

Amplificación de los Genes que Codifican la Endotelina-1 y sus Receptores en Válvulas Mitrals Reumáticas

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

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

Resumen

Fundamento: Las cardiopatías son enfermedades de alta prevalencia, siendo la carditis reumática una enfermedad de gran relevancia en países en desarrollo. Las alteraciones en cámaras cardíacas izquierdas se asocian a la disfunción endotelial, con aumento de los niveles de endotelina-1 (ET-1) y consecuencias sobre la circulación pulmonar, muchas veces determinando la hipertensión pulmonar (HP). Mientras que, la presencia de ET-1 y sus receptores en la propia válvula mitral, promoviendo alteraciones vasculares pulmonares y aumentando la deformación valvar reumática, aún es un asunto no abordado en la literatura.

Objetivo: Determinar, mediante técnicas moleculares, la expresión de los genes de la endotelina y de sus receptores en válvulas mitrales reumáticas.

Métodos: 27 pacientes sometidos a reemplazo valvular mitral tuvieron su tejido valvar analizado, a fin de determinar la presencia de genes de ET-1 y sus receptores A y B. Fueron hechos análisis histológico y molecular de las valvas (divididas en fragmentos M1, M2 y M3) y recogidos datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes. Fueron divididos en tres grupos: valvopatía mitral, mitroaórtica y pacientes reoperados.

Resultados: El estudio mostró la manifestación del gen de ET-1 en 40,7% de los sujetos y de su receptor A en todas las muestras, con manifestación minoritaria del gen del receptor B (22,2%).

Conclusión: Todos los pacientes expresaron la presencia de gen del receptor A. No hubo diferencia estadística en cuanto a la gravedad de la enfermedad, expresada en clase funcional, y a los subgrupos estudiados (valvopatías mitrales, mitroaórticas y pacientes reoperados), o en cuanto a la expresión de los genes de la ET-1 y sus receptores entre los subgrupos estudiados (valvopatías mitrales, mitroaórticas y pacientes reoperados). (Arq Bras Cardiol 2010; 95(1) : 122-130)

Palabras clave: Miocarditis, cardiomiopatías, enfermedades reumáticas, endotelio, infección, fiebre reumática.

Introducción

La fiebre reumática (FR) es una enfermedad reumática, inflamatoria, de origen autoinmune y recidivante, como respuesta del organismo a infecciones por el estreptococo (*Streptococcus pyogenes*) del grupo A de Lancefield. Existen cepas llamadas reumatogénicas, lo que se debe a la virulencia diferenciada de ese subgrupo, rico en proteína M y ácido hialurónico en su cápsula, determinando propiedades antifagocíticas¹. Cuando son sometidas al análisis de su espesor medio, las válvulas reumáticas presentan medidas superiores y una cantidad acentuada de músculo y colágeno. Con el avance de la edad, hay aumento de espesor, sin alteración significativa de la composición valvar².

La endotelina, sustancia con fuerte potencia vasoconstrictora (diez veces más potente que la angiotensina II), fue descrita

por Yanagisawa en 1988³. Su importancia y la de sus receptores en la patogénesis de diversas enfermedades - en especial aquellas en que la vasoconstricción y la proliferación celular excesivas están envueltas - han sido objeto de intensa investigación. Además de eso, son importantes reguladoras de la deposición de colágeno y matriz extracelular⁴. También ejercen múltiples efectos biológicos, a través de sus receptores A y B, y sus concentraciones tisulares reflejan con mayor precisión la activación del sistema de las endotelinas⁴. En algunas enfermedades⁵, la endotelina-1 (ET-1) puede representar la conexión entre alteraciones vasculares y el metabolismo acelerado del colágeno asociado al proceso fibrótico Estimulada por fuerzas de fricción, la síntesis y la expresión de ET-1 son aumentadas. Ese factor físico, encontrado en disfunciones valvulares donde la coaptación es deficiente - y puede hacerse mediante un mayor roce -, se asocia a otros factores, químicos y endógenos, determinando alteraciones en la composición tisular. Mientras tanto, estudios continúan a ser conducidos en el sentido de demostrar esa correlación entre los efectos vasoconstrictores y la fibrosis tisular⁵. Es posible que ese mecanismo patológico venga a mostrarse relevante en la valvopatía reumática, asociando

Correspondencia: Edmilson Bastos de Moura •

CCSW 1 Ed. Rivoli apto 314 - Sudoeste - 70680-150 - Brasil

E-mail: ebmoura@terra.com.br

Artículo recibido el 11/11/08; revisado recibido el 11/11/08; aceptado el 29/01/09.

niveles aumentados de ET-1, encontrados en la enfermedad, a las deformidades valvulares.

