

Edmilson Bastos de Moura

**Amplificação dos genes que codificam a
Endotelina-1 e seus receptores
em valvas mitrais reumáticas**

Brasília, 2008

Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina – FM
Pós-Graduação em Ciências Médicas

Amplificação dos genes que codificam a
Endotelina-1 e seus receptores
em valvas mitrais reumáticas

Dissertação Apresentada à Banca Examinadora
do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Universidade de Brasília – UnB
como Parte dos Requisitos Exigidos Para
Obtenção do Título de Mestre em Ciências
Médicas.

Mestrando: Edmilson Bastos de Moura

Orientadora: Profa. Dra. Yolanda Galindo Pacheco

Banca examinadora:

Profa. Dra. Yolanda Galindo Pacheco (Presidente)

Prof. Dr. Francisco de Assis Neves

Dr. Fábio Amorim Ferreira

Prof. Dr. Daniel França Vasconcelos

Brasília, 2008

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, irmã e sobrinha,
pelo carinho incondicional.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente o apoio recebido para a confecção dessa dissertação, de amigos especiais:

- À Profa. Dra. Yolanda Galindo Pacheco, minha orientadora, pela paciência com que me fez buscar o caminho correto;
- À amiga Mariana Ribeiro Gomes, companheira de bancada e de pesquisa, pela convivência saudável e valorosa ajuda;
- Ao Prof. Dr. Luís Simeoni, que gentilmente me acolheu no Laboratório de Farmacologia Molecular;
- Ao Prof. Dr. Vicente Pérez Carrascosa, pelo auxílio que prestou na confecção do estudo histológico, e ao Sr. Giuliano, que habilmente confeccionou as lâminas;
- Aos amigos Rosângela Vieira de Andrade e Tomás de Moraes Macedo, pela participação importante durante todas as fases da pesquisa;
- Aos médicos do InCor-DF, em especial aos cirurgiões Dr. Luiz Fernando Caneo, Dr. Ricardo Corso, Dr. Cristiano Faber, Dr. Guilherme Succi e Dr. Fernando Atik, pelas lições aprendidas na busca de uma Medicina de alta qualidade;
- Aos médicos do Hospital de Base do DF, pela dedicação que tiveram com a coleta do material de pesquisa.

“Nunca ninguém mensurou, nem mesmo os poetas, quanto um coração pode suportar.”

Zelda Fitzgerald

SUMÁRIO

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
I. Introdução.....	1
II. Revisão de literatura	3
II. 1. A doença reumática mitral.....	3
II. 2. Endotelinas	6
II. 3. A valva mitral1	14
II. 4. Disfunção valvar mitral.....	15
III. Objetivos	18
IV. Metodologia.....	19
IV. 1. Material	19
IV. 2. Critérios de inclusão e exclusão	19
IV. 3. Métodos	21
IV. 3. 1. Histologia	21
IV. 3. 2. Extração de RNA total	21
IV. 3. 3. Quantificação do RNA por espectrofotometria.....	21
IV. 3. 4. Obtenção de cDNA	22
IV. 3. 5. Amplificação do DNA por PCR	22
IV. 3. 6. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose.....	23
IV. 4. Análise estatística	23
V. Resultados.....	24
V. 1. Histologia	29
VI. Discussão	36
VII. Conclusão.....	39
VIII. Referências bibliográficas.....	40
IX. Anexos	49

LISTA DE FIGURAS

1. A estrutura da endotelina-1	8
2. Válvulas mitrais reumáticas	20
3. Prevalência dos sintomas nos indivíduos.....	26
4. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando calcificação, fibrose e infiltrado mononuclear. HE, 200x	31
5. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando calcificação. HE, 400x.....	31
6. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando área com fibrose. HE, 100x	32
7. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando infiltrado de mononucleares. HE, 400x	32
8. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando neoformação vascular. HE, 200x	33
9. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando ossificação. HE, 200x.....	33

LISTA DE TABELAS

1. Dados ecocardiográficos dos pacientes.....	25
2. Dados clínicos e análise molecular individualizada dos pacientes com acometimento valvar unicamente mitral.....	26
3. Dados clínicos e análise molecular individualizada dos pacientes com acometimento valvar mitro-aórtico.....	27
4. Dados clínicos e análise molecular individualizada dos pacientes submetidos a reoperação mitral.....	27
5. Dados histológicos individualizados dos pacientes.....	30
6. Dados do p-valor, faixa etária e sexo x presença dos genes	34
7. Dados do p-valor, sintomas x presença dos genes.....	34
8. Dados do p-valor, subgrupos x presença dos genes.....	35

RESUMO

Introdução: o estudo da substância vasoconstritora endotelina-1 e de seus receptores A e B, desde sua descoberta em 1988, tem crescido progressivamente nos últimos anos. Isso se deve ao seu reconhecimento como elemento crítico na fisiopatologia de diversas doenças, com destaque para aquelas de acometimento cardiovascular. Sua função na vasorreatividade já é conhecida, bem como sua ação parácrina e autócrina, o que conduz à procura de seus sítios de produção nos diversos tecidos. Essa busca objetiva desvendar a contribuição de cada órgão no processo patológico, e também determinar a participação de tais peptídeos nas modificações sofridas pelo próprio tecido nesse processo (como a deposição de colágeno, ou a neovascularização). Nesse contexto, a valvopatia reumática revela-se uma boa candidata à pesquisa, pelas suas características mudanças estruturais valvares e pela repercussão que impõe à todo o sistema cardiovascular e pulmonar. **Objetivo:** determinar, mediante técnicas moleculares, a expressão dos genes da endotelina e dos seus receptores em valvas mitrais reumáticas. **Metodologia:** 27 pacientes submetidos a troca valvar mitral tiveram seu tecido valvar analisado para determinação da presença de genes da ET-1 e seus receptores A e B; foi feita análise histológica e molecular das valvas (divididas em fragmentos M1, M2 e M3) e colhidos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. Foram divididos em 3 grupos (valvopatia mitral, mitroaórtica, pacientes reoperados). **Resultados:** O estudo mostrou a manifestação do gene da endotelina-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%). **Conclusões:** todos os pacientes expressaram a presença do gene do receptor A; não houve diferença estatística quanto a gravidade da doença, expressa em classe funcional, e os subgrupos estudados (valvopatas mitrais, mitro-aórticos e pacientes reoperados), ou quanto a expressão dos genes da ET-1 e seus receptores, entre os subgrupos estudados (valvopatas mitrais, mitro-aórticos e pacientes reoperados). **Palavras-chave:** endotelina-1; valva mitral; reação de PCR.

ABSTRACT

Introduction: the study of the vasoconstrictor substance endothelin-1 and its receptors A and B, since its discovery in 1988, has grown gradually in the last years. This is due to their recognition as a critical element in the pathophysiology of many diseases, with emphasis on those from cardiovascular involvement. His role in vasoreactivity is already known, as well as its autocrine and paracrine actions, leading to demand for its production sites in various tissues. This search aims to unveil the contribution of each organ in the pathological process, and also determine the involvement of these peptides in the modifications made by the tissue in the process (as the deposition of collagen, or neovascularization). In this context, rheumatic valve disease proves to be a good candidate to search, due their characteristics valve structural changes and the impact of the whole cardiovascular and pulmonary systems. **Objective:** to determine, through molecular techniques, the expression of genes of endothelin and its receptors in rheumatic mitral valves. **Methodology:** 27 patients undergoing mitral valve replacement had their valve tissue analyzed for determining the presence of genes of ET-1 and its receptors A and B; was made histological and molecular analysis of the valves and collected clinical and epidemiological data of patients. They were divided into 3 groups (mitral valvopathy, mitroaortic, patients reoperated). **Results:** the study showed the gene expression of enothelin-1 in 40,7% of the samples, and its receptor A in all samples, with minority manifestation of the gene of receptor B (22,2%). **Conclusions:** all patients expressed the gene of receptor A; there was no statistical difference regarding the severity of illness, expressed in functional class, and the subgroups studied (mitral valvopathy, mitroaortic and reoperated patients), or in the expression of genes of ET-1 and their receptors, among the subgroups studied. **Key words:** endothelin-1; mitral valve; PCR reaction.

I. INTRODUÇÃO

As cardiopatias são doenças de alta prevalência¹, tornando seu conhecimento, diagnóstico e tratamento, objeto de intensa pesquisa em âmbito mundial. Nos países em desenvolvimento, adquire destaque a cardite reumática, complicação temida da doença reumática em nações cuja atenção à saúde é deficiente².

A valvopatia reumática acomete a valva mitral, promovendo seqüelas que resultam em regurgitação ou insuficiência valvar³. As alterações em câmaras cardíacas esquerdas se associam a disfunção endotelial com aumento dos níveis de ET-1, peptídeo vasoconstritor de grande potência, que também estimula a proliferação de miócitos vasculares⁴. Tais modificações tem conseqüências sobre a circulação pulmonar, muitas vezes determinando a hipertensão pulmonar (HP)⁵. No entanto, a presença da ET-1 e seus receptores na própria valva mitral, aumentando a deformação valvar reumática, ainda é um assunto não abordado na literatura.

As endotelinas e seus receptores são consideradas chave para uma promissora linha de tratamento de doenças como a HP e insuficiência cardíaca congestiva (ICC)⁶. A identificação de sítios produtores desses peptídeos e o bloqueio de seus receptores tissulares teoricamente mitigariam seus efeitos nefastos sobre a hemodinâmica⁶, colaborando para o reequilíbrio entre substâncias responsáveis pelo tônus vascular, cerne de doenças como a ICC ou a HP.

No entanto, definir a importância do sistema de endotelinas na doença reumática mitral e HP a ela associada depende de etapas intermediárias, entre elas determinar a importância da própria valva mitral acometida como sítio produtor desses peptídeos. Através de técnicas moleculares, é possível avaliar a presença de gene que codificam tais peptídeos no tecido valvar mitral. Esse seria um passo decisivo na descoberta da associação entre a ET-1 (e seus receptores) e a valva mitral.

Também é de relevância a determinação da associação entre características clínicas e epidemiológicas individuais e a presença do gene da ET-1 e seus receptores. Talvez a existência de algum sintoma específico seja preditor da presença ou não desses genes, bem como a gravidade em que se manifesta a doença no paciente. Não se sabe se

pessoas submetidas a cirurgia prévia que não a troca valvar (comissurotomia, p. ex.) apresentam modificações na presença dos genes que codificam esses peptídeos no tecido valvar mitral.

Como discutido, a pesquisa da presença dos genes correspondentes ao sistema de endotelinas em valvas mitrais reumáticas podem ser de grande ajuda na terapêutica⁶ e talvez na modificação da história natural da valvopatia reumática e suas complicações. No entanto, encontra-se em fases iniciais, e carece de inúmeras respostas que podem ter resposta na análise molecular tecidual.

Considerando-se que a ativação do sistema de endotelinas tem ação tão abrangente no sistema cardiovascular, além da reconhecida ação parácrina e autócrina^{7,8}, investigamos a presença da ET-1 e seus receptores em valvas mitrais reumáticas, afim de esclarecer a existência de tais peptídeos no tecido acometido por essa doença.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II. 1. A doença reumática mitral

Febre Reumática (FR) é uma doença reumática, inflamatória, de origem auto-imune e recidivante, em resposta do organismo a infecções pelo estreptococo (*Streptococcus pyogenes*) do grupo A de Lancefield. Tal associação etiológica foi inicialmente observada por Coburn, em 1930.

A doença acomete cerca de 14 milhões de pessoas em todo o mundo, levando um número de 3 milhões de pacientes à hospitalizações frequentes devido a insuficiência cardíaca congestiva. A doença reumática cardíaca foi responsável por 332 mil óbitos mundialmente, em 2000¹, sendo creditados em torno de 233 mil mortes aos países em desenvolvimento².

O impacto da doença também é preocupante para a saúde pública brasileira, onde registram-se cinco mil casos novos ao ano³. Segundo Terreri *et al*⁹, o custo anual da doença reumática é de US\$ 50 milhões, correspondendo à 90% das indicações cirúrgicas pediátricas do Sistema Único de Saúde (SUS).

Em países desenvolvidos, observa-se queda da prevalência da doença, certamente graças às melhorias das condições socioeconômicas e culturais e à abrangência da atenção básica à saúde – com diagnóstico precoce e antibioticoterapia para infecções respiratórias². A febre reumática continua prevalente no Brasil, onde acomete cerca de 3 a 5% de crianças e adolescentes¹⁰. Sua epidemiologia assemelha-se com a da faringite causada pelo *Streptococcus β* hemolítico do grupo A, que promove a ocorrência de surtos de FR (em torno de 3% da população afetada pela faringite).

Existem cepas de estreptococos do grupo A ditas reumatogênicas, ou seja, responsáveis pelos surtos de febre reumática aguda. Isso se deve a virulência diferenciada desse subgrupo, representada pela riqueza em proteína M e ácido hialurônico na sua cápsula, determinando propriedades antifagocíticas¹¹. Aquela é

estruturalmente homóloga à miosina e estende-se da superfície celular como uma α hélice. A ativação do linfócito T é feita por essa proteína, combinados com HLA-DR7 (a identificação de alguns alelos do sistema HLA sugere a presença de susceptibilidade genética à FR), que dão origem à receptores de membrana das células apresentadoras de antígenos (linfócitos B, monócitos, macrófagos e células dendríticas)³. A produção de anticorpos pelos linfócitos B ativados faz com que aqueles infiltrem o tecido valvar, aumentando a expressão da molécula de adesão VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*). O linfócito T adere à tal molécula através do ligante VLA-4 (*Very Late Antigen-4*), contribuindo para a lesão reumática¹².

