrgica (G3) foi de  $33,70 \pm 2,56$  anos. O grupo controle (G4) teve uma idade média de  $21,6 \pm 0,52$  anos ( $P = 0,0005$ ).

Quanto à frequência dos sintomas, a dispneia foi o sintoma mais prevalente (68%), seguido de dor torácica (16%), palpitações (8%) e edema de membros inferiores (8%).

Os dados ecocardiográficos evidenciaram acometimento da valva mitral em 64% dos pacientes, seguido da lesão dupla aórtica e mitral em 24% dos pacientes. Não houve envolvimento das valvas pulmonares e tricúspides. Em relação ao tipo de acometimento valvar, observamos refluxo em 80% da amostra, seguido por estenose (68%), calcificação (40%) e prolapso das cordas tendíneas (4%).

### **Determinação da expressão gênica de endotelina-1 pelo PCR em tempo real**

Foram coletadas dez valvas mitrales de pacientes submetidos à primeira cirurgia de substituição valvar (G1). Estas valvas foram armazenadas em solução de estabilização de RNA a -20°C. Para a extração do RNA total das valvas, utilizamos 30-40 µg de tecido valvar, macerado manualmente na presença de nitrogênio líquido, de acordo com o protocolo recomendado pelo Mini Kit RNeasy Fibrous (QIAGEN®). O RNA total foi quantificado por espectrofotometria em Nanodrop® (Thermo Scientific™). A quantificação foi realizada em duplicata, obtendo-se a concentração média de RNA em ng/µL. Os valores de absorbância obtidos foram analisados de acordo com a seguinte fórmula:  $[\text{RNA } (\mu\text{g/ml})] = 40 \times A_{260} \times \text{diluição} / 1000$  (Maniatis). A pureza foi avaliada pela razão de valores de absorbância obtidos a 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), e as amostras com valores entre 1,8 e 2,0 foram consideradas viáveis. O cDNA das valvas foi obtido através da reação de transcriptase reversa (TR). Para obter o cDNA, utilizamos 38,4 a 82,5 ng de RNA total de cada amostra de acordo com o protocolo recomendado pelo QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN®). Os cDNAs foram quantificados em Nanodrop® (Thermo Scientific™).

O controle cDNA 1 (CT1) foi utilizado para gerar uma curva de calibração para a eficiência dos iniciadores de ET1 e GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase). A amostra de cDNA sofreu diluições de 5x e 10x, e as reações de PCR em tempo real foram subsequentemente realizadas utilizando-se os iniciadores para ET-1 e GAPDH. Ao utilizarmos os resultados da inclinação e o número de ciclos necessários para aumentar em 10x a quantidade de moléculas, podemos calcular a eficiência das reações para ambos os iniciadores com a fórmula:  $\text{eficiência} = 10^{-1 / \text{inclinação}} - 1$ . A expressão do mRNA dos genes alvo dos iniciadores de ET-1 e GAPDH foi quantificada com PCR em tempo real utilizando-se o QuantiTect Primer Assay 10x (QIAGEN®). Realizaram-se reações com 15 µl do kit de PCR QuantiFast SYBR Green (Qiagen®). Depois disso, uma curva de dissociação foi executada para verificar a especificidade de cada par de iniciadores.

Os dados de PCR em tempo real foram tabulados e analisados pelo sistema CFX96 Real Time System (BIORAD®) e os cálculos da expressão relativa foram realizados pelo método Delta Ct (Pfaffl, 2001) [19], de acordo com a fórmula:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{t target (control-treated)}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{t ref (control-treated)}}}}$$

### **Citocina IL-10**

Coletamos 10 ml de sangue periférico, que foi centrifugado e armazenado a -80°C, para dosagem de IL-10 através de ensaios imunoenzimáticos ELISA sanduíche (eBioscience). As medições dessas citocinas seguiram as instruções fornecidas pelo fabricante. Fontes de poliestireno distribuídos em tiras foram utilizados na adsorção de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina (100 µL / fonte) na concentração apropriada. Este passo para a sensibilização foi realizado durante a noite a 4°C e completado após cinco lavagens das fontes com a solução de lavagem fornecida pelo fabricante. Posteriormente, o bloqueio de sítios livres residuais foi feito com 200 µL / fonte de diluente durante uma hora à temperatura ambiente. As fontes foram novamente lavadas cinco vezes e depois incubadas durante a noite a 4°C com 100 µL / fonte com padrões e amostras correspondentes a cada citocina.

