

## Arquivos Brasileiros de Cardiologia



Todo o conteúdo deste periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons. Fonte:

[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2010001100018&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2010001100018&lng=pt&nrm=iso&tlng=en). Acesso em: 04 dez. 2020.

## REFERÊNCIA

MOURA, Edmilson Bastos de et al. Amplificação dos genes que codificam a endotelina-1 e seus receptores em valvas mitrais reumáticas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 95, n. 1, p. 122-130, jul. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010005000059>. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2010001100018&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2010001100018&lng=pt&nrm=iso). Acesso em: 04 dez. 2020.

## [Arquivos Brasileiros de Cardiologia](#)

versão impressa ISSN 0066-782X

Arq. Bras. Cardiol. vol.95 no.1 São Paulo jul. 2010 Epub 11-Jun-2010

<https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010005000059>

### ARTIGO ORIGINAL VALVOPATIAS

# Amplificação dos genes que codificam a endotelina-1 e seus receptores em valvas mitraes reumáticas

Edmilson Bastos de Moura; Mariana Ribeiro Gomes; Ricardo Barros Corso; Cristiano Nicolletti Faber; Fabiana Pirani Carneiro; Yolanda Galindo Pacheco

Universidade de Brasília, Instituto do Coração DF, Hospital de Base DF, Brasília, DF - Brasil

[Correspondência](#)

#### Serviços Personalizados

##### Journal

-  SciELO Analytics
-  Google Scholar H5M5 (2020)

##### Artigo

-  texto em Inglês | Espanhol
-  Inglês (pdf) | Espanhol (pdf)
-  Artigo em XML
-  Como citar este artigo
-  SciELO Analytics
-  Curriculum ScienTI
-  Tradução automática

##### Indicadores

##### Links relacionados

##### Compartilhar

 Mais

Mais

 Permalink

## RESUMO

**FUNDAMENTO:** As cardiopatias são doenças de alta prevalência, sendo a cardiopatia reumática uma doença de grande relevância em países em desenvolvimento. As alterações em câmaras cardíacas esquerdas se associam à disfunção endotelial, com aumento dos níveis de endotelina-1 (ET-1) e consequências sobre a circulação pulmonar, muitas vezes determinando a hipertensão pulmonar (HP). No entanto, a presença de ET-1 e seus receptores na própria valva mitral, promovendo alterações vasculares pulmonares e aumentando a deformação valvar reumática, ainda é um assunto não abordado na literatura.

**OBJETIVO:** Determinar, mediante técnicas moleculares, a expressão dos genes da endotelina e dos seus receptores em valvas mitraes reumáticas.

**MÉTODOS:** 27 pacientes submetidos à troca valvar mitral tiveram seu tecido valvar analisado, a fim de determinar a presença de genes de ET-1 e seus receptores A e B. Foram feitas análises histológica e molecular das valvas (divididas em fragmentos M1, M2 e M3) e colhidos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. Foram divididos em três grupos: valvopatia mitral, mitroaórtica e pacientes reoperados.

**RESULTADOS:** O estudo mostrou a manifestação do gene da ET-1 em 40,7% dos espécimes e de seu receptor A em todas as amostras, com manifestação minoritária do gene do receptor B (22,2%).

**CONCLUSÃO:** Todos os pacientes expressaram a presença do gene do receptor A. Não houve diferença estatística quanto à gravidade da doença, expressa em classe funcional, e aos subgrupos estudados (valvopatas mitraes,

mitroaórticos e pacientes reoperados), ou quanto à expressão dos genes da ET-1 e seus receptores entre os subgrupos estudados (valvopatas mitrais, mitroaórticos e pacientes reoperados).

**Palavras-chave:** Miocardite, cardiomiopatias, doenças reumáticas, endotélio, infecção, febre reumática.

---

## Introdução

Febre reumática (FR) é uma doença reumática, inflamatória, de origem autoimune e recidivante, como resposta do organismo a infecções pelo estreptococo (*Streptococcus pyogenes*) do grupo A de Lancefield. Existem cepas ditas reumatogênicas, o que se deve à virulência diferenciada desse subgrupo, rico em proteína M e ácido hialurônico na sua cápsula, determinando propriedades antifagocíticas<sup>1</sup>. Quando submetidas à análise de sua espessura média, as valvas reumáticas apresentam medidas superiores e uma quantidade acentuada de músculo e colágeno. Com o avançar da idade, há o aumento de espessura, sem alteração significativa da composição valvar<sup>2</sup>.