Anticorpos anti-proteína M contribuem para a doença valvar via mimetismo molecular com a miosina que, apesar de não estar presente na valva, se liga a ela pela laminina. Anticorpos antimiosina reconhecem a laminina, uma proteína da matriz extracelular composta predominantemente por α hélice, parte da estrutura da membrana basal valvar³. No tecido valvar, células inflamatórias novamente são responsáveis pela liberação local de citocinas e lesão de células intersticiais com neovascularização e inflamação crônica. Macrófagos são ativados e atraem as células T. A destruição valvar pode expor mais antígenos, de modo progressivo¹³.

A reação inflamatória é chamada exsudativa, em sua fase inicial. Caracteriza-se pelo edema intersticial, fragmentação de fibras colágenas, infiltração linfocitária/plasmocitária e degeneração fibrinóide. A fase mais tardia é dita proliferativa, determinada por lesões contínuas à fase anterior: necrose fibrinóide perivascular circundada por linfócitos e plasmócitos, além dos característicos miócitos de Anitschkow (células basofílicas grandes e multinucleadas). Estas lesões são conhecidas como nódulo de Aschoff³.

A endocardite é o componente mais importante da pancardite reumática. A valvulite resultante, associada à dilatação do anel mitral e disfunção papilar, é determinante na patogênese da regurgitação valvar¹⁰. Associam-se outras lesões, reconhecidas como pertencentes à fase crônica da doença valvar reumática: fibrose com ou sem calcificação, espessamento com retração cicatricial; fusão de comissuras, com perda do endotélio e erosão com formação de trombo; as cordoalhas, engrossadas e retraídas; lesões verrucosas ou vegetações reumáticas, predominantes nas margens

livres das valvas. A cicatrização é importante na evolução da doença valvar e é acompanhada pela neovascularização de uma estrutura outrora avascular¹³. O aparecimento de vasos neoformados é limitado à camada esponjosa, onde encontram-se também células inflamatórias¹⁴.

Quando submetidas à análise de sua espessura média, as válvulas reumáticas apresentam medidas superiores (especialmente quando consideradas as suas extremidades) comparadas às normais ou associadas a outras doenças (carcinóide, relacionada ao uso de anorexígenos); possuem, ainda, uma quantidade inferior de glicosaminoglicanos e elastina, mas superior de músculo e colágeno. Esse último, componente característico de processos tardios de cicatrização, já seria intuitivamente esperado, por serem os pacientes candidatos à cirurgia normalmente portadores de doença reumática crônica¹⁴. Vale ressaltar que, com o avançar da idade, há o aumento de espessura, sem alteração significativa da composição valvar¹⁴.

O diagnóstico da FR é baseado no reconhecimento das combinações de alguns achados clínicos, inicialmente descritos por T. Duckett Jones, em 1944. Os critérios de Jones (modificados em 1992 por Dajani *et al*¹⁵), utilizados como guia para o diagnóstico da FR, 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. A presença de dois sinais maiores, ou de um sinal maior e dois menores, indica alta probabilidade diagnóstica, se acompanhados da evidência de estreptococcia prévia. Os critérios maiores são poliarterite, cardite, coréia, nódulos subcutâneos e eritema marginado, e os menores são febre, artralgia, aumento do intervalo PR no eletrocardiograma e aumento nos valores laboratoriais da VHS (velocidade de hemossedimentação), PCR (proteína C reativa) ou leucocitose³.

No entanto, o diagnóstico da FR continua sendo desafiante para os médicos, tornando importante a caracterização clínica e demográfica dos pacientes. Um estudo nacional avaliou tais características⁹: a prevalência em mulheres, em crianças de cinco anos a adolescentes de 15 anos, sendo a cardite a segunda manifestação clínica mais freqüente (a artrite é a mais comum). Quando o processo inflamatório é mais intenso, a anemia e a elevação da VHS e $\alpha 1$ glicoproteína podem ocorrer, bem como da gamaglobulina (ratificando a participação da resposta humoral)⁹.

Sendo a valvopatia reumática uma seqüela crônica da febre reumática e a doença mais frequentemente associada com a valvopatia pós-inflamatória (encontrada em várias outras doenças⁹), mesmo em pacientes assintomáticos do ponto de vista cardiovascular, a realização do ecocardiograma pode ajudar o diagnóstico. Crianças com cardite reumática subclínica apresentam alterações ecocardiográficas persistentes em 35% dos casos¹⁶.

A profilaxia primária tem sido muito debatida, mas o tratamento com penicilina V oral 500.000 unidades normalmente cura a faringite estreptocócica (exceto se for causada por cepa reumatogênica). Se a FR é muito prevalente na comunidade, ou estreptococos do grupo A são identificados, a terapêutica deve completar 10 dias. A imunização de populações em risco através de vacinas multivalentes compostas pela combinação dos sorotipos M mais encontrados (entre os mais de 90 já identificados), é promissora; assim também é a imunização oral. A prevenção secundária das recorrências reumáticas é feita através da administração de 1,2 milhões de unidades de penicilina G benzatina mensalmente, ou a cada 3 semanas. O tempo pelo qual o tratamento deve ser mantido dependerá do julgamento clínico do risco, envolvendo variáveis como a gravidade do acometimento agudo ou a presença de cardite reumática¹¹.

O tratamento preventivo dos danos valvares não mudou nas últimas décadas. A utilização de drogas inibidoras do TNF, baseada na ação citotóxica celular autoimune da doença, possivelmente pode diminuir a deformidade valvar. O uso de corticóides para o tratamento da cardite reumática justifica-se pela sua potência antiinflamatória, em casos graves¹¹.

II. 2. Endotelinas

A endotelina, peptído com forte potência vasoconstritora (considerada dez vezes mais potente que a angiotensina II), foi inicialmente descrita por Yanagisawa em 1988¹⁷. Isolada e purificada a partir de cultura celular endotelial bovina, rapidamente estabeleceu-se como de fundamental importância nos processos moleculares

responsáveis pela manutenção do tônus vascular, bem como pela sua expressão aberrante em determinadas situações patológicas.

A importância das endotelinas e 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 desde a sua descoberta. Além disso, são importantes reguladoras da deposição de colágeno e matriz extracelular¹⁸. Exercem múltiplos efeitos biológicos, através de seus receptores A e B, e suas concentrações tissulares refletem com maior precisão a ativação do sistema das endotelinas¹⁸.

Reconhecidamente a mais importante para a espécie humana, a ET-1 tem sido o isopeptídeo mais estudado em sua família (composta pelas endotelinas 1, 2 e 3 – ET-1, ET-2 e ET-3). De incontestável relevância no sistema cardiovascular^{5,4}, a ET-1 é codificada por genes localizados no cromossomo 6¹⁹ e são abundantes no endotélio, o que motivou sua denominação. No entanto, podem ser produzidas em outros tipos celulares: células tubulares renais, neurônios do sistema nervoso central, neurônios simpáticos pós-ganglionares, monócitos e macrófagos. Sob condições pró-inflamatórias, também é produzida pelas células musculares lisas vasculares⁴.

A produção intracelular da ET-1 ocorre através de uma reação proteolítica bifásica, pois seus dois precursores (preproET-1 e bigET-1) são processados por duas proteases para a obtenção da forma biologicamente ativa. A preproET-1, peptídeo com aproximadamente 200 aminoácidos, é clivada por endopeptidases neutras dependentes de cálcio semelhantes à furina – enzima pertencente a família das subtilisinas²⁰. É formado um composto intermediário, biologicamente inativo, chamado big ET-1, transformado no produto final (ET-1) por metaloproteases ligadas à membrana celular²¹, que rompem o peptídeo precisamente na posição Trp-Val²². A importância dessa conversão justifica-se pela potência vasoconstritora 140 vezes maior da ET-1 em relação ao seu antecessor²³. Essa família de metaloproteases (pertencentes à superfamília das neprilisinas²⁴) é chamada de enzima conversora de endotelina (ECE). Suas variadas posições subcelulares, dependentes da isoforma de ECE em questão, permitem que a conversão a ET madura se dê tanto na superfície celular quanto em seu

interior⁴. A ET-1, resultante do processo acima descrito, é um peptídeo de 21 aminoácidos formando uma alça fechada por duas pontes dissulfeto.

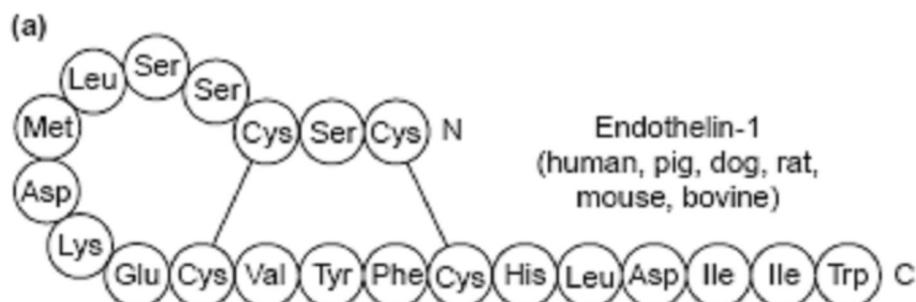


Figura 1. A estrutura da endotelina-1 (Masaki, 2004)

Foram identificadas duas variantes de ECE, denominadas 1 e 2: a primeira, encontrada em várias células (inclusive endoteliais), é capaz de converter a big ET-1 em ET-1 tanto na superfície celular quanto no interior desta, graças ao seu pico de ação em pH neutro; a segunda, presente em outros tipos celulares, como neurônios, tem boa ação intracelular, devido a sua afinidade pelo pH ácido^{4,25}.

Além da própria ET-1, a angiotensina II, catecolaminas, cardiotrofina-1, trombina, fatores de crescimento, citocinas, radicais livres, insulina, hipóxia, e distensão dos vasos, são responsáveis pela liberação da ET-1 pelo endotélio^{26,27,28,29,30}. Já a sua síntese é inibida pelo óxido nítrico, peptídeos natriuréticos, heparina, prostaglandinas, homocisteína e estrógeno^{31,32,33,34,35}.

Liberada na luz dos vasos a partir do endotélio, a ET-1 age de maneira autócrina e parácrina, e não como um hormônio⁷. É uma molécula de *clearance* rápido, principalmente pulmonar (circulação onde 50% da ET-1 é depurada numa só passagem^{36,37}) com uma meia-vida de 1 minuto e efeitos pressóricos mantidos por 1 hora^{38,39}. Normalmente, detecta-se pequena quantidade no plasma, níveis que não se correlacionam com sua atividade, pois representam o excesso das moléculas que não se ligaram aos receptores teciduais⁵.

A existência dos receptores A e B (ETRA e ETRB), responsáveis por mediar os efeitos das ET em mamíferos, classificados com base em sua potência em resposta às ET's, sendo $ET-1 = ET-2 \gg ET-3$ para o ETRA e $ET-1 = ET-2 = ET-3$ para a ETRB⁴⁰.

São muitas as formas através das quais a ET-1 age, mediando alguns mecanismos em diversas doenças cardiovasculares. Promove a formação de ânion superóxido, que ativa a família do fator de transcrição nuclear κB (NF- κB); esse inicia a expressão de genes que codificam moléculas proaterogênicas e pró-inflamatórias (adesinas: VCAM-1, ICAM-1, E-selectin; citocinas inflamatórias: IL-6 e 8). Essas reações são co-responsáveis pela indução e progressão da aterosclerose, além da desestabilização da placa aterosclerótica¹⁸. Além disso, o NF- κB modula a apoptose feita pelo TNF, garantindo a sobrevivência do cardiomiócito e a manutenção da função e do remodelamento cardíacos em situações de stress.

A ET-1 também exerce importante papel no remodelamento de artérias de baixa resistência e na hipertrofia ventricular esquerda. Isso se deve a sua ação estimuladora na atividade do gene do colágeno I, na deposição de proteínas da matriz extracelular, na expressão de fibronectina e na potencialização dos efeitos do fator de crescimento transformador β (TGF- β) e do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)¹⁸.

A ET-1 necessita de concentrações picomolares no plasma para atingir seus efeitos fisiológicos⁴¹, insuficientes para exercer tais ações nos receptores, sugerindo que a ET-1 age de modo parácrino ou autócrino no coração^{42, 8}. Tais níveis séricos não se correlacionam com sua atividade, já que representam apenas as moléculas que não se ligaram aos receptores teciduais⁵.

Ambos os receptores de endotelina são membros de uma superfamília de receptores acoplados a proteína G de hepta hélice, com uma média de tamanho de 45 a 50 kDa e codificados por gene localizados no cromossomo 4 e 13, respectivamente⁴³. O receptor A possui uma cadeia de 427 aminoácidos, e apresenta uma similaridade de 64% com a molécula de 442 aminoácidos do receptor B⁴⁴. Consistem em moléculas com extremidade amino extracelular e outra carboxi intracelular (esta última com sítio de fosforilação). Mesmo antes de serem assim denominados, os receptores de ET já podiam ser diferenciados pela sua afinidade preferencial por moléculas de ET-1, 2 e 3; o

ETRA, como já comentado, tem uma enorme afinidade para ligação com ET-1 e 2, quatro à oito vezes maior em relação a ET-3⁴⁵.