Um novo ciclo de lavagem foi realizado, seguido da adição de 100 µL / fonte de anticorpo conjugado com biotina para detecção e incubação durante uma hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as fontes foram incubadas com 100 µL / fonte de conjugado formado por estreptavidina marcada com peroxidase durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após uma nova rodada de lavagens, as reações foram desenvolvidas com 100 µL / fonte de substrato (solução de tetrametilbenzidina contendo peróxido de hidrogênio) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Depois de parar a reação com 2N de HCl, a absorvância foi lida a 450 nm-570 nm em um leitor do ELISA. As concentrações de citocinas foram determinadas no soro em pg/ml, utilizando as curvas padrões previamente estabelecidas com quantidades conhecidas de citocinas.

### **Análises estatísticas**

Para a distribuição das variáveis contínuas, utilizamos os testes de D'Agostino, Pearson e Kruskal-Wallis. Consideramos estatisticamente significativos os resultados das

análises com  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas através do Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., EUA).

### 3 – RESULTADOS

#### Determinação da expressão gênica de endotelina-1 pelo PCR em tempo real

A quantidade média de RNA nas amostras foi de  $65,75 \pm 19,72$  ng/ul (Tabela 1). As concentrações médias de ácido nucleico (RNA total) e cDNA foram de  $20,60 \pm 26,84$  ng/ul e  $615,31 \pm 77,20$  ng/ul, respectivamente (Tabela 1). Os valores médios de absorbância a 260 nm e 280 nm foram de  $0,51 \pm 0,66$  UA (A260) e  $0,25 \pm 0,31$  UA (A280), respectivamente. A relação A260 / A280 foi de  $1,79 \pm 0,26$  (Tabela 1).

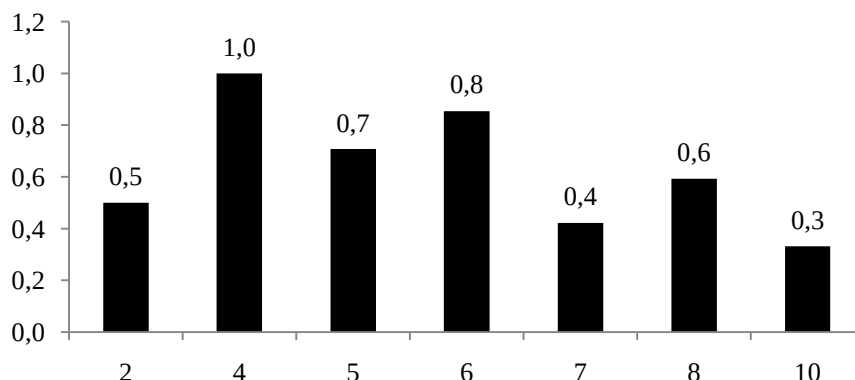
Nas reações de PCR em tempo real, observou-se que a inclinação para ET-1 apareceu em -3,272 ( $R^2 = 0,944$ ), resultando em uma eficiência de 102,1%; e a inclinação do GAPDH estava em -3,286 ( $R^2 = 0,996$ ), resultando em uma eficiência de 101,5%. De acordo com esses cálculos, as reações com ambos os iniciadores têm eficiência adequada. Depois de gerar a curva de calibração e calcular a eficiência das reações, traçaram-se curvas de dissociação para ambos os iniciadores, mostrando que ambos possuem especificidade.

Com base no protocolo padronizado para a curva de calibração, realizamos amplificações para as reações com os iniciadores de ET-1 e GAPDH. Observamos a expressão de ET-1 em sete das dez amostras coletadas. Quantitativamente, a expressão média do gene em relação à ET-1 foi de  $62,85 \pm 25,63\%$  (Figura 1).