A endotelina, substância com forte potência vasoconstritora (dez vezes mais potente que a angiotensina II), foi descrita por Yanagisawa em 1988<sup>3</sup>. Sua importância e a de seus receptores na patogênese de diversas doenças - em especial aquelas em que a vasoconstrição e a proliferação celular excessivas estão envolvidas - tem sido objeto de intensa pesquisa. Além disso, são importantes reguladoras da deposição de colágeno e matriz extracelular<sup>4</sup>. Também exercem múltiplos efeitos biológicos, através de seus receptores A e B, e suas concentrações tissulares refletem com maior precisão a ativação do sistema das endotelinas<sup>4</sup>. Em algumas doenças<sup>5</sup>, a endotelina-1 (ET-1) pode representar a ligação entre alterações vasculares e o metabolismo acelerado do colágeno associado ao processo fibrótico. Estimulada por forças de fricção, a síntese e a expressão de ET-1 ficam aumentadas. Esse fator físico, encontrado em disfunções valvares onde a coaptação entre os folhetos é deficiente - e pode se fazer mediante maior atrito - associa-se a outros fatores, químicos e endógenos, determinando alterações na composição tecidual. No entanto, estudos continuam a ser conduzidos no sentido de demonstrar essa correlação entre os efeitos vasoconstritores e a fibrose tissular<sup>5</sup>. É possível que esse mecanismo patológico venha a se mostrar relevante na valvopatia reumática, associando níveis aumentados de ET-1, encontrados na doença, às deformidades valvares.

Uma variedade de doenças cardiovasculares tem a participação de ET-1 em sua patogênese. Considerando-se tudo o que foi discutido nos trechos acima, podemos esperar aplicações terapêuticas dos antagonistas dos receptores de ET-1<sup>5</sup>. Através deles, as ações do sistema de endotelinas podem ser revertidas, traduzindo-se em benefício clínico para muitos pacientes.

## Métodos

Foram coletadas 27 amostras de valvas junto a serviços de cirurgia cardiovascular (Instituto do Coração do Distrito Federal/InCor-DF e Hospital de Base do Distrito Federal), posteriormente submetidas à análise histológica e molecular. Os pacientes, adultos e de ambos os sexos, foram escolhidos dentre aqueles admitidos com doença mitral reumática e indicação para substituição cirúrgica da valva nativa por prótese.

- Foram considerados critérios de inclusão no estudo:
- Portadores de valvopatia mitral de características reumáticas ao ecocardiograma;
- Portadores de doença mitral isolada ou em associação à outra valvopatia (aórtica, tricúspide);
- Indicação de intervenção cirúrgica por critérios preestabelecidos nas unidades de cirurgia cardiovascular escolhidas, sem indicação de valvotomia percutânea ou reparo valvar (comissurotomia/valvoplastia mitral):

## Estenose

- Moderada ou grave (área valvar mitral  $\leq 1,5 \text{ cm}^2$ ) e classificação funcional III ou IV (*New York Heart Association* - NYHA), não candidatos à valvotomia percutânea ou reparo valvar.

## Insuficiência

- Pacientes sintomáticos (NYHA II, III e IV) com função ventricular esquerda normal (fração de ejeção  $> 60\%$  e diâmetro endossistólico de ventrículo esquerdo  $< 45 \text{ mm}$ );
- Pacientes assintomáticos ou sintomáticos, com disfunção leve de ventrículo esquerdo (fração de ejeção  $50$  a  $60\%$  e diâmetro endossistólico de ventrículo esquerdo  $45$  a  $50 \text{ mm}$ );

- Pacientes assintomáticos ou sintomáticos, com disfunção moderada de ventrículo esquerdo (fração de ejeção 30 a 50% e diâmetro endossistólico de ventrículo esquerdo 50 a 55 mm);
- Reoperação valvar mitral, desde que o tecido valvar mitral fosse ainda o nativo (ou seja, quando a primeira cirurgia foi de reparo valvar - comissurotomia/valvoplastia mitral);
- Anuência do paciente ou representante legal em participar do estudo (através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE).