A análise de tecidos humanos por técnicas moleculares revela a presença de ETRA numa grande variedade deles, principalmente em células da musculatura lisa vascular pulmonares e sistêmicas⁴⁶. Através desse receptor ocorre a contração dessa musculatura em modelos experimentais⁴⁷, muitas vezes simultaneamente à ação de ETRB coexistente⁴⁸. Seu mapeamento *in vivo* mostra sua presença em diversos tecidos: pulmões, coração, rins, intestino, adrenais, olhos e cérebro. Sua densidade é especialmente alta nos dois primeiros sítios; nos pulmões, uma distribuição abrangente, principalmente nos brônquios, e no coração, no sistema condutor, átrios, ventrículos e artérias coronárias⁴⁹.

Foram descritos dois padrões de ligação da ET-1 aos receptores A e B. Tais padrões produzem aumento do cálcio intracelular: num deles o aumento é fugaz (2-5 segundos), no outro é mantido por 20 minutos. Tal comportamento é dito bifásico^{50,51}. O mecanismo de ação atualmente aceito dos canais iônicos e mensageiros ocorre através de ligação da ET-1 ao receptor, estimulando a fosfolipase C, que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato para formar o trifosfato de inositol (IP 3), hidrossolúvel, e o diacilglicerol (DAG), neutro. IP3 induz a mobilização do Ca⁺⁺ do retículo sarcoplasmático com os receptores IP3 promovendo o primeiro aumento transitório de [Ca⁺⁺]_i⁵². A abertura de canais de Ca⁺⁺ pode ser direta ou indiretamente acionada pela depleção dos estoques de Ca⁺⁺ citosólicos. O DAG abre canais de Ca⁺⁺ operados por receptores (*ROC – receptor-operated Ca⁺⁺ channels*).

A elevação do [Ca⁺⁺]_i ativa vários canais iônicos resultando na entrada de Ca⁺⁺ através da membrana citoplasmática⁵³. Ativa canais de cloreto, promovendo o efluxo destes íons, despolarização celular, ativação de canais de Ca⁺⁺ voltagem-dependente e influxo de Ca⁺⁺^{51,54}. Os canais de K⁺ voltagem-dependentes também promovem influxo de Ca⁺⁺ através dos canais de Ca⁺⁺ voltagem-dependentes⁵⁵. A ativação do trocador de Na⁺/Ca⁺⁺ resulta em alcalinização das células e promove o influxo de Ca⁺⁺⁵⁶. O aumento de [Ca⁺⁺]_i também pode disparar a liberação de Ca⁺⁺ do retículo sarcoplasmático, ativando os canais de K⁺ ativados-por-Ca⁺⁺⁵⁷.

Como observado, a ET-1 medeia os sinais para mobilização do cálcio, através de vários canais iônicos. Portanto, a expressão relativa e distribuição desses canais iônicos determinam a resposta celular à ativação pela ET-1. O sinal de feedback negativo, responsável pela interrupção da mobilização de íons cálcio, é dado pela cinase C protéica, ativada pelo DAG e pelo próprio Ca^{+2} ⁵⁸. A cascata de sinalização intracelular quando da ativação do ETRB é semelhante àquela descrita para o receptor A; além desse mecanismo, o receptor B ativa a fosfolipase A_2 , liberando tromboxano A_2 e prostaglandinas E_2 e I_2 , importantes na reação inflamatória e vasorreatividade⁵. Há uma 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 células⁵⁹.

O efeito dos receptores de endotelina na rede vascular se faz sentir de diferentes maneiras. O ETRB tem um duplo efeito no tônus vascular: vasodilatador, quando receptores localizados no endotélio são ativados, produzindo óxido nítrico e metabólitos vasodilatadores da ciclooxigenase; vasoconstritor, quando acionados ETRB no músculo liso vascular. O ETRA tem mecanismo de ação vasoconstritor semelhante na musculatura lisa vascular⁴.

Não é inteiramente conhecida a ação hemodinâmica basal das endotelinas endógenas, bem como a suposta proteção exercida pelo ETRA ao organismo contra tais ações. Supõem-se que o papel desse último no tônus vascular basal de indivíduos normais seja pouco relevante, já que o bloqueio desse receptor pode não modificar a pressão arterial⁴.

Os receptores são expressos de forma heterogênea no tecido cardíaco, com ETRA predominando nos miócitos. Sua estimulação tem efeitos inotrópico e, menos freqüentemente, cronotrópico positivos⁴. Além disso, estimula a hipertrofia cardíaca, uma importante resposta adaptativa, é induzida pela ET-1 em culturas de miócitos cardíacos, provavelmente pela ativação da família MAPK (cinases protéicas ativadas por mitogênese) que estimula a produção do protooncogene c-jun e seus efeitos promotores do crescimento⁶⁰.

Os receptores A também tem função de estimular o stress oxidativo vascular, já que a geração de espécies (ou ânions) reativas do oxigênio (ROS, em inglês) levam ao crescimento da musculatura lisa vascular, hipertrofia cardíaca, e deficiência do relaxamento dependente do endotélio, todas essas ações características da ET-1 e de relevância na hipertensão arterial⁶¹. Além disso, promovem o crescimento e proliferação das células musculares lisas vasculares²⁴.

Apesar das conhecidas interações entre as endotelinas e seus receptores, algumas vezes estas podem ser inesperadas e paradoxais. Isso pode ser explicado pela hetero e homodimerização desses receptores, que dão origem a moléculas semelhantes aos receptores originalmente conhecidos, mas com algumas características próprias⁴.

A intensa pesquisa laboratorial envolvendo as ET's e seus receptores, bem como dos antagonistas desses, justifica-se pela sua resposta farmacológica única e sua possível correlação com doenças cardiovasculares⁶². As ações das ET's no sistema cardiovascular e sua atividade pró-inflamatória despertam grande interesse na determinação de sua participação nos mecanismos fisiopatológicos daquelas enfermidades. Dentre elas, destaca-se a hipertensão pulmonar, ora como via final de várias cardiopatias, ora como perpetuadora dessas condições mórbidas⁶³.

Na insuficiência cardíaca sua concentração sanguínea está aumentada, talvez por uma expressão majorada do mRNA da ET-1⁶⁴. Disso resulta a importância do mapeamento do sistema de endotelinas no tecido cardíaco, em situação de homeostase ou patológica, visando definir sua relevância em cada um dos contextos.

Sua localização nos diversos tecidos cardíacos revela importantes informações, como a de que os miócitos cardíacos não são produtores de ET-1 na espécie humana⁶⁵. Aparentemente, as células endoteliais endocárdicas são as maiores responsáveis pela liberação de endotelinas, modulando a ação de células vizinhas: inotropismo positivo nas câmaras cardíacas e, possivelmente, contribuindo para a fibrilação atrial⁶³.

A participação do sistema de endotelinas na fisiopatologia e nas alterações morfológicas da valva mitral na doença reumática é desconhecida. Sabe-se que existe associação entre portadores de determinados HLA (DR7 e DRw53 entre os

brasileiros⁶⁶) com o desenvolvimento de febre reumática ou cardiopatia reumática. Isso demonstra o envolvimento de mecanismos imunológicos celulares e humorais, e inflamatórios, representados por substâncias responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias, através da transcrição de seus genes. Entre eles, identificam-se o FNT α , IL-1 α e β , entre outros; contudo, o papel do sistema de endotelinas como marcador genético da cardiopatia reumática é obscuro⁶⁷.

Estudos conduzidos em animais, utilizando valvas mitrais, buscaram mostrar os níveis de expressão da ET-1 e seus receptores nesse tecido, sugerindo uma correlação entre os peptídeos e a mudança na composição dos folhetos com a idade⁶⁸. Apesar de terem sido utilizadas valvas mitrais mixomatosas, é possível fazer uma transposição dos resultados para as valvas reumáticas, igualmente ricas em colágeno e fibroblastos.

Por outro lado, a ET-1 pode representar a ligação entre alterações vasculares e o metabolismo acelerado do colágeno associado ao processo fibrótico em algumas doenças⁴¹. 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 tissular⁴¹. 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.

A ET-1 tem efeitos pró-fibróticos, agindo através de seus receptores A e B, encontrados nos fibroblastos. Neles, provoca aceleração da produção de matriz extracelular⁶⁹. Em tecidos onde essas células se encontram em quantidade, como na doença valvar reumática, e onde podem ser encontrados níveis aumentados de ET-1, pode-se esperar a progressiva alteração tecidual valvar como resultado.

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-1⁶. Através deles, as ações do sistema de endotelinas podem ser revertidas, traduzindo-se em benefício

clínico para muitos pacientes. Além do alívio sintomático produzido, existem situações outras em que tais medicações se mostraram igualmente benéficas, permanecendo especulativa sua utilização em outras condições patológicas⁶. Nesse sentido, sua indicação terapêutica em situações incomuns, como em pacientes com comorbidades do tecido conjuntivo, como tratamento a longo prazo, ou mesmo em estágios mais precoces, dependem do profundo conhecimento de suas ações, na saúde e na doença.

II. 3. A valva mitral

A valva mitral posiciona-se na transição atrioventricular esquerda, separando as cavidades atrial e ventricular. Possui dois folhetos: o anterior, bem maior e o posterior, menor. Ambos são divididos em zonas rugosa e lisa (a última na borda livre da valva). São separados no anel mitral pelas comissuras posteromedial e anterolateral. O anel fibroso mitral é formado por duas estruturas colagenosas: o trígono fibroso direito, localizado entre o septo membranoso atrioventricular, as valvas mitral e tricúspide, e a raiz aórtica; e o trígono fibroso esquerdo, na junção da valva mitral com a cúspide coronariana esquerda da valva aórtica⁷⁰. O anel posterior corresponde a 2/3 de todo o anel mitral⁷¹.

Comunicando a valva mitral ao miocárdio ventricular encontram-se as cordoalhas tendíneas e músculos papilares. Esses últimos são divididos em anterolateral e posteromedial, e deles surgem as primeiras, classificadas em cordoalhas de primeira ordem (que se fixam às bordas das válvulas), segunda ordem (mais espessas e menos numerosas, unidas às válvulas entre as zonas lisa e rugosa, e mais proeminentes para a válvula anterior) e terceira ordem (originadas na parede ventricular, fixam-se ao anel mitral posterior). Totalizam em torno de 25 feixes tendinosos⁷⁰.

A análise histológica do tecido valvar revela 3 camadas: a fibrosa, rica em colágeno e contínua com a cordoalha tendínea; a camada esponjosa, que cobre a face atrial e forma a borda da válvula (possui proteoglicanas, elastina e tecido conectivo em abundância, e pouco colágeno); uma cobertura fibroelástica, fina na face atrial e espessa na ventricular, chamada *ventricularis*⁷⁰. Essa última camada produz mais elastina e colágeno com o avançar da idade, tornando-se espessada. Existem, ainda, outras estruturas musculares e neurais, importantes na coaptação valvar⁷².

II. 4. Disfunção valvar mitral

Existem duas disfunções valvares, conhecidas como estenose e insuficiência, que não são mutuamente exclusivas, podendo coexistir. Definida como uma obstrução ao influxo de sangue no ventrículo esquerdo em nível da valva mitral - resultante de uma anormalidade estrutural - impedindo sua abertura durante a fase de enchimento diastólico daquele, a estenose mitral tem diferentes etiologias. A predominante é a cardite reumática, chegando a somar 99% das estenoses em algumas séries⁷³. Causas ditas não-reumáticas, como a calcificação anular ou valvar, deformidades congênitas, síndrome carcinóide, trombo atrial esquerdo, endocardite, pós comissurotomias ou implantes valvares protéticos, são menos comuns⁷⁰.

Quando não tratada, a EM 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. O aparecimento de sintomas pode surgir após um período de latência de 20 até 40 anos, tornando-se debilitantes uma década depois. 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%⁷⁴.

O achado macroscópico de espessamento e calcificação valvar e fusão comissural e de cordoalhas assemelha o aparato mitral a um funil. Isso provoca estreitamento do orifício valvar mitral e diminuição da área valvar correspondente, normalmente em torno de 4-5 cm², determinando o gradiente transmitral diastólico, que resulta na elevação da pressão atrial esquerda, com reflexos sobre a circulação venosa pulmonar. Mudanças iniciais sobre o leito venoso pulmonar são considerados protetores, evitando pressões excessivamente altas.

O paciente com estenose mitral pode permanecer assintomático por longos períodos de tempo⁷⁵, apesar do débito cardíaco decrescente e resistência venosa e arteriolar pulmonar aumentadas, e, eventualmente, alterações morfofuncionais da

vasculatura pulmonar⁷⁰. A gravidade da vasculopatia pulmonar é determinante no surgimento e agravamento dos sintomas nos pacientes com estenose mitral.

A sintomatologia associa-se com a área valvar encontrada, ainda que tal correlação não seja sempre confiável. Anteriormente precipitados pelo exercício, *stress* emocional, infecção, gravidez ou fibrilação atrial com alta resposta ventricular, os sintomas resultam da atividade cotidiana quando a área valvar é inferior a 2,5 cm². Surgem sintomas em repouso quando essa área é inferior a 1,5 cm². De acordo com dados como o gradiente médio, pressão sistólica de artéria pulmonar e área valvar, a gravidade da estenose mitral é avaliada, embora ainda não haja valor que a defina. Em pacientes com área valvar maior que 1,5 cm², gradiente médio menor que 5mmHg e pressão sistólica da artéria pulmonar menor que 30mmHg, classifica-se a estenose mitral como leve; aqueles com área valvar entre 1-1,5 cm², gradiente médio entre 5-10mmHg e pressão sistólica da artéria pulmonar entre 30-50mmHg, encontram-se classificados como portadores de EM moderada. Finalmente, dados de área valvar menor que 1cm², gradiente médio maior que 10mmHg e pressão sistólica da artéria pulmonar maior que 50mmHg, definem a EM como grave⁷⁴.