**Tabela 1.** Quantificação do RNA total, cDNA e espectrofotometria a partir de valvas cardíacas

| Amostras        | Conc. Média<br>Ácido Nucleico<br>(ng/ml) | cDNA total         | A260             | A280             | A260/A280         |
|-----------------|------------------------------------------|--------------------|------------------|------------------|-------------------|
| GAM01           | 7,5                                      | 724,8              | 0,178            | 0,097            | 1,835             |
| GAM02           | 66                                       | 659,3              | 1,686            | 0,82             | 2,056             |
| GAM03           | 4,5                                      | 573,9              | 0,123            | 0,087            | 1,413             |
| GAM04           | 75                                       | 565,4              | 1,805            | 0,878            | 2,055             |
| GAM05           | 18                                       | 594                | 0,435            | 0,212            | 2,051             |
| GAM06           | 11                                       | 760,5              | 0,253            | 0,139            | 1,82              |
| GAM07           | 3,2                                      | 617                | 0,076            | 0,05             | 1,52              |
| GAM08           | 3,3                                      | 547,1              | 0,111            | 0,072            | 1,54              |
| GAM09           | 3,5                                      | 588,6              | 0,115            | 0,072            | 1,597             |
| GAM10           | 14                                       | 522,5              | 0,349            | 0,167            | 2,089             |
| <b>Média</b>    | <b>20,6</b>                              | <b>615,31</b>      | <b>0,5131</b>    | <b>0,2594</b>    | <b>1,7976</b>     |
| <b>Desv Pad</b> | <b>26,84995345</b>                       | <b>77,20521643</b> | <b>0,6600568</b> | <b>0,3148898</b> | <b>0,26153997</b> |

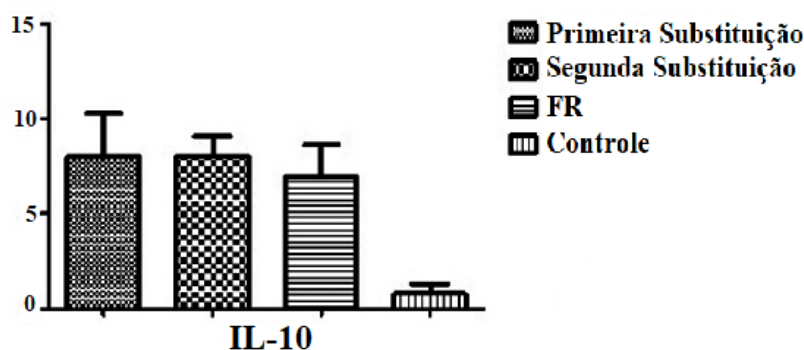
**Figura 1.** Gráfico mostrando a expressão relativa de endotelina (ET-1) nas amostras de valvas cardíacas 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 10.



### Citocina IL-10

Os pacientes submetidos à primeira (G1) e à segunda substituição valvar (G2) apresentaram uma concentração média da citocina IL-10 de  $7,30 \pm 8$  pg/ml e  $8,07 \pm 2,26$  pg/ml, respectivamente, enquanto nos pacientes com FR (G3) e no grupo controle, os valores foram de  $6,97 \pm 1,68$  pg/ml e  $0,77 \pm 1,68$  pg/ml ( $p = 0,002$ ), respectivamente (Figura 2).

**Figura 2.** Gráfico mostrando a expressão média da citocina IL-10 (Interleucina-10).



## 4 – DISCUSSÃO

A partir dos resultados apresentados, viu-se que os níveis séricos de IL-10 mostraram-se reduzidos quando comparados a um estudo anterior [20]. Ao analisarmos o grupo de pacientes com FR / CRC (em comparação ao grupo controle), identificamos níveis séricos elevados de IL-10.

Houve níveis mais elevados de IL-10 em pacientes que substituíram a valva mitral nativa e nos pacientes com FR sem tratamento cirúrgico. Seus níveis foram diminuídos no



grupo controle, conforme esperado. Uma vez que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, os resultados mostram que a resposta imune, para controlar o processo inflamatório, desencadeia lesões valvares [12].

Situando a endotelina-1 na febre reumática, vários estudos relataram altos níveis séricos deste peptídeo em pacientes com doença reumática, associada à mitogênese, fibrose e atividade inflamatória [14]. Chen *et al.* [21] relataram aumento dos níveis séricos de endotelina-1 em pacientes com estenose mitral reumática. No nosso estudo, há expressão gênica de endotelina-1 em valvas cardíacas danificadas de pacientes submetidos à substituição valvar mitral, semelhante ao observado em outras amostras da população brasileira. Nesse sentido, Moura *et al.* [1] descobriram que 40,7% das valvas mitrais (fibrosadas e estenosadas) substituídas em pacientes com FR apresentaram expressão gênica de ET-1 e, em nosso estudo anterior [22], observamos a expressão de ambos os receptores de endotelina (ETrA e ETrB) em valvas mitrais reumáticas substituídas.