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Pacientes candidatos à valvotomia percutânea ou cirurgia para reparo valvar;
- Pacientes portadores de outras doenças cardiovasculares que tivessem indicação cirúrgica. São exemplos a doença coronariana obstrutiva, aneurismas de ventrículo esquerdo e anomalias cardíacas congênitas cianóticas ou acianóticas;
- Reoperação em pacientes já submetidos a troca valvar mitral (ausência de tecido valvar mitral nativo);
- Não concordância do paciente ou representante legal em participar do estudo.

Esses pacientes foram internados e submetidos aos exames pré-operatórios de rotina em cada instituição. Previamente informados e consultados a respeito de seu consentimento em participar do estudo, preencheram e concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE. Dados pessoais e epidemiológicos dos pacientes foram colhidos, bem como algumas informações a respeito da sintomatologia e da classificação funcional (NYHA) e dados ecocardiográficos (valvopatia mitral predominante, estimativa de área valvar, estimativa de pressão sistólica pulmonar, área do orifício regurgitante efetivo, volume regurgitante). O protocolo do estudo foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB).

Imediatamente após a sua retirada, o segmento da valva obtido era fragmentado, obedecendo o seguinte: considerando toda a extensão do fragmento retirado, sempre havia tecido valvar da extremidade livre até próximo ao anel mitral. Esse tecido valvar era, então, separado em três segmentos, grosseiramente iguais em tamanho, nomeados M1, M2 e M3 - o primeiro próximo do anel mitral, o terceiro na extremidade, em contato com a cordoalha tendínea, e o segundo na região intermediária. Tal divisão pretendia a diferenciação em regiões que são, macroscopicamente, distintas quanto ao seu acometimento pela doença reumática.

## **Histologia**

Todas as valvas retiradas e fragmentadas foram fixadas em solução de formalina neutra 10% (pH 7,0), sendo posteriormente submetidas à descalcificação, inclusão em parafina e corte de 4 µm de espessura no micrótomo. A coloração foi obtida pela técnica de hematoxilina-eosina. Cada segmento foi analisado quanto à presença de fibrose, calcificação, ossificação, neoformação vascular e infiltrado mononuclear.

## **Extração RNA total**

A extração do RNA total das 27 amostras foi realizada por meio da utilização do reagente Trizol® (*Total RNA Isolation Reagent* - Invitrogen®). O RNA total de três diferentes fragmentos das três regiões da valva mitral (M1, M2 e M3) foi extraído separadamente usando 100 µl do reagente TRIZOL.

Esse método consiste na maceração de aproximadamente 100 µg de tecido valvar (previamente congelado a -80°C), com motor manual (Motor Cordless - Kontes) em capela de fluxo laminar. Uma vez homogeneizado, o tecido foi submetido a repetidas centrifugações, purificação com clorofórmio, precipitação com isopropanol e limpeza com etanol 75%.

## **Quantificação do RNA por espectrofotometria**

Foi realizada a diluição de 4 µl RNA em 196 µl de água milliQ, totalizando 200 µl de solução. Essas amostras foram colocadas em cubeta específica e analisadas no espectrofotômetro (UV-1601 - *UV Visible Spectrophotometer* - Shimadzu Corporation). Os valores de absorbância encontrados foram analisados de acordo com a fórmula: [RNA (µg/ml)] = 40 x A260 x diluição / 1000 (Maniatis). A avaliação de pureza foi feita por meio da razão entre os valores de absorbância obtidos em 260 nm e 280 nm (A260 / A280), sendo consideradas viáveis as amostras com valores entre 1,6 e 2,6.

## **Obtenção de cDNA**

Foi obtido o cDNA total dos 27 pacientes analisados pela reação de transcriptase reversa (RT). Para essa reação, foi utilizado o RNA extraído pelo método do Trizol e ajustado para uma concentração final de 1 µg/µl por regra de três simples. Foi seguido o procedimento recomendado para o kit ImProm-II™ *Reverse Transcriptase*, da Promega. O oligonucleotídeo oligodT (dT<sub>18</sub>) estava concentrado a 0,5 µg.