A regurgitação ou insuficiência mitral é resultado do mau funcionamento ou interação dos componentes valvares, subvalvares ou das câmaras cardíacas esquerdas. A etiologia mais comum dessa disfunção valvar é a degeneração mixomatosa (prolapso mitral), em 29-70% dos casos. Outras causas comuns são a insuficiência mitral isquêmica (resultante de isquemia ou ruptura de músculo papilar após insulto miocárdico isquêmico), insuficiência funcional (secundária a cardiomiopatia dilatada), doença reumática, calcificação do anel mitral, endocardite infecciosa, entre outras⁷⁶.

O átrio esquerdo dilata-se progressivamente, acompanhando a regurgitação valvar crônica. Gradualmente, a pressão atrial esquerda pode elevar-se. Contudo, aumentos pronunciados da resistência vascular pulmonar não são comuns, ao contrário do que acontece com a estenose valvar⁷⁰. A sintomatologia em pacientes portadores de insuficiência mitral moderada pode ser inexpressiva, permanecendo esse assintomático durante anos. Isso acontece devido a adaptação do ventrículo esquerdo ao aumento do trabalho. O desenvolvimento de baixo débito cardíaco ou congestão pulmonar acompanha-se de fadiga, fraqueza, dispnéia aos esforços e palpitações⁷⁰.

A regurgitação mitral pode ser classificada ecocardiograficamente, de acordo com critérios qualitativos e quantitativos. Entre os primeiros, encontramos a área do jato central e a medida da *vena contracta*; já os critérios quantitativos são o volume regurgitante, a fração regurgitante e a área do orifício regurgitante. Objetivamente, a insuficiência é considerada leve quando o jato central é menor que 4cm^2 ou menor que 20% da área do átrio esquerdo, a *vena contracta* é inferior a 0,3cm, o volume regurgitante é menor que 30ml, a fração regurgitante é menor que 30% e a área do orifício regurgitante é inferior a $0,20\text{cm}^2$. É considerada moderada quando o jato central tem características intermediárias entre leve e grave, a *vena contracta* tem medida entre 0,3 a 0,69cm, o volume regurgitante encontra-se entre 30 e 59ml, a fração regurgitante está entre 30 e 49% e a área do orifício regurgitante tem valores entre 0,20 e $0,39\text{cm}^2$. Finalmente, quando o jato central é grande ou superior a 40% da área do átrio esquerdo, a *vena contracta* é superior ou igual a 0,7cm, o volume regurgitante é maior que 60ml, a fração regurgitante é menor que 50% e a área do orifício regurgitante é superior a $0,40\text{cm}^2$. Além desses parâmetros, a função ventricular, determinada pela fração de ejeção e pelo diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo, auxiliam na orientação terapêutica⁷⁴.

Em ambas as disfunções valvares mitrais, a utilização da ecocardiografia transtorácica ou transesofágica tem se tornado importante, não só para o diagnóstico, mas para o acompanhamento da dilatação de câmaras e magnitude do fluxo ou refluxo transvalvar. Através do Doppler de fluxo colorido, tal fluxo pode ser quantificado pelo seu padrão, direção, velocidade, duração e intensidade. Pode-se avaliar as condições e características do aparelho subvalvar, morfologia das cordoalhas, mobilidade dos folhetos. Além disso, cálculos indiretos da área valvar podem ser feitos, auxiliando a classificação da disfunção valvar.

III. OBJETIVOS

III. 1. Objetivos Gerais

O objetivo geral deste projeto é determinar, mediante técnicas moleculares, a expressão dos genes da endotelina e dos seus receptores em valvas mitrais reumáticas.

III. 2. Objetivos Finais

1. Desenvolver rotinas de técnicas moleculares na identificação de genes da ET-1 e de seus receptores em tecido valvar;
2. Investigar se existe correlação entre a presença dos genes de ET-1, ETRA e ETRB nas valvas e:
 - os diferentes subgrupos pesquisados (valvopatia mitral pura, doença mitro-aórtica e submetidos a reoperação);
 - o sexo dos pacientes, e a faixa etária na qual se encontram (inferior ou superior a 50 anos);
 - e os sintomas apresentados.

IV. METODOLOGIA

IV. 1. Material

Foram coletadas 27 amostras de válvulas junto a serviços de Cirurgia Cardiovascular (Instituto do Coração InCor-DF e Hospital de Base do DF), posteriormente submetidas a 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 válvula nativa por prótese.

IV. 2. Critérios de inclusão e exclusão

O procedimento cirúrgico foi realizado após coleta de exames laboratoriais sumários (bioquímica sanguínea e hemograma; ecocardiograma transtorácico; cineangiocoronariografia para aqueles com idade superior a 40 anos ou com necessidade de estudo mais aprofundado de pressões intracardíacas).

Foram incluídos no estudo portadores de valvopatia mitral de características reumáticas ao ecocardiograma, isolada ou em associação à outra valvopatia (aórtica, tricúspide), com indicação classe I de intervenção cirúrgica por critérios pré estabelecidos nas Unidades de Cirurgia Cardiovascular escolhidas, sem indicação de valvotomia percutânea ou reparo valvar (comissurotomia/valvoplastia mitral). Era considerada indicação pacientes com estenose mitral moderada ou grave (área valvar mitral $\leq 1,5\text{cm}^2$) e classificação funcional III ou IV (NYHA). Pacientes com insuficiência, sintomáticos (NYHA II, III e IV) com função ventricular esquerda normal (fração de ejeção $> 60\%$ e diâmetro endossistólico de ventrículo esquerdo $< 45\text{mm}$), ou com disfunção leve de ventrículo esquerdo (fração de ejeção $50-60\%$ e diâmetro endossistólico de ventrículo esquerdo $45-50\text{mm}$) ou moderada (fração de ejeção $30-50\%$ e diâmetro endossistólico de ventrículo esquerdo $50-55\text{mm}$). Foram incluídos pacientes já submetidos a cirurgia de comissurotomia mitral, e que concordasse em participar do estudo (através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE).

Foram excluídos do estudo pacientes candidatos a valvotomia percutânea ou cirurgia para reparo valvar; portadores de outras doenças cardiovasculares que tivessem

indicação cirúrgica (doença coronariana obstrutiva, aneurismas de ventrículo esquerdo, anomalias cardíacas congênitas cianóticas ou acianóticas); já operados com troca valvar mitral (ausência de tecido valvar mitral nativo); não concordância em participar do estudo.

Esses 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 (Anexo I). Dados pessoais e epidemiológicos dos pacientes foram colhidos, bem como algumas informações a respeito da sintomatologia e classificação funcional (NYHA) ecocardiográficas (valvopatia mitral predominante, estimativa de área valvar, estimativa de pressão sistólica pulmonar, área do orifício regurgitante efetivo, volume regurgitante).

Imediatamente após a sua retirada, o segmento da válvula obtido era fragmentado obedecendo o seguinte: considerando toda a extensão do fragmento retirado, esse sempre tinha tecido valvar da extremidade livre até próximo ao anel mitral; esse tecido valvar era, então, separado em 3 segmentos grosseiramente iguais em tamanho, nomeados M1, M2 e M3 (Figura 1): 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, unicamente para análise histológica.



Figura 2. Válvulas Mitrals Reumáticas. Fragmento retirado em cirurgia do paciente 9. Encontraram-se músculos papilares macroscopicamente fibrosados e calcificados, além de calcificação e retração dos folhetos anterior (à direita na foto) e posterior (à esquerda). Autor: Edmilson B. de Moura, 2006.

IV. 3. Métodos

IV. 3. 1. Histologia

Todas as válvulas retiradas e fragmentadas foram fixadas em solução de formalina neutra 10% (pH 7,0), sendo posteriormente submetidas a descalcificação, inclusão em parafina e corte ao Micrótomo, a uma espessura de 4µc. A coloração foi feita pela técnica de hematoxilina e eosina. Cada segmento foi analisado quanto à presença de fibrose, calcificação, ossificação, neoformação vascular e infiltrado mononuclear.

IV. 3. 2. 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 válvula mitral (M1, M2 e M3) foi extraído separadamente usando 100µL do reagente TRIZOL.

Esse método consiste na maceração de aproximadamente 100µg 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 à repetidas centrifugações, purificação com clorofórmio, precipitação com isopropanol e limpeza com etanol 75%.

IV. 3. 3. Quantificação do RNA por espectrofotometria

Foi realizada a diluição de 4µL RNA em 196µL de água milliQ, totalizando 200µL 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 (Maniattis). A avaliação de pureza foi feita por meio da razão entre os valores de absorbância obtidos à 260nm e

280nm (A260 / A280), sendo consideradas viáveis as amostras com valores entre 1,6 e 2,6.

IV. 3. 4. Obtenção de cDNA

Pela reação de transcriptase reversa (RT) foi obtido o cDNA total dos 27 pacientes analisados. Para essa reação foi utilizado o RNA, extraído pelo método do Trizol, e ajustado para uma concentração final de 1µg/µl por regra de três simples. Foi seguido o procedimento recomendado para o kit ImProm-II™ Reverse Transcriptase, da Promega. O oligonucleotídeo oligodT (dT₁₈) estava concentrado à 0,5 µg.

IV. 3. 5. 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 (seqüência NM 001955 gi110624717 - NCBI), ET_A (seqüência NM 001957 gi4503464 - NCBI) e ET_B (seqüência NM 000115 gi4557546 - NCBI). Como controle constitutivo das amostras foi utilizado o gene GAPDH (BC029640). Todos os primers foram diluídos para concentração de 10mM. Foram utilizados os reagentes da Invitrogen para a reação, na qual usou-se 1,25U de *Taq* DNA polimerase (5U/µl), 0,25µM de cada primer e dNTPs concentrados à 0,1mM cada. Os programas para amplificação utilizados foram definidos de acordo com o Certificado de Análise da empresa fabricante dos primers (Invitrogen Brasil LTDA.). O volume final da reação foi de 10µL, sendo essas realizadas em triplicata. Todas as amostras analisadas foram verificadas em gel de agarose 1%.

Para as reações de PCR com o gene GAPDH, foram utilizadas 23 amostras; para os genes ETRB e ETRA foram analisadas 20 amostras, enquanto para a ET-1, 19 amostras foram verificadas. A quantidade de amostras utilizadas nas reações de PCR, para cada gene específico, variou tendo em vista que determinados pacientes apresentavam uma concentração reduzida de material biológico – limitante para as análises moleculares – além de alguns estarem comprometidos com pesquisas mais complexas envolvendo PCR em tempo real – daí a necessidade de se poupar esse material biológico.

IV. 3. 6. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

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

IV. 4. 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, e é considerado significativo se inferior a 0,05. Foi examinada a correlação entre a presença do gene da ET-1 e seus receptores A e B e o sexo dos pacientes, as faixas etárias inferior e superior a 50 anos, os diversos sintomas apresentados.

Foi feita, também, uma análise comparativa entre os grupos de pacientes valvopatas mitrais, mitro-aórticos e pacientes reoperados, no tocante a presença dos mencionados genes, utilizando-se o teste do χ^2 .

V. RESULTADOS

A amostra final foi de 27 pacientes, submetidos a tratamento cirúrgico entre os meses de março de 2006 e setembro de 2007, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão definidos previamente. Dois deles foram operados no Hospital de Base do DF e 25 no Instituto do Coração do DF. Todos os pacientes consentiram em participar do trabalho. Quinze pacientes foram do sexo feminino e 12 do masculino, com uma média de idade de 46,2 anos (16-67 anos; DP: 12,6 – tabela 1). Do total da amostra, apenas 10 pacientes (3, 4, 7, 9, 11, 18, 20, 22, 24, 25 - 37% dos pacientes) 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, observou-se pacientes nas quatro classificações funcionais (NYHA), assim distribuídos: um paciente na CF I (paciente 21 - 3,7% da população); quatorze pacientes na CF II (pacientes 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 24 e 26 – 51,8%); onze na CF III (pacientes 4, 5, 6, 8, 13, 14, 15, 22, 23, 25 e 27 - 40,7%) e um paciente na CF IV (paciente 12 - 3,7%). Em termos de prevalência de lesão valvar, observamos dupla lesão em 19 pacientes (70,3%), cinco pacientes com insuficiência valvar pura (18,5%) e os três restantes (11,2%) com estenose valvar pura (tabela 1).

Os dados ecocardiográficos obtidos foram a área valvar, o gradiente transvalvar mitral e a pressão sistólica da artéria pulmonar (nos casos de estenose mitral), e volume regurgitante e orifício regurgitante efetivo (na insuficiência mitral). Os achados revelaram uma área valvar média de $1,1\text{cm}^2$ (DP: 5,3; $0,6-1,9\text{cm}^2$ – dados de todos os 22 pacientes), o gradiente transvalvar médio de 14,8mmHg (DP: 6,9; 6-32mmHg – dados de 20 dos 22 pacientes, 90,9%), pressão sistólica média da artéria pulmonar 55,9mmHg (DP: 16,4; 21-100mmHg – dados de 21 dos 22 pacientes, 95,4%), volume regurgitante médio de 88,3ml (DP: 61,3; 58-209ml – dados de 6 dos 24 pacientes, 25%) e orifício regurgitante efetivo médio de $0,47\text{cm}^2$ (DP: 0,26; $0,27-1\text{cm}^2$ – dados de 6 dos 24 pacientes, 25% - tabela 1).