## **5 – CONCLUSÃO**

Concluimos que a citocina inflamatória IL-10 participa na manutenção do processo de cronicidade da FR em pacientes submetidos à troca valvar e naqueles que estão em tratamento médico. Além disso, a presença de expressão gênica de endotelina-1 foi observada na maioria dos fragmentos valvares estudados.

## 6 – REFERÊNCIAS

1. Moura EB, Gomes MR, Corso RB, Faber CN, Carneiro FP, Pacheco YG. Amplification of the genes that codify endothelin-1 and its receptors in rheumatic mitral valves. *Arq Bras Cardiol.* 2010; 95(1):122-30.
2. Seckeler DM, Hoke TR. The worldwide epidemiology of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Clin Epidemiol.* 2011; 3:67-84.
3. Meneghelo ZM, Ramos AIO. Lesões das valvas cardíacas: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Atheneu; 2007.
4. Barbosa PJB, Muller RE, Latado AL, Achutti AC, Ramos AIO, Weksler C, *et al.* Diretrizes brasileiras para diagnóstico, tratamento e prevenção da febre reumática da Sociedade Brasileira de Cardiologia, da Sociedade Brasileira de Pediatria e da Sociedade Brasileira de Reumatologia. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(3 supl.4):1-18.
5. Guilherme L, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease. *J Clin Immunol.* 2010;30(1):17-23.
6. Guilherme L, Köhler KF, Postol E, Kalil J. Genes, autoimmunity and pathogenesis of rheumatic heart disease. *Ann Pediatr Cardiol.* 2011;4(1):13-21.
7. Varella PPV, Forte WCN. Citokines: a review. *Rev Bras Immunopatol.* 2005;24(4):146-54.
8. Artola RT, Mihos CG, Santana O. The immunology of mitral valve stenosis. *Dovepress.* 2011;(3):1-8.
9. Guilherme L, Ramasawmy R, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: genetics and pathogenesis. *Scand J Immunol.* 2007;66(2-3):199-207.
10. Guilherme L, Faé KC, Kalil J. Rheumatic heart disease: molecular basis of autoimmune reactions leading to valvular lesions. New York: Springer Science Business Media; 2005. p.115-25.
11. Spina GS. Rheumatic disease: neglected but still present and deadly. *Rev Med São Paulo.* 2008;87(2):128-41.
12. Chang C. Cutting edge issues in rheumatic fever. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012;42(2):213-37.
13. Brás-Silva C, Leite-Moreira AF. Efeitos miocárdicos da endotelina-1. *Rev Port Cardiol.* 2008;27(7-8):925-51.
14. Mayes MD. Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum.* 2003;48(5):1190-9.
15. Porto CC. Doenças do coração: prevenção e tratamento. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

16. Veinot JP. Pathology of inflammatory native valvular heart disease. *Cardiovasc Pathol*. 2006;15(5):243-51.
17. Terreri MTRA, Caldas AM, Len CA, Ultchak F, Hilário MOE. Características clínicas e demográficas de 193 pacientes com febre reumática. *Rev Bras Reumatol*. 2006;46(6): 385-90.
18. Tarasoutchi F, Montera MW, Grinberg M, Barbosa MR, Piñeiro DJ, Sánchez CRM, *et al*. Diretriz Brasileira de Valvopatias – SBC 2011- I Diretriz Interamericana de Valvopatias - SIAC 2011. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(5 supl. 1):1-67.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45
20. Yeğin O, Coşkun M, Ertuğ H. Cytokines in acute rheumatic fever. *Eur J Pediatr*. 1997;156(1):25-9.
21. Chen MC, Wu CJ, Yip HK, Chang HW, Chen CJ, Yu TH, *et al*. Increased circulating endothelin-1 in rheumatic mitral stenosis: irrelevance to left atrial and pulmonary artery pressures. *Chest*. 2004;125(2):390-6.
22. Leão SC, Souto FM, Costa RV, Rocha TF, Pacheco YG, Rodrigues TM. Gene expression of endothelin receptors in replaced rheumatic mitral stenotic valves. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2012;27(4):512-9.
23. Patel JN, Jager A, Schalkwijk C, Corder R, Douthwaite JA, Yudkin JS, *et al*. Effects of tumour necrosis factor-alpha in the human forearm: blood flow and endothelin-1 release. *Clin Sci*. 2002;103(4):409-15.
24. Wagner EM. TNF-alpha induced bronchial vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(3):H946-51.