## Amplificação do DNA por PCR

A partir dos cDNAs produzidos, foram realizadas reações de PCR para detecção da expressão dos genes de interesse nos fragmentos valvares dos pacientes analisados. Dessa forma, foram construídos *primers* específicos para a ET-1 (sequência NM 001955 gi110624717 - NCBI), ET<sub>A</sub> (sequência NM 001957 gi4503464 - NCBI) e ET<sub>B</sub> (sequência NM 000115 gi4557546 - NCBI). Foi utilizado o gene GAPDH (BC029640) como controle constitutivo das amostras. Todos os *primers* foram diluídos para concentração de 10 mM. Foram utilizados os reagentes da Invitrogen para a reação, na qual usou-se 1,25U de *Taq* DNA polimerase (5U/μl), 0,25 μM de cada *primer* e dNTPs concentrados a 0,1 mM cada. Os programas utilizados para amplificação foram definidos de acordo com o certificado de análise da empresa fabricante dos *primers* (Invitrogen Brasil LTDA.). O volume final da reação foi de 10 μL, sendo realizadas em triplicata. Todas as amostras analisadas foram verificadas em gel de agarose 1%.

## Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

Após as amplificações, o volume 5 μl de cada amostra foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1%, acrescido de brometo de etídio 5 mg/ml e tampão de amostra (azul de bromofenol) 6x.

## Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do teste exato de Fisher. É um teste da classe dos testes exatos, onde o p-valor é calculado como se os totais marginais fossem fixos. É considerado significativo se inferior a 0,05.

## Resultados

Foram submetidos ao tratamento cirúrgico 27 pacientes, entre os meses de março de 2006 e setembro de 2007, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão definidos previamente. Dois indivíduos foram operados no Hospital de Base do Distrito Federal e o restante no Incor-DF. Todos os pacientes consentiram em participar do trabalho. Foram 15 os pacientes do sexo feminino e 12 do masculino, com uma média de idade de 46,2 anos (16 a 67 anos; DP: 12,6 - [Tabela 1](#)). Do total da amostra, apenas 10 pacientes (3, 4, 7, 9, 11, 18, 20, 22, 24, 25 - 37% do total) conseguiram determinar o tempo de sua doença, que variou entre 4 meses e 45 anos (tempo médio de 12 anos). Não houve óbito transoperatório, pós-operatório ou hospitalar.

Dos dados individuais colhidos, observamos pacientes nas quatro classificações funcionais (NYHA) assim distribuídos: 1 paciente na CF I (paciente 21 - 3,7% da população); 14 pacientes na CF II (pacientes 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 24 e 26 - 51,8%); 11 na CF III (pacientes 4, 5, 6, 8, 13, 14, 15, 22, 23, 25 e 27 - 40,7%) e 1 paciente na CF IV (paciente 12 - 3,7%). Em termos de prevalência de lesão valvar, observamos dupla lesão em 19 pacientes (70,3%), insuficiência valvar pura em 5 pacientes (18,5%) e estenose valvar pura em 3 pacientes (11,2%) ([Tabela 1](#)).

Os dados ecocardiográficos obtidos foram da área valvar, do gradiente transvalvar mitral, da pressão sistólica da artéria pulmonar, do volume regurgitante e do orifício regurgitante efetivo (na insuficiência mitral). Os achados revelaram uma área valvar média de 1,1 cm<sup>2</sup> (DP: 5,3; 0,6-1,9 cm<sup>2</sup> - dados de todos os 22 pacientes); gradiente transvalvar médio de 14,8 mmHg (DP: 6,9; 6-32 mmHg - dados de 20 dos 22 pacientes, 90,9%); pressão sistólica média da artéria pulmonar 55,9 mmHg (DP: 16,4; 21-100 mmHg - dados de 21 dos 22 pacientes, 95,4%); volume regurgitante médio de 88,3 ml (DP: 61,3; 58-209 ml - dados de 6 dos 24 pacientes, 25%); e orifício regurgitante efetivo médio de 0,47 cm<sup>2</sup> (DP: 0,26; 0,27-1 cm<sup>2</sup> - dados de 6 dos 24 pacientes, 25% - [Tabela 1](#)).