Tabela 1. Dados ecocardiográficos dos pacientes.

Paciente	Sexo	Idade	CF (NYHA)	Disfunção valvar	Área valvar (PHT)	G.T.M.	PSAP	V.R.	O.R.E.
1	M	43	2	D	1	17	55	-	-
2	F	54	2	I	1,9	7	56	83	0,5
3	M	16	2	I	-	-	-	-	0,27
4	F	51	3	D	1,1	10	40	-	-
5	F	49	3	D	1,9	8	51	58	-
6	F	22	3	D	0,6	13	60	-	-
7	M	35	2	D	1,4	12	-	-	-
8	F	67	3	D	1	14	56	209	1
9	M	62	2	D	-	9	70	-	-
10	F	50	2	D	0,9	19	-	-	-
11	F	47	2	D	1	-	51	-	-
12	M	62	4	I	-	-	63	-	-
13	F	63	3	D	0,9	17	71	-	-
14	F	44	3	D	0,9	14	40	-	-
15	M	39	3	D	1,1	9	21	-	-
16	F	51	2	D	1	18	55	76	0,4
17	F	59	2	D	1	32	75	-	-
18	M	46	2	D	1,4	12	100	-	-
19	F	50	2	E	0,8	22	74	-	-
20	M	38	2	I	-	-	35	68	0,4
21	M	52	1	I	3,1	5	49	36	0,3
22	F	26	3	D	1,4	-	46	-	-
23	M	49	3	D	1	11	55	-	-
24	F	52	2	E	0,9	12	44	-	-
25	F	39	3	D	0,8	28	64	-	-
26	M	54	2	D	-	-	-	-	-
27	M	30	3	E	1	23	-	-	-
Média					1,1	14,8	55,9	88,3	0,47
Desvio padrão					5,3	6,9	16,4	61,3	0,26

CF (NYHA): classe funcional (*New York Heart Association*); I/E/D: insuficiência valvar/estenose valvar/dupla lesão valvar; PHT: *pressure half-time*; G.T.M.: gradiente transvalvar médio; PSAP: pressão sistólica da artéria pulmonar; V.R.: volume regurgitante; O.R.E.: orifício regurgitante efetivo.

As manifestações clínicas mais comuns foram a dispnéia (25 dos 27 pacientes, 92,5%), a dor torácica (9 pacientes, 33,3%), a dispnéia paroxística noturna (7 pacientes, 25,9%), o edema de MMII (3 pacientes, 11,1%) e a ortopnéia (em 3 pacientes, 11,1%). As palpitações apresentaram-se em 2 pacientes (7,4%) e a taquipnéia e os escarros hemoptóicos manifestaram-se cada qual em apenas 1 paciente (3,7%). Um paciente se dizia assintomático durante a internação (tabelas 2, 3 e 4; figura 3).

Figura 3. Prevalência dos sintomas nos indivíduos.

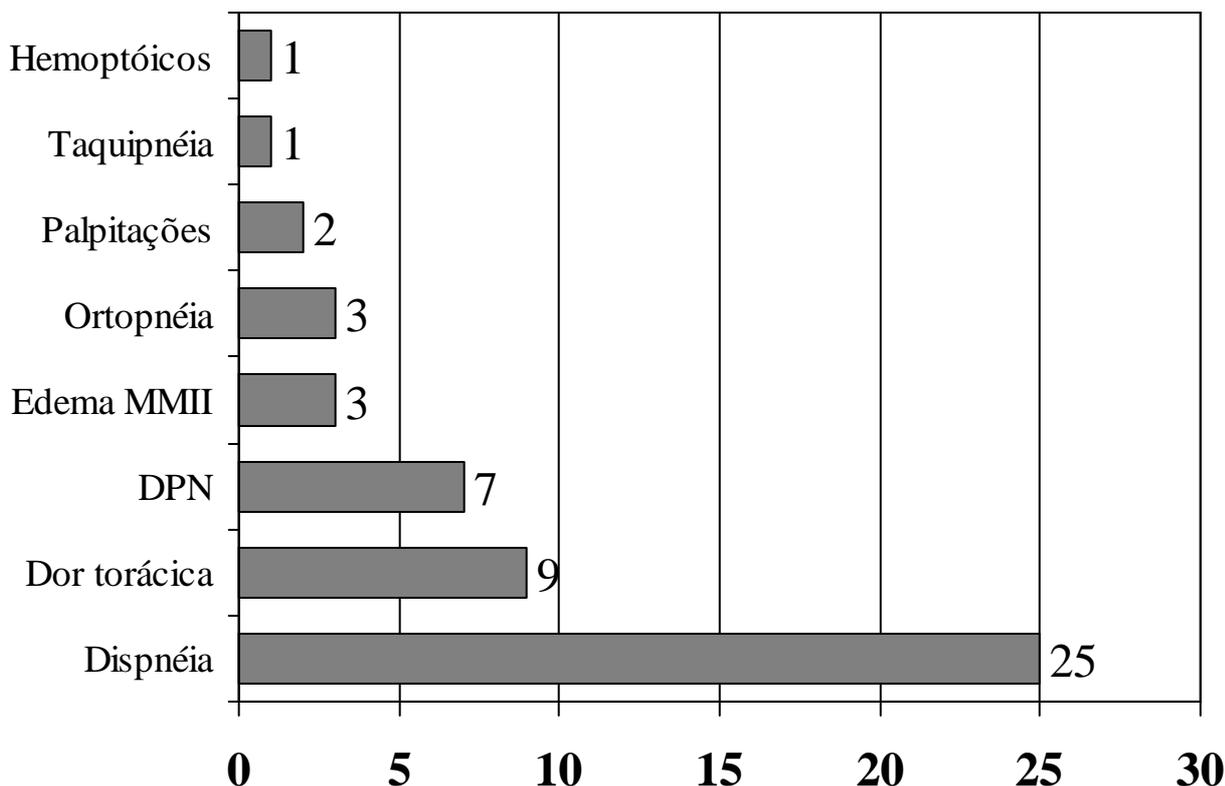


Tabela 2. Dados clínicos e análise molecular individualizada dos pacientes com acometimento valvar unicamente mitral.

Paciente	CF (NYHA)	Gravidade	Sintomatologia	ET-1	ETRA	ETRB
1	2	Moderado	1	+	+	+
5	3	Grave	1,2,3	+	+	
6	3	Grave	1,3,5		+	
9	2	Grave	1,2,3,5,6	+	+	+
10	2	Grave	1			
12	4	Grave	1,3,5	+	+	+
13	3	Grave	1		+	+
15	3	Grave	1,2		+	
16	2	Grave	1,2		+	
17	2	Moderado	1			
18	2	Grave	1,8		+	
19	2	Grave	1,7			
24	2	Grave	1,3		+	
25	3	Grave	1			
26	2	Moderado	1		+	+

CF (NYHA): classe funcional (*New York Heart Association*); gravidade: classificação ecocardiográfica; sintomatologia: dispnéia (1); dor torácica (2); dispnéia paroxística noturna (3); edema MMII (4); ortopnéia (5); hemoptóicos (6); palpitações (7); taquipnéia (8). ET-1 (+): presença do gene da endotelina-1; ETRA: presença do gene do receptor A da endotelina; ETRB (+): presença do gene do receptor B da endotelina.

Tabela 3. Dados clínicos e análise molecular individualizada dos pacientes com acometimento valvar mitro-aórtico.

Paciente	CF (NYHA)	Gravidade	Sintomatologia	ET-1	ETRA	ETRB
3	2	Moderado	2	+	+	
7	2	Grave	1		+	
11	2	Grave	1,2			
14	3	Grave	1,2,4	+	+	
20	2	Grave	1,2,7		+	
21	1	Grave	-		+	+
27	3	Grave	1			

CF (NYHA): classe funcional (*New York Heart Association*); gravidade: classificação ecocardiográfica; sintomatologia: dispnéia (1); dor torácica (2); dispnéia paroxística noturna (3); edema MMII (4); ortopnéia (5); hemoptóicos (6); palpitações (7); taquipnéia (8). ET-1 (+): presença do gene da endotelina-1; ETRA: presença do gene do receptor A da endotelina; ETRB (+): presença do gene do receptor B da endotelina.

Tabela 4. Dados clínicos e análise molecular individualizada dos pacientes submetidos a reoperação mitral

Paciente	CF (NYHA)	Gravidade	Sintomatologia	ET-1	ETRA	ETRB
2	2	Grave	1,3,4	+	+	
4	3	Moderado	1			
8	3	Grave	1	+	+	
22	3	Grave	1,2	+	+	+
23	3	Grave	1,3,4	+	+	

CF (NYHA): classe funcional (*New York Heart Association*); gravidade: classificação ecocardiográfica; sintomatologia: dispnéia (1); dor torácica (2); dispnéia paroxística noturna (3); edema MMII (4); ortopnéia (5); hemoptóicos (6); palpitações (7); taquipnéia (8). ET-1 (+): presença do gene da endotelina-1; ETRA: presença do gene do receptor A da endotelina; ETRB (+): presença do gene do receptor B da endotelina.

No tocante a abordagem cirúrgica, foram submetidos a reoperação cinco 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 (tabela 1 - anexo) mostrou uma razão entre absorbâncias dentro do intervalo considerado adequado. Vinte e três amostras foram submetidas a realização de cDNA.

A qualidade do cDNA sintetizado bem como a reação de PCR desenvolvida foram analisadas por meio da amplificação do gene constitutivo GAPDH, em 23 das 27 amostras estudadas. Verificou-se uma amplificação positiva, por meio de análise em gel de agarose 1%, para esse gene em todos os cDNA sintetizados.

As análises referentes ao receptor A da endotelina revelaram a expressão desse gene em 20 pacientes analisados por meio da técnica de PCR – 74% do total de pacientes utilizados no estudo e 100% das amostras analisadas molecularmente.

A expressão do receptor B da endotelina foi detectada em 7 amostras (35% dos 20 pacientes analisados), como demonstrado nas Tabelas 2, 3 e 4. A endotelina 1 apresentou amplificação positiva em 12, das 19 amostras analisadas (63,15%).

V. 1. Histologia

Após a coleta dos fragmentos valvares, doze deles foram submetidos a inclusão em parafina e coloração pela técnica de hematoxilina e eosina. Posteriormente, analisadas quanto a presença de fibrose, calcificação, ossificação, neoformação vascular, infiltrado mononuclear. Foram feitas lâminas, identificadas como M1, M2 e M3, dependendo da disponibilidade de material, priorizando a utilização do material 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 foi visualizado processo inflamatório com celularidade alta (Figura 6), vascularização do tecido, com capilares permeando-o (destacando-se a maior vascularização tecidual relativamente às demais áreas – Figura 8), colágeno transformado ou neoformado (hialinização do colágeno). Observou-se 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; também foi visualizada ossificação (Figura 9). Na análise histológica do segmento M1, foram encontrados as mesmas características já citadas anteriormente, exceto pela ausência de calcificação ou ossificação. Em termos de achados histológicos individuais, foi encontrada (Tabela 5):

Tabela 5. Dados histológicos individualizados dos pacientes.

Paciente	Histologia														
	Fibrose			Neoformação Vascular			Infiltrado de Mononucleares			Calcificação			Ossificação		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
2	x	x	x		x			x							
5	x	x	x		x			x							
6			x			X				x					
8	x	x	x			X				x					
9	x	x	x		x			x			x				x
10	x	x	x												
11	x	x	x	x		X									
12	x	x	x												
13			x											x	
14	x	x	x			X									
15	x	x	x		x	X									
22	x	x	x	x				x							x

M1/M2/M3: fragmentos extraídos em regiões próximas ao anel mitral, intermediária e próxima à borda livre valvar, respectivamente; “X”: presença do achado histológico.

- Fibrose em todos os pacientes nas amostras M3 (2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 25, 26); em 10 pacientes nas amostras M2 e M1 (2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 25, 26), 83,3% do total de pacientes analisados (figuras 3 e 5).
- Neoformação vascular em 9 pacientes (2, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 22), 75% do total de pacientes analisados; encontrada em duas amostras M1 (22,2%), quatro amostras M2 (44,4%), cinco amostras M3 (55,5%) e em dois pacientes (11 e 15 – 22,2%), foi encontrada em dois fragmentos simultaneamente (M1/M3 e M2/M3, respectivamente – figura 7).
- Infiltrado de mononucleares em 6 pacientes (2, 5, 6, 8, 9, 22), 50% do total de pacientes analisados; encontrado em uma amostra M1 (16,6%), três amostras M2 (50%), duas amostras M3 (33,3%) e em nenhum paciente foi encontrado em dois ou mais fragmentos simultaneamente (figuras 3 e 6).
- Calcificação em 3 pacientes (9, 13, 22), 25% do total de pacientes analisados; não foi encontrada em amostra M1, encontrada em uma amostra M2 (33,3%), duas amostras M3 (66,6%) e em nenhum paciente foi encontrado em dois ou mais fragmentos simultaneamente (figuras 3 e 4).
- Ossificação em apenas uma amostra (M2) do paciente 9, 8,3% do total de pacientes analisados (figura 8).