Una variedad de enfermedades cardiovasculares tienen la participación de ET-1 en su patogénesis. Considerando todo lo que fue discutido en los trechos encima, podemos esperar aplicaciones terapéuticas de los antagonistas de los receptores de ET-1⁵. A través de ellos, las acciones del sistema de endotelinas pueden ser revertidas, traducándose en beneficio clínico para muchos pacientes.

Métodos

Fueron recogidas 27 muestras de válvulas en servicios de cirugía cardiovascular (Instituto do Coração do Distrito Federal/InCor-DF y Hospital de Base do Distrito Federal), posteriormente sometidas a análisis histológico y molecular. Los pacientes, adultos y de ambos sexos, fueron escogidos entre aquellos admitidos con enfermedad mitral reumática y indicación para sustitución quirúrgica de la válvula nativa por prótesis.

Fueron considerados criterios de inclusión en el estudio:

- Portadores de valvopatía mitral de características reumáticas al ecocardiograma;
- Portadores de enfermedad mitral aislada o en asociación a otra valvopatía (aórtica, tricúspide);
- Indicación de intervención quirúrgica por criterios preestablecidos en las unidades de cirugía cardiovascular escogidas, sin indicación de valvotomía percutánea o reparación valvar (comisurotomía/valvoplastia mitral):

Estenosis

- Moderada o grave (área valvar mitral $\leq 1,5 \text{ cm}^2$) y clasificación funcional III o IV (*New York Heart Association* - NYHA), no candidatos a valvotomía percutánea o reparo valvar.

Insuficiencia

- Pacientes sintomáticos (NYHA II, III y IV) con función ventricular izquierda normal (fracción de eyección $> 60\%$ y diámetro endosistólico de ventrículo izquierdo $< 45 \text{ mm}$);
- Pacientes asintomáticos o sintomáticos, con disfunción leve de ventrículo izquierdo (fracción de eyección 50-60% y diámetro endosistólico de ventrículo izquierdo 45-50 mm);
- Pacientes asintomáticos o sintomáticos, con disfunción moderada de ventrículo izquierdo (fracción de eyección 30-50% y diámetro endosistólico de ventrículo izquierdo 50-55 mm);
- Reoperación valvar mitral, desde que el tejido valvar mitral fuese todavía el nativo (o sea, cuando la primera cirugía fue de reparo valvar - comisurotomía/valvoplastia mitral);
- Anuencia del paciente o representante legal en participar del estudio (a través de la firma del Término de Consentimiento Libre y Aclarado - TCLA).

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Pacientes candidatos a valvotomía percutánea o cirugía para reparo valvar;
- Pacientes portadores de otras enfermedades cardiovasculares que tuviesen indicación quirúrgica. Son ejemplos la enfermedad coronaria obstructiva, aneurismas de ventrículo izquierdo y anomalías cardíacas congénitas cianóticas o acianóticas;
- Reoperación en pacientes ya sometidos a reemplazo valvar mitral (ausencia de tejido valvar mitral nativo);
- No concordancia del paciente o representante legal en participar del estudio.

Esos pacientes fueron internados y sometidos a los exámenes pre-operatorios de rutina en cada institución. Previamente informados y consultados al respecto de su consentimiento en participar del estudio, llenaron y concordaron con el Término de Consentimiento Libre y Aclarado - TCLA. Datos personales y epidemiológicos de los pacientes fueron recolectados, así como algunas informaciones respecto a la sintomatología y de la clasificación funcional (NYHA) y datos ecocardiográficos (valvulopatía mitral predominante, estimativa de área valvar, estimativa de presión sistólica pulmonar, área del orificio regurgitante efectivo, volumen regurgitante). El protocolo del estudio fue aceptado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Brasilia (UnB).