As manifestações clínicas mais comuns foram a dispneia (25 dos 27 pacientes - 92,5%), dor torácica (9 pacientes - 33,3%), dispneia paroxística noturna (7 pacientes - 25,9%), o edema de MMII (3 pacientes - 11,1%) e a ortopneia (em 3 pacientes - 11,1%). As palpitações apresentaram-se em 2 pacientes (7,4%) e a taquipneia e os escarros hemoptóicos manifestaram-se cada qual em apenas 1 paciente (3,7%). Apenas 1 paciente se dizia assintomático durante a internação ([Tabelas 2, 3 e 4](#)).

No tocante à abordagem cirúrgica, foram submetidos à reoperação 5 pacientes (18,5% - pacientes 2, 4, 8, 22 e 23), enquanto os demais (22 pacientes - 81,5%) foram abordados cirurgicamente pela primeira vez. Daqueles reoperados, o tempo médio desde a primeira cirurgia foi de 12,2 anos (DP: 6,3; paciente 22: 5 anos, paciente 2: 9 anos; paciente 23: 10 anos; paciente 8: 16 anos; paciente 4: 21 anos).

A quantificação de RNA mostrou uma razão entre absorbâncias dentro do intervalo considerado adequado em 91,3% das amostras da região M1 (em 21 das 23 amostras); em 87,5% das amostras na região M2 (21 das 24 amostras); e em 92% das amostras na região M3 (23 das 25 amostras), todas as quais foram submetidas à realização de cDNA.

A análise em gel de agarose foi feita em 21 das 27 amostras colhidas (77,8%); as seis amostras restantes foram submetidas a PCR em tempo real (22,2%). Revelou a presença do gene da ET-1 em 40,7% das amostras (11 das 27 amostras pesquisadas - pacientes 1, 2, 3, 8, 9, 12, 14, 22, 23, 24, 26) e do receptor A (ETrA) em todas as 27 amostras investigadas (100%). O gene correspondente ao receptor B (ETrB) foi identificado em 6 amostras (22,2% - pacientes 1, 9, 13, 21, 22 e 26).

## Histologia

Após a coleta dos fragmentos valvares, 12 deles foram submetidos à inclusão em parafina e coloração pela técnica de hematoxilina-eosina. Posteriormente, foram analisados quanto à presença de fibrose, calcificação, ossificação, neoformação vascular e infiltrado mononuclear. Também foram feitas lâminas identificadas como M1, M2 e M3, dependendo da disponibilidade de material, priorizando sua utilização para as etapas de extração de RNA e subsequentes.

Observou-se uma grande quantidade de fibrócitos, tecido conjuntivo denso, fibras colágenas do tipo I (eosinofílicas) e substância fundamental extracelular. O tecido é grosseiramente avascular. Não foram encontrados miócitos de Anitschkow ou os característicos nódulos de Aschoff.

Nos fragmentos M3, foram visualizados: processo inflamatório com celularidade alta, vascularização do tecido com capilares permeando-o (destacando-se a maior vascularização tecidual relativamente às demais áreas) e colágeno transformado ou neoformado (hialinização do colágeno). Foram também observados fibroblastos, linfócitos e áreas de calcificação distrófica (necrose do tecido com depósito). Nas lâminas de segmento M2, os achados foram semelhantes, com zonas de cicatrização, pequenos focos de inflamação e células mais afastadas entre si. Além disso, também foi visualizada ossificação. Na análise histológica do segmento M1, foram encontradas as mesmas características já citadas anteriormente, exceto pela ausência de calcificação ou ossificação. Em termos de achados histológicos individuais, foram encontradas:

- Fibrose em todos os pacientes nas amostras M3 (2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 22); e em 10 pacientes nas amostras M2 e M1 (2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 22) - 83,3% do total de pacientes analisados;
- Neoformação vascular em 9 pacientes (2, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 22) - 75% do total de pacientes analisados; também encontrada em 2 amostras M1 (22,2%), 4 amostras M2 (44,4%), 5 amostras M3 (55,5%) e em 2 pacientes (11 e 15 - 22,2%), sendo encontrada em dois fragmentos simultaneamente (M1/M3 e M2/M3, respectivamente);
- Infiltrado de mononucleares em 6 pacientes (2, 5, 6, 8, 9, 22) - 50% do total analisado; encontrado em 1 amostra M1 (16,6%), 3 amostras M2 (50%), 2 amostras M3 (33,3%), sendo que em nenhum paciente foi encontrado em dois ou mais fragmentos simultaneamente;
- Calcificação em 3 pacientes (9, 13, 22) - 25% do total de pacientes analisados; não foi encontrada em amostra M1, mas em 1 amostra M2 (33,3%) e em duas amostras M3 (66,6%), sendo que em nenhum paciente foi encontrado em dois ou mais fragmentos simultaneamente;
- Ossificação em apenas uma amostra (M2) do paciente 9 - 8,3% do total de pacientes analisados.

## Discussão

O estudo mostrou a manifestação do gene da ET-1 em 40,7% dos espécimes (11 das 27 valvas) e de seu receptor A em todas as amostras examinadas de valvas reumáticas na população descrita, com manifestação minoritária do gene do receptor B (6 das 27 amostras - 22,2%).

Os pacientes foram escolhidos a partir de sua indicação para correção cirúrgica valvar<sup>6</sup>. Em certos casos, as informações que constavam nos prontuários médicos, algumas muito relevantes, foram extraviadas permanentemente dos registros do paciente, impedindo sua apreciação em nosso estudo.

Não foram excluídos indivíduos anteriormente submetidos à valvoplastia (portadores de fragmentos valvares acometidos por reação inflamatória artificialmente aumentada pela manipulação operatória prévia), pela importância do grupo para comparação com pacientes cuja intervenção operatória realizada seria a primeira. O número de pacientes submetidos à reoperação correspondeu a 18,5% dos casos (5 pacientes) - uma fração significativa se comparada ao número total de casos.

Conforme podemos avaliar (com base na [Tabela 1](#) e [4](#)), os pacientes reoperados nessa série foram, em sua maioria, mulheres (pacientes 2, 4, 8 e 22 - 80%). Dentre elas, 75% encontravam-se na menopausa (pacientes 2, 4 e 8). Não obstante tratar-se de números inexpressivos, a condição hormonal diferenciada dessas pessoas pode determinar mudanças na expressão dos genes codificadores dos peptídeos do sistema de endotelinas.

Optamos pela subdivisão da valva em diferentes regiões, seguindo descrições que mostram a heterogeneidade na composição valvar, quando considerada em sua secção longitudinal (extremidade livre até sua inserção no anel mitral)<sup>2</sup>. Nesse sentido, buscamos evidenciar possíveis diferenças na identificação (ou não) dos genes da ET-1 e receptores A e B, que poderiam existir entre os segmentos M1, M2 e M3. Sabe-se que a ET-1 tem importante função reguladora na deposição de colágeno nos tecidos<sup>7</sup>; resta-nos definir se o aumento da composição tecidual de colágeno tem algum tipo de efeito sobre a presença ou aumento da concentração da ET-1 e seus receptores<sup>8</sup>. No entanto, a escassez de algumas amostras não permitiu a coleta de tecido valvar suficiente para análise histológica e molecular, ou mesmo dos três segmentos de interesse. Outra dificuldade, apresentada quando os fragmentos das três áreas eram colhidos, foi encontrar amostras pouco celularizadas, de onde pouco conteúdo nuclear poderia ser extraído.

A etapa seguinte, de extração do RNA das amostras, tem por finalidade a demonstração da expressão de um gene. O processo requeria perda e degradação mínimas do fragmento (muitas vezes exíguo). O tecido estudado era pouco celularizado, contendo grande quantidade de colágenos e elastina, e células mesenquimais (como miofibroblastos e miócitos cardíacos) em pequena quantidade. Isso influenciou decisivamente na obtenção do RNA, já que este é oriundo daquelas últimas. A amostra de RNA resultante, invariavelmente, foi escassa.

### [Tabela 5](#)

Em seguida, foi feita a quantificação de RNA por espectrofotometria. O intervalo considerado adequado compreendia valores entre 1,6 e 2,6 da razão mencionada. A [Tabela 6](#) mostra que os resultados obtidos nessa leitura nos informaram valores adequados na enorme maioria das amostras, indicando grau de pureza satisfatório.