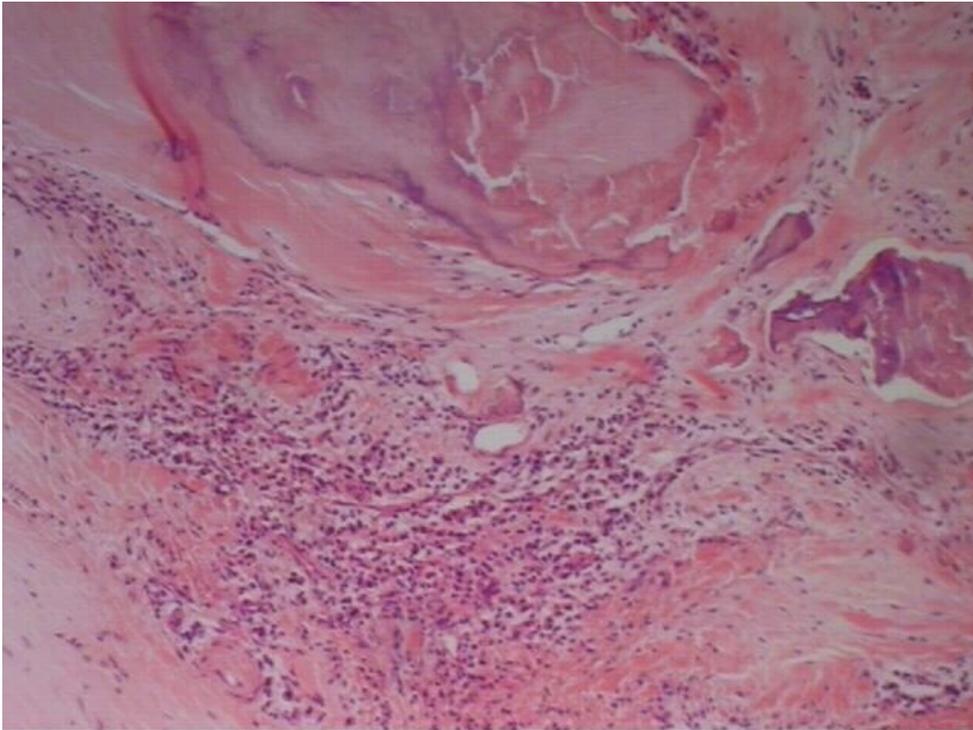


Figura 4. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando calcificação, fibrose e infiltrado mononuclear. HE, 200x. Paciente 9, segmento M2. UnB-FM, 2006.

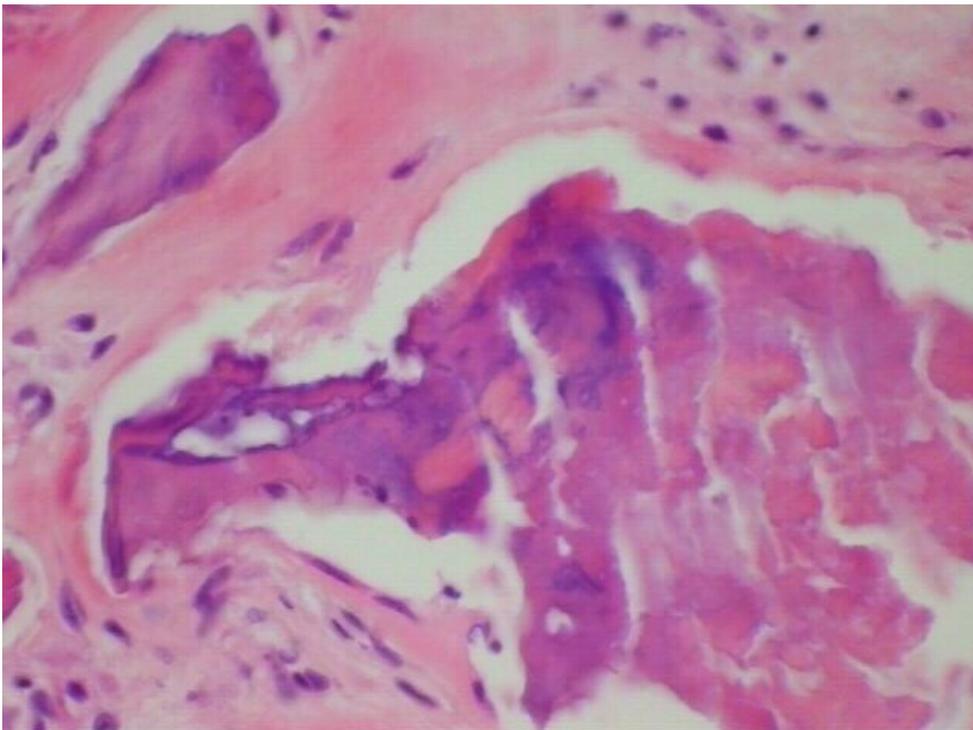


Figura 5. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando calcificação. HE, 400x. Paciente 9, segmento M2. UnB-FM, 2006.

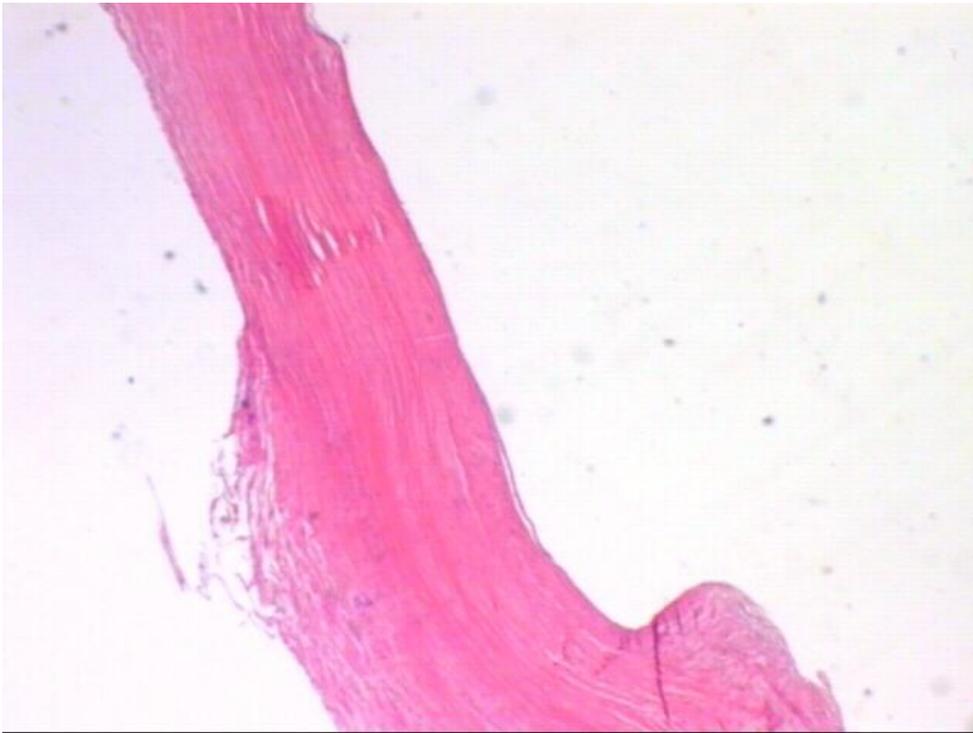


Figura 6. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando fibrose. HE, 100x. Paciente 8, segmento M3. UnB-FM, 2006.

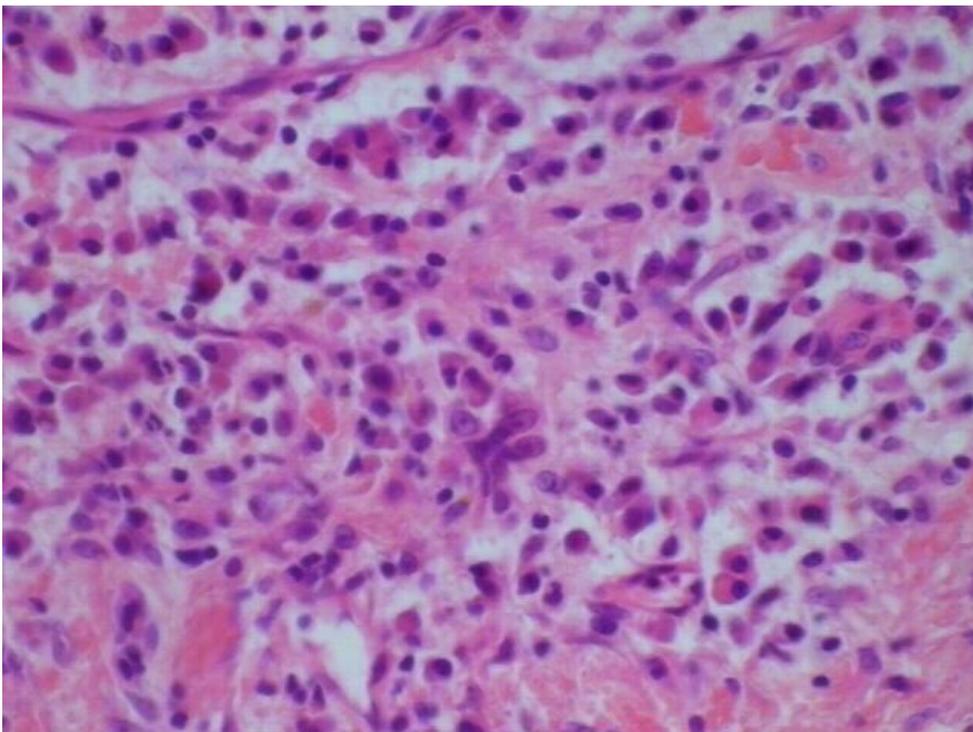


Figura 7. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando infiltrado de mononucleares. HE, 400x. Paciente 9, segmento M2. UnB-FM, 2006.

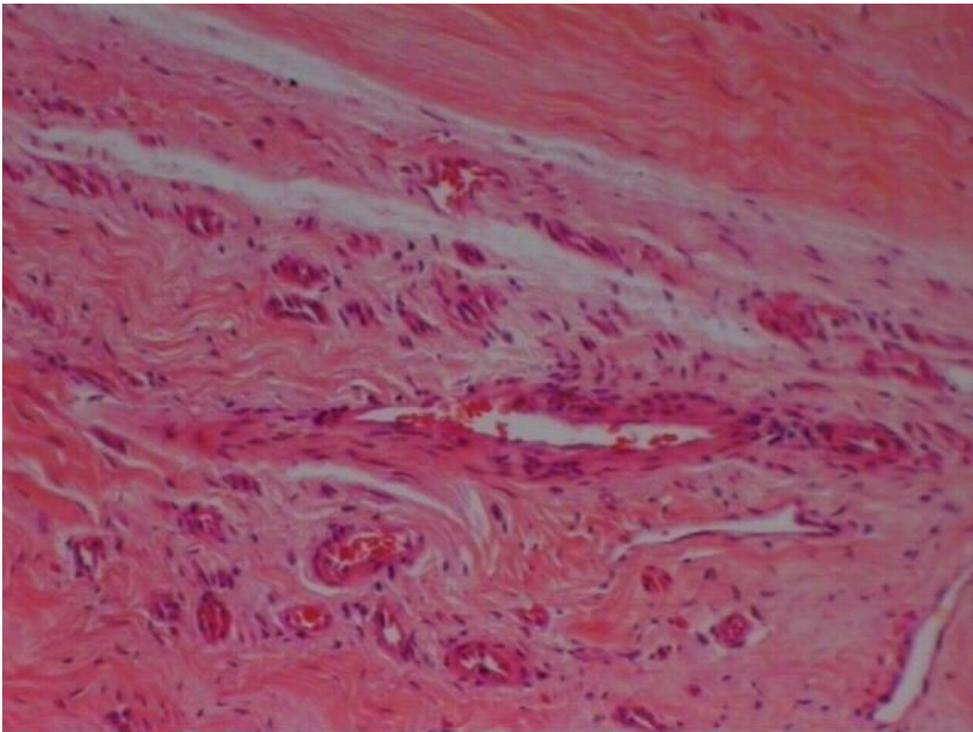


Figura 8. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando neoformação vascular. HE, 200x. Paciente 8, segmento M3. UnB-FM, 2006.