Inmediatamente después de su retirada, el segmento de la válvula obtenido era fragmentado, obedeciendo lo siguiente: considerando toda la extensión del fragmento retirado, siempre había tejido valvar de la extremidad libre hasta cerca del anillo mitral. Ese tejido valvar era, entonces, separado en tres segmentos, groseramente iguales en tamaño, nombrados M1, M2 y M3 - el primero próximo del anillo mitral, el tercero en la extremidad, en contacto con la cuerda tendinosa y el segundo en la región intermedia. Tal división pretendía la diferenciación en regiones que son, macroscópicamente, distintas en cuanto a su afectación por la enfermedad reumática.

Histología

Todas las válvulas retiradas y fragmentadas fueron fijadas en solución de formalina neutra 10% (pH 7,0), siendo posteriormente sometidas a descalcificación, inclusión en parafina y corte de $4 \mu\text{c}$ de espesor en el micrótopo. La coloración fue obtenida por la técnica de hematoxilina-eosina. Cada segmento fue analizado respecto a la presencia de fibrosis, calcificación, osificación, neoformación vascular e infiltrado mononuclear.

Extracción RNA total

La extracción del RNA total de las 27 muestras fue realizada por medio de la utilización del reactivo Trizol® (*Total RNA Isolation Reagent* - Invitrogen®). El RNA total de tres diferentes fragmentos de las tres regiones de la válvula mitral (M1, M2 e M3) fue extraído separadamente usando $100 \mu\text{l}$ del reactivo TRIZOL.

Este método consiste en la maceración de aproximadamente $100 \mu\text{g}$ de tejido valvar (previamente congelado a -80°C), con

motor manual (Motor Cordless - Kontes) en capilla de flujo laminar. Una vez homogeneizado, el tejido fue sometido a repetidas centrifugaciones, purificación con cloroformo, precipitación con isopropanol y limpieza con etanol 75%.

Cuantificación del RNA por espectrofotometría

Fue realizada la dilución de 4 μ l RNA en 196 μ l de agua milliQ, totalizando 200 μ l de solución. Esas muestras fueron colocadas en cubeta específica y analizadas en el espectrofotómetro (UV-1601 - UV Visible Spectrophotometer - Shimadzu Corporation). Los valores de absorbencia encontrados fueron analizados de acuerdo con la fórmula: $[RNA (\mu g/ml)] = 40 \times A_{260} \times \text{dilución} / 1000$ (Maniatis). La evaluación de pureza fue hecha por medio de la razón entre los valores de absorbencia obtenidos en 260 nm y 280 nm (A_{260} / A_{280}), siendo consideradas viables las muestras con valores entre 1,6 y 2,6.

Obtención de cDNA

Fue obtenido el cDNA total de los 27 pacientes analizados por la reacción de transcriptasa reversa (RT). Para esa reacción, fue utilizado el RNA extraído por el método del Trizol y ajustado para una concentración final de 1 μ g/ μ l por regla de tres simple. Fue seguido el procedimiento recomendado para el kit ImProm-II[®] Reverse Transcriptase, de la Promega. El oligonucleótido oligodT (dT₁₈) estaba concentrado a 0,5 μ g.

Amplificación del DNA por PCR

A partir de los cDNAs producidos, fueron realizadas reacciones de PCR para detección de la expresión de los genes de interés en los fragmentos valvares de los pacientes analizados. De esa forma, fueron construidos *primers* específicos para la ET-1 (secuencia NM 001955 gi110624717 - NCBI), ET_A (secuencia NM 001957 gi4503464 - NCBI) y ET_B (secuencia NM 000115 gi4557546 - NCBI). Fue utilizado el gen GAPDH (BC029640) como control constitutivo de las muestras. Todos los *primers* fueron diluidos para concentración de 10 mM. Fueron utilizados los reactivos de la Invitrogen para la reacción, en la cual se usó 1,25U de Taq DNA polimerasa (5U/ μ l), 0,25 μ M de cada *primer* y dNTPs concentrados a 0,1 mM cada uno. Los programas utilizados para amplificación fueron definidos de acuerdo al certificado de análisis de la empresa fabricante de los *primers* (Invitrogen Brasil LTDA.). El volumen final de