A presença de ETrA nas amostras é um resultado interessante e aguardado já que, além de ser o receptor predominante nos miócitos cardíacos<sup>9</sup>, esse receptor correlaciona-se a processos inflamatórios, exuberantes na doença reumática em sua fase exsudativa, também presentes na fase proliferativa<sup>10</sup>. Apesar de os sujeitos do estudo se encontrarem em fases mais tardias, nas quais restam apenas as sequelas cicatriciais de processos outrora vigentes<sup>10</sup>, acreditamos que possa ser possível a permanência de receptores celulares residuais, mesmo após a defervescência da atividade inflamatória primária.

Os receptores B (ETrB) foram encontrados em poucas amostras da série, conforme podemos observar nas [Tabelas 2, 3 e 4](#). Como já discutido, a manifestação de tais peptídeos ocorre em células endoteliais e epiteliais responsáveis pela modulação da resistência vascular e natriurese, entre outros<sup>11</sup>. Além disso, tais receptores caracterizam-se pela rápida dessensibilização e internalização, cujos resultados na concentração tissular são pouco estudados<sup>12</sup>. Acreditamos ser o tempo de convívio com a doença valvar reumática, associado a outras características individuais, um possível determinante da manifestação de gene do ETrB no tecido valvar mitral. Essa afirmação demandará pesquisa específica nesse sentido.

Conforme destacamos anteriormente, pode ocorrer mudança fenotípica de um subtipo de receptor de ET para outro de acordo com condições encontradas *in vitro* nas culturas de células musculares lisas vasculares e, se essas expressarem ETrB, a ET-1 torna-se um mitógeno mais potente em tais células<sup>13</sup>. Não sabemos se isso se repete *in vivo* ou em outros tecidos (como o valvar), mas justificaria a maior prevalência de ETrA nas amostras estudadas, estimulando mais remodelamento arterial e hipertrofia ventricular<sup>4</sup>.

Acreditamos que a principal limitação do estudo deve-se à ausência de um grupo controle, livre de doença reumática ou de outra espécie, do qual fosse possível extrair informações semelhantes acerca da presença dos peptídeos, objeto de nossa avaliação. No entanto, a obtenção desses espécimes só seria possível quando oriundos de tecido valvar normal e ainda viável.

A análise estatística foi feita através do teste exato de Fisher, usado para examinar a significância da associação entre tabelas de contingência. Este é um teste estatístico utilizado em análises de dados categorizados quando o tamanho da amostra é pequeno. O teste demonstrou uma disposição, entre os pacientes do sexo masculino dessa amostra populacional, para uma maior probabilidade de apresentar o ET-1, além de forte tendência para que haja associação entre a presença desse gene e as variáveis edema de MMII ( $p = 0,056$ ) e dispneia paroxística noturna ( $p = 0,084$ ). No entanto, seja pela pequena amostra, seja pelo valor de  $p$ , não podemos afirmar tal correlação.

A busca da cura da cardiopatia valvar reumática por intermédio de agentes farmacológicos, em substituição à troca valvar ou valvoplastia cirúrgicas, ainda carece de pesquisa e permeia diversos setores da saúde pública. O controle dos surtos de estreptococos através de medidas sanitárias seria um bom começo. O diagnóstico precoce,

determinando menor ou nenhum comprometimento da valva e de seu aparelho subvalvar, permitiria o tratamento de inúmeros indivíduos de maneira menos onerosa. A identificação de valvopatas em risco, por meio de um acompanhamento ambulatorial regular, encaminharia-os ao tratamento invasivo, antes do surgimento de complicações.

Talvez a criação de estratégias adequadas nas políticas de saúde, aliada às pesquisas médicas em áreas básicas e clínicas, permitam encontrar opções às terapêuticas atuais. Nesse contexto, possivelmente o sistema de endotelinas e seus antagonistas venham colaborar, limitando a reação inflamatória valvar, modulando a vasorreatividade e modificando o curso fisiopatológico e clínico da valvopatia reumática.

## Conclusões

Apesar de não haver significância estatística, existe uma tendência à presença de ET-1 em pacientes do sexo masculino. Todos os pacientes, independentemente das características individuais (sexo, idade, classe funcional e alteração valvar mitral), expressaram a presença do gene do receptor A.