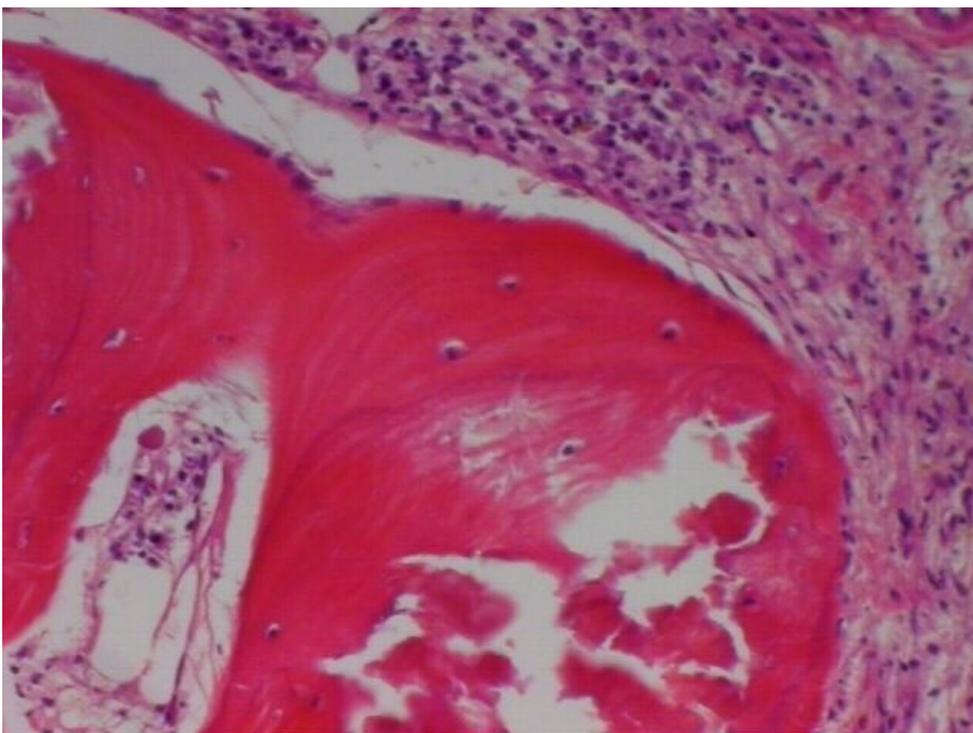


Figura 9. Corte histológico do folheto valvar mitral anterior, mostrando ossificação. HE, 200x. Paciente 9, segmento M2. UnB-FM, 2006.

A análise estatística dos dados obtidos não mostrou correlação, dentro da população analisada, entre a presença dos genes de ET-1, ETRA e ETRB com a faixa etária superior ou inferior a 50 anos, ou com o sexo dos pacientes (tabela 6).

Tabela 6. Dados do p-valor, faixa etária e sexo x presença dos genes (teste exato de Fisher).

	ET-1	ETRA	ETRB
Faixa etária (<50, ≥50 anos)	0,69	0,67	0,20
Sexo	0,70	0,09	0,18

ET-1: presença do gene da endotelina-1; **ETRA:** presença do gene do receptor A da endotelina; **ETRB:** presença do gene do receptor B da endotelina.

A relação entre os diversos sintomas e a presença do gene da ET-1 não foi estatisticamente significativa, como também não foi a presença do ETRB (tabela 7).

Tabela 7. Dados do p-valor, sintomas x presença dos genes (teste exato de Fisher).

Sintomas	ET-1	ETRA	ETRB
Dispneia	0,65	0,06	0,42
Dor torácica	0,55		0,69
DPN	0,08		0,49
Edema MMII	0,05		0,45
Ortopneia	0,54		0,54
Hemoptóicos	0,40		0,22
Palpitações	0,49		0,59
Taquipneia	0,59		0,77

ET-1: presença do gene da endotelina-1; **ETRA:** presença do gene do receptor A da endotelina; **ETRB:** presença do gene do receptor B da endotelina.

Também não houve associação estatística entre a presença ou não dos genes da ET-1, ETRA e ETRB entre os subgrupos de pacientes (valvopatas mitrales, mitro-aórticos e pacientes reoperados -tabela 8).

Tabela 8. Dados do p-valor, subgrupos x presença / ausência dos genes (teste χ^2).

Subgrupo	ET-1	ETRA	ETRB
Mitral Mitro-aórtico Reoperado	0,08	0,94	0,60

ET-1: presença do gene da endotelina-1; **ETRA:** presença do gene do receptor A da endotelina;
ETRB: presença do gene do receptor B da endotelina.

VI. DISCUSSÃO

O estudo mostrou a expressão do gene da endotelina-1 em 12 das 19 amostras analisadas (63,15%) e de seu receptor A em 20 pacientes analisados por meio da técnica de PCR – 74% do total de pacientes utilizados no estudo e 100% das amostras analisadas pela técnica mencionada. A expressão do gene do receptor B foi mais modesta (sete das 20 amostras analisadas – 35%).

As valvas extraídas encontravam-se, invariavelmente, com os clássicos achados de fibrose com ou calcificação, espessamento, retração, bem como fusão de comissuras e cordoalhas tendíneas³. Foi possível observar a heterogeneidade nos segmentos valvares, no tocante a presença de achados histológicos típicos da doença reumática. Estudo semelhante já abordou tal aspecto na literatura, considerando, no entanto, a composição de diferentes segmentos em sua secção longitudinal (extremidade livre até sua inserção no anel mitral¹⁴). Sabe-se que a ET-1 tem importante função reguladora na deposição de colágeno nos tecidos¹⁸; 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.

A etapa de extração do RNA das amostras demonstrou a expressão desses vários genes nas valvas mitrais. Não existe protocolo para a maceração de tecido biológico tão endurecido, pela abundância de fibrose tecidual (resultante da própria degeneração característica da doença). O processo requeria perda e degradação mínimas do fragmento (muitas vezes exíguo). Alguns métodos tem sido indicados na literatura recente, mas em valvas não-reumáticas⁷⁸. 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 esse é oriundo dessas últimas. A amostra de RNA resultante, invariavelmente, foi escassa.

O achado mais importante desse estudo foi a presença de ETRA em todas as amostras submetidas à análise molecular. Tal resultado talvez se justifique por ser esse o receptor predominante nos miócitos cardíacos⁴; além disso, justificaria transformações típicas da doença, sendo esse receptor correlacionado com processos inflamatórios,

exuberantes na doença reumática em sua fase exsudativa, e também presentes na fase proliferativa³.

Os receptores B 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 outros²⁵. Além disso, tais receptores caracterizam-se pela rápida dessensibilização e internalização, cujos resultados na concentração tissular são pouco estudados⁷⁷. O tempo de convívio com a doença valvar reumática, associado a outras características individuais, podem ser possíveis determinantes da manifestação de gene do ETRB no tecido valvar mitral. Essa afirmação demandará pesquisa específica nesse sentido, e não foi enfoque de nosso trabalho. Além disso, dependerá da coleta fidedigna de dados epidemiológicos, como o tempo de doença. Essa informação, todavia, foi de difícil obtenção, já que muitos pacientes não sabem relatar com precisão quando adquiriram a doença, diferentemente do que se observa em outros estudos⁹. Muitos definem tempo de doença como tempo do diagnóstico dessa, ou do início dos sintomas, não sabendo determinar precisamente o episódio inicial ou mesmo a presença de surtos no período.

Conforme avaliado na tabela 5, os pacientes reoperados nessa série foram, em sua maioria, mulheres. Dentre elas (80%, quatro dentre cinco pacientes), setenta e cinco por cento (três entre as quatro mulheres) encontravam-se na menopausa (pacientes 2, 4 e 8). Não obstante tratem-se de números inexpressivos, a condição hormonal diferenciada dessas pessoas pode ser a responsável pelas mudanças na expressão dos genes codificadores dos peptídeos do sistema de endotelinas. Sabe-se que o estrógeno, cujos níveis se reduzem na menopausa, inibe a síntese da ET-1 pelo endotélio³⁵; consequentemente, a produção de ET-1 estaria, teoricamente, aumentada.

Conforme já destacado 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 células⁵⁹. Não sabemos se isso se repete *in vivo* ou em outros tecidos (como o valvar), nem qual é seu real impacto sobre a produção desses receptores. Entretanto, pode existir uma conexão entre o

remodelamento arterial e hipertrofia ventricular¹⁸ e o predomínio de um subtipo de receptor sobre o outro. Tal afirmação depende, ainda, de novas pesquisas, que abordem a busca desses peptídeos em tecido mitral.

Devido a ausência de estudos identificando a ET-1 e seus receptores alvo em tecido mitral, desconhece-se se a presença daquela inibe a formação desses, conforme já identificado em valvas aórticas⁷⁸. Esse comportamento poderia justificar, em parte, os resultados encontrados no atual estudo, onde a presença da ET-1 promoveria um *feedback* negativo na produção do ETRB. No entanto, por ser o presente estudo apenas de quantificação de genes dos citados peptídeos, essa observação necessita de comprovação.

Dentro da população estudada, não observamos associação estatística entre as variáveis destacadas e a presença dos genes em questão. Os testes mostraram uma forte tendência de que haja associação entre a presença desse gene e as variáveis edema de MMII ($p=0,056$) e dispnéia 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 estreptococcia, 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 um acompanhamento ambulatorial regular, encaminharia-os ao tratamento invasivo, antes do surgimento de complicações.

Talvez a união de estratégias adequadas nas políticas de saúde 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.

VII. CONCLUSÃO

Em resumo, o presente estudo mostrou que todos os pacientes (submetidos a análise molecular), independentemente das características individuais (sexo, idade, classe funcional, alteração valvar mitral), expressaram a presença do gene do receptor A. Daqueles pacientes reoperados, quatro são mulheres e menopausadas; uma delas encontrava-se em idade fértil e expressou os três genes estudados. Não houve diferença estatística quanto a expressão dos genes da ET-1 e seus receptores, entre os subgrupos estudados (valvopatas mitrais, mitro-aórticos e pacientes reoperados). Observa-se que houve uma tendência à maior presença de ET-1, na população estudada, naqueles pacientes com edema de membros inferiores e dispnéia paroxística noturna. Entre eles, houve um maior número de mulheres.

A busca de resultados que confirmem a participação da valva mitral reumática como sítio produtor de ET-1 e receptores A e B, provando ou negando também a contribuição do sistema de endotelinas como auxiliar no processo inflamatório que danifica a valva, suprirá importante lacuna no conhecimento da história natural da doença reumática. Essas informações contribuirão decisivamente para apontar novas abordagens e terapêuticas, talvez utilizando antagonistas dos receptores das endotelinas como adjuvantes no tratamento, trazendo novas expectativas para a doença reumática.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Rheumatic fever and rheumatic heart disease. Geneve: WHO expert consultation, 2004. (WHO Technical Report – 923).
2. Carapetis JR. Rheumatic heart disease in developing countries. *N Engl J Med* 2007; 357: 439-41.
3. Meneghelo ZM, Ramos AIO. Lesões das valvas cardíacas – diagnóstico e tratamento. 1ª edição. São Paulo: Atheneu; 2007.
4. Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. Contrasting actions of endothelin ETA and ETB receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47 (12): 1-29.
5. Motte S, McEntee K, Naeije R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacology & Therapeutics* 2006; 110 (3): 386-414.
6. 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: 1105–1119.
7. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 16066-8.
8. Leslie SJ, Webb DJ. Endothelin ligands and their experimental effects within the human circulation. In: Warner TD, ed. *Endothelin and its inhibitors*. New York: Springer, 2001: 503-20.
9. 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.

10. Ministério da Saúde. Coordenação de Doenças Crônico-Degenerativas. Incidência na febre reumática no Brasil. MS: 2003; Brasília/DF.
11. Stollerman GH. Rheumatic fever in the 21st century. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 806-14.
12. Roberts S, Kosanke S, Terrence DS, Jankelow D, Duran CM, Cunningham MW. Pathogenic mechanisms in rheumatic carditis: focus on valvular endothelium. *J Infect Dis* 2001; 183: 507-11.
13. Veinot JP. Pathology of inflammatory native valvular heart disease. *Cardiovascular Pathology* 2006; 15: 243-51.
14. McDonald PC, Wilson JE, Gao M, McNeill S, Spinelli JJ, Williams OD, Harji S, Kenyon J, McManus BM. Quantitative analysis of human heart valves. Does anorexigen exposure produce a distinctive morphological lesion? *Cardiovascular Pathology* 2002; 11: 251-62.
15. Dajani AS, Ayoub E, Bierman FZ. Special writing group of the committee 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.
16. Hilário MOE, Andrade JL, Gasparian AB, Carvalho AC, Andrade CT, Len CA. The value of echocardiography in the diagnosis and followup of rheumatic carditis in children and adolescents: a 2 year prospective study. *J Rheumatol* 2000; 27: 1082-6.

17. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332, 411–15.
18. 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.
19. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 2863- 67.
20. Laporte S, Denault JB, D'Orleans-Juste P, Leduc R. Presence of furin mRNA in cultured bovine endothelial cells and possible involvement of furin in the processing of the endothelin precursor. *J Cardio vasc Pharmacol* 1993; 22 (suppl. 8), S7-S10.
21. Takahashi M, Matsushita Y, Iijima Y, Tanzawa K. Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Biol Chem* 1993; 268: 21394-8.
22. Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 1989; 264: 14954-9.
23. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 325-415.
24. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:851-76.

25. D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 503-10.
26. Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kanno K, Egushi S, Imai T. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 1991; 18: 165-70.
27. Masaki T, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K. Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. *Circulation* 1991; 84: 1457-68.
28. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995; 333: 356-63.
29. Love MP, McMurray JJ. Endothelin in chronic heart failure: current position and future prospects. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 665-74.
30. Jougasaki M, Larsen A, Cataliotti A, Christiansen D, Burnett J. Cardiotrophin-1 stimulates endothelin-1 via gp130 in vascular endothelial cells. *Peptides* 2002; 23: 1441-7.
31. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelin-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85: 587-90.
32. Hu RM, Levin ER, Pedram A, Frank HJ. Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor. *J Biol Chem* 1992; 267: 17384-9.
33. Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, Mandal AK, Yanagisawa M, Takeda T. Heparin regulates endothelin production through endothelin-derived nitric oxide in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 2080-5.
34. Prins BA, Hu RM, Nazario B, Pedram A, Frank HJ, Weber MA. Prostaglandin E2 and prosatcyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 11938-44.