Dos pacientes reoperados, 4 são mulheres na menopausa; uma delas encontrava-se em idade fértil e expressou os três genes estudados.

Não houve diferença estatística quanto à gravidade da doença, expressa em classe funcional, e aos subgrupos estudados (valvopatas mitrais, mitro-aórticos e pacientes reoperados), assim como também não houve diferença quanto à expressão dos genes da ET-1 e seus receptores entre os subgrupos estudados (valvopatas mitrais, mitro-aórticos e pacientes reoperados).

Houve uma tendência à maior presença de ET-1, na população estudada, entre os pacientes com edema de membros inferiores e dispneia paroxística noturna, onde houve um maior número de mulheres.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Edmilson Bastos de Moura pela Universidade de Brasília-UnB.

## Referências

1. Stollerman GH. Rheumatic fever in the 21st century. *Clin Infect Dis*. 2001; 33 (6): 806-14. [ [Links](#) ]
2. McDonald PC, Wilson JE, Gao M, McNeill S, Spinelli JJ, Williams OD, et al. Quantitative analysis of human heart valves: does anorexigen exposure produce a distinctive morphological lesion? *Cardiovasc Pathol*. 2002; 11 (5): 251-62. [ [Links](#) ]
3. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988; 332 (6163): 411-5. [ [Links](#) ]
4. Rossi GP, Pitter G. Genetic variation in the endothelin system: do polymorphisms affect the therapeutic strategies? *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1069: 34-50. [ [Links](#) ]
5. Kirkby NS, Hadoke PwF, Bagnall AJ, Webb DJ. The endothelin system as a therapeutic target in cardiovascular disease: great expectations or bleak house? *Br J Pharmacol*. 2008; 153 (6): 1105-19. [ [Links](#) ]
6. Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon AC Jr, Faxon DP, Freed MD, et al. American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease); Society of Cardiovascular Anesthesiologists. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing Committee to Revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease) developed in

collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. J Am Coll Cardiol. 2006; 48 (3): e1-148.

[ [Links](#) ]

7. Sticherling M. The role of endothelin in connective tissue diseases. Rheumatology (Oxford). 2006; 45 (Suppl. 3): iii8-10. Erratum in: Rheumatology (Oxford). 2008; 47 (2): 234-5. [ [Links](#) ]

8. Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. Contrasting actions of endothelin ET (A) and ET (B) receptors in cardiovascular disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007; 47: 731-59. [ [Links](#) ]

9. Hilário MOE, Andrade JL, Gasparian AB, Carvalho AC, Andrade CT, Len CA. The value of echocardiography in the diagnosis and follow-up of rheumatic carditis in children and adolescents: a 2 year prospective study. J Rheumatol. 2000; 27 (4): 1082-6. [ [Links](#) ]

10. Meneghelo ZM, Ramos AIO. Lesões das valvas cardíacas - diagnóstico e tratamento. São Paulo: Atheneu; 2007. [ [Links](#) ]

11. D'Orléans-Juste P, Plante M, Honoré JC, Carrier E, Labonté J. Synthesis and degradation of endothelin-1. Can J Physiol Pharmacol. 2003; 81 (6): 503-10. [ [Links](#) ]

12. Oksche A, Boese G, Horstmeyer A, Furkert J, Beyermann M, Bienert M, et al. Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. Mol Pharmacol. 2000; 57 (6):1104-13. [ [Links](#) ]

#### **Correspondência:**

Edmilson Bastos de Moura  
CCSW 1 Ed. Rivoli apto 314  
Sudoeste - 70680-150 - Brasil  
E-mail: [ebmoura@terra.com.br](mailto:ebmoura@terra.com.br)

Artigo recebido em 11/11/08  
Revisado recebido em 11/11/08  
Aceito em 29/01/09.



Todo o conteúdo deste periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

**Av. Marechal Câmara, 160 - 3º Andar - Sala 330**  
**20020-907, Centro, Rio de Janeiro, RJ - Brazil**  
**Tel.: +55 21 3478-2700**  
**Fax: +55 21 3478-2770**

 e-Mail

[arquivos@cardiol.br](mailto:arquivos@cardiol.br)