35. Rossi GP, Pessina AC. Endothelins: molecular mechanisms in hypertension and cardiovascular diseases. *In* Molecular Mechanisms of Hypertension. D. Di Pette, EL Schiffrin, JH Sowers, Eds. 1st edition. Taylor & Francis Medical Books. London.; 2005.
36. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo : exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 1996; 81: 1510-5.
37. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gossselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* 1996; 94: 1578-84.
38. Sirvio ML, Metsarinne K, Saijonmaa O, Fyhrquist F. Tissue distribution and half-life of 125I-endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 167: 1191-5.
39. Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Waldhausl W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation* 1990; 81: 1415-8.
40. Davenport AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 219-26.
41. Sticherling M. The role of endothelin in connective tissue diseases. *Rheumatology* 2006; 45: 8-10.
42. Zhao XS, Pan W, Bekeredjian R, Shohet RV. Endogenous endothelin-1 is required for cardiomyocyte survival in vitro. *Circulation* 2006; 114: 830-7.
43. Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13, 103-8.

44. Adachi M, Yang YY, Furuichi Y, Miyamoto C. Cloning and characterization of cDNA encoding human A-type endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 1265-72.
45. Watanabe H, Miyazaki H, Kondoh M, Masuda Y, Kimura S, Yanagisawa M. Two distinct types of endothelin receptors are present on chick cardiac membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161, 1252-9.
46. Hosoda K, Nakao K, Hiroshi-Arai Y, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 1991; 287, 23-6.
47. Sumner MJ, Cannon TR, Mundin JW, White DG, Watts IS. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol* 1992; 107, 858-60.
48. LaDouceur DM, Flynn MA, Keiser JA, Reynolds E, Haleen SJ. ETA and ETB receptors coexist on rabbit pulmonary artery vascular smooth muscle mediating contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196, 209-15.
49. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J*, 1990; 4, 1989-3000.
50. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl* 1988; 6: S188-91.
51. Simonson MS, Dunn MJ. The molecular mechanisms of cardiovascular and renal regulation by endothelin peptides. *J Lab Clin Med* 1992; 119, 622-39.
52. Neylon CB. Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26, 149-53.

53. Chen C, Wagoner PK. Endothelin induces a nonselective cation current in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1991; 69, 447-54.
54. Haynes WG, Webb D. Endothelium-dependent modulation of responses to endothelin-1 in human vein. *Clin Sci* 1993; 84, 427-33.
55. Weir EK, Archer SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J* 1995; 9, 183-9.
56. Lonchamp MO, Pinelis S, Goulin J, Chabrier PE, Braquet P. Proliferation and Na⁺/H⁺ exchange activation by endothelin in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 1991; 4, 776-9.
57. Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 1995; 270, 633-7.
58. Simonson MS, Wang Y, Herman WH. Ca²⁺ channels mediate protein tyrosine kinase activation by endothelin-1. *Am J Physiol* 1996; 270, F790-7.
59. Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Kanno K, Marumo F. Phenotypic change of endothelin receptor subtype in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 1994; 134, 222-8.
60. Clerk A, Kemp TJ, Harrison JG, Mullen AJ, Barton PJ, Sugden PH. Up-regulation of c-jun mRNA in cardiac myocytes requires the extracellular signal-regulated kinase cascade, but c-jun N-terminal kinases are required for efficient up-regulation of c-jun protein. *Biochem J* 2002; 368, 101-10.
61. Callera GE, Touyz RM, Teixeira SA, Muscara MN, Carvalho MH, et al. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. *Hypertension* 2003; 42: 811-17.
62. Masaki T. Historical review: endothelin. *Tren Pharmacol Sci* 2004; 25 (4): 219-24.

63. Russell, FD; Molenaar, P. The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:353–359.
64. Zolk O, Quatteck J, Sitzler G, Schrader T, Nickenig G, Schnabel P, Shimada K, Takahashi M, Böhm M. Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation* 1999; 99: 2118-23.
65. Davenport AP. Endothelin converting enzyme in human tissues. *Histochem J* 1998; 30: 359-74.
66. Guilherme L, Weidebach W, Kiss MH, Snitcowsky R, J Kalil J. Association of human leukocyte class II antigens with rheumatic fever or rheumatic heart disease in a Brazilian population. *Circulation* 1991; 83: 1995-8.
67. Guilherme L, Ramasawmy R, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: genetics and pathogenesis. *Scand J Immunol* 2007; 66: 199-207.
68. Pedersen LG, Offenberg H, Moesgaard SG, thomsen PD, Pedersen HD, Olsen LH. Transcription levels of endothelin-1 and endothelin receptors are associated with age and leaflet location in porcine mitral valves. *J Vet Med* 2007; 54: 113-8.
69. Marie I, Bekri S, Lévesque H. Endothelin 1 and selectivity of endothelin receptor antagonists: to B or not to B? *La Revue de médecine interne* 2008; 29: 263-8.
70. Fann JI, Ingels NBJr, Miller DC. Pathophysiology of mitral valve disease. In: Cohn LH, Edmunds LHJr, eds. *Cardiac Surgery in the Adult*. New York: McGraw-Hill, 2003: 901-31.
71. Ranganathan N, Lam JH, Wigle ED Silver MD. Morphology of the human mitral valve, II: the valve leaflets. *Circulation* 1970; 41: 459.

72. Marron K, Yacoub MH, Polak JM et al. Innervation of human atrioventricular and arterial valves. *Circulation* 1996; 94: 368.
73. Waller BF, Howard J, Fess S. Pathology of mitral valve stenosis and pure mitral regurgitation, part I. *Clin Cardiol* 1994; 17: 330.
74. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48: 1-148.
75. Gray RJ, Helfant RH. Timing of surgery in valvular heart disease. *Cardiovasc Clin* 1993; 23: 209
76. Waller BF, Howard J, Fess S. Pathology of mitral valve stenosis and pure mitral regurgitation, part II. *Clin Cardiol* 1994; 17: 395.
77. Oksche A, Boese G, Horstmeyer A, Furkert J, Beyermann M. 2000. *Mol. Pharmacol.* 57:1104–13.
78. Peltonen T, Taskinen P, Napankangas J, Leskinen H, Ohtonen P, Soini Y, Juvonen T, Satta J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Increase in tissue endothelin-1 and ETA receptor levels in human aortic valve stenosis. *Eur Heart J* 2008 (in press).

IX. ANEXOS

IX. 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Consentimento Informado

(Conforme Resolução nº 196, de 10/10/96, do Conselho Nacional de Saúde, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, e pela Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990)

Eu, _____, RG _____, paciente da Unidade de Cirurgia Cardiovascular do Hospital de Base de Brasília - SES, declaro que consenti espontaneamente em participar do estudo em questão e que estou ciente de todos os seguintes aspectos:

- A pesquisa é orientada pela Profª. Yolanda Pacheco Galindo, e realizada pelo médico Edmilson Bastos de Moura, na Universidade de Brasília – UnB;
- A pesquisa intitula-se "ESTUDO DE GENES QUE CODIFICAM AS ENDOTELINAS E SEUS RECEPTORES EM VALVA MITRAL REUMÁTICA";
- Ela tem por objetivo determinar e quantificar a presença de receptores de endotelina na valva mitral retirada durante a cirurgia; isso determinará sua presença e quantidade na doença cardíaca que eu possuo;
- Estou livre para recusar-me a participar ou retirar meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao meu cuidado;
- Não há qualquer desconforto ou risco adicional, pois trata-se de uma cirurgia valvar convencional;
- Minha doença, no estágio em que se encontra, tem indicação cirúrgica e não tem indicação para outro tratamento isoladamente;
- Serei acompanhado pela equipe cirúrgica durante e após a internação, enquanto se fizer necessário;
- Receberei esclarecimentos sobre a pesquisa durante todo o seu desenvolvimento;
- Há a garantia do sigilo que assegure minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa;

Após explicação completa e pormenorizada sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, autorizo minha participação voluntária.

Brasília, ____ de _____ de 2006.

Voluntário:

Pesquisador



1ª via – Paciente

2ª via – Arquivo da pesquisa

IX. 2. Tabela 1

Dados da extração de RNA total das amostras. UnB-FM, 2006-2008.

Pacientes	M1						M2						M3					
	Quantific.	260	280	Razão	[] µg/µl	p/ [] 1µg/µl	Quantific.	260	280	Razão	[] µg/µl	p/ [] 1µg/µl	Quantific.	260	280	Razão	[] µg/µl	p/ [] 1µg/µl
1	SIM	0,047	0,014	3,3	0,094	10,6	SIM	0,074	0,033	2,2	0,148	6,8	SIM	0,231	0,130	1,8	0,462	2,2
2	SIM	0,066	0,041	1,6	0,132	7,6	SIM	0,002	-0,010	-0,2	0,004	250,0	SIM	0,139	0,068	2,0	0,278	3,6
3	SIM	0,037	0,026	1,4	0,074	13,5	SIM	0,199	0,116	1,7	0,398	2,5	SIM	0,104	0,045	2,3	0,208	4,8
4	SIM	0,105	0,048	2,2	0,210	4,8	SIM	0,082	0,041	2,0	0,164	6,1	SIM (-)	0,028	0,008	3,5	0,056	17,9
5	SIM	0,034	0,02	1,7	0,068	14,7	SIM	0,105	0,066	1,6	0,210	4,8	SIM	0,097	0,059	1,6	0,194	5,2
6	SIM	0,072	0,036	2,0	0,144	6,9	SIM	0,055	0,025	2,2	0,110	9,1	SIM	0,087	0,038	2,3	0,174	5,7
7	SIM	0,135	0,066	2,0	0,270	3,7	SIM	0,017	0,006	2,8	0,034	29,4	SIM	0,136	0,079	1,7	0,272	3,7
8	SIM	0,077	0,040	1,9	0,154	6,5	SIM	0,038	0,016	2,4	0,076	13,2	SIM	0,131	0,070	1,9	0,262	3,8
9	SIM	0,131	0,076	1,7	0,262	3,8	SIM	0,052	0,020	2,6	0,104	9,6	SIM	0,058	0,027	2,0	0,116	8,6
10	SIM	0,116	0,051	2,3	0,232	4,3	SIM	0,134	0,074	1,8	0,268	3,7	SIM	0,114	0,051	2,2	0,228	4,4
11	SIM	0,271	0,161	1,7	0,542	1,8	SIM	0,503	0,289	1,7	1,006	1,0	SIM	0,101	0,042	2,4	0,202	5,0
12	SIM	0,378	0,199	1,9	0,756	1,3	SIM	0,074	0,022	3,4	0,148	6,8	SIM	0,101	0,040	2,5	0,202	5,0
13	SIM	0,401	0,212	1,9	0,802	1,2	SIM	0,266	0,151	1,8	0,532	1,9	SIM	0,281	0,140	2,0	0,562	1,8
14	SIM	0,081	0,040	2,0	0,162	6,2	SIM	0,088	0,040	2,2	0,176	5,7	SIM	0,113	0,071	1,6	0,226	4,4
15	SIM	0,048	0,027	1,8	0,096	10,4	SIM	0,137	0,072	1,9	0,274	3,6	SIM	0,078	0,042	1,9	0,156	6,4
16	SIM	0,079	0,039	2,0	0,158	6,3	SIM	0,236	0,137	1,7	0,472	2,1	SIM	0,109	0,061	1,8	0,218	4,6
17	SIM	0,103	0,056	1,8	0,206	4,9	SIM	0,227	0,131	1,7	0,454	2,2	SIM	0,165	0,099	1,7	0,330	3,0
18	SIM	0,113	0,061	1,9	0,226	4,4	SIM	0,079	0,044	1,8	0,158	6,3	SIM	0,287	0,155	1,9	0,574	1,7
19	SIM	-	-	-	-	-	SIM	-	-	-	-	-	SIM	0,090	0,049	1,8	0,180	5,6
20	SIM	0,206	0,121	1,7	0,412	2,4	SIM	0,135	0,082	1,6	0,270	3,7	SIM	0,313	0,191	1,6	0,626	1,6
21	SIM	0,025	0,004	6,25	0,050	20,0	SIM	0,120	0,056	2,1	0,240	4,2	SIM	0,030	0,001	30	0,06	16,7
22	SIM	-	-	-	-	-	SIM	-	-	-	-	-	SIM	0,080	0,037	2,2	0,160	6,3
23	SIM	0,299	0,158	1,9	0,598	1,7	SIM	0,031	0,016	1,9	0,062	16,1	SIM	0,087	0,064	1,4	0,174	5,7
24	SIM	0,488	0,297	1,6	0,976	1,0	SIM	0,06	0,029	2,0	0,120	8,3	SIM	0,156	0,081	1,9	0,300	3,3
25	SIM	0,269	0,156	1,7	0,538	1,9	SIM	0,04	0,028	1,4	0,080	12,5	SIM	0,059	0,037	1,6	0,118	8,5
26	SIM	0,062	0,024	2,6	0,124	8,1	SIM	0,042	0,016	2,6	0,084	11,9	SIM	0,074	0,037	2,0	0,148	6,8
27	SIM	0,328	0,168	2,0	0,656	1,5	SIM	0,419	0,236	1,8	0,838	1,2	SIM	0,302	0,172	1,8	0,604	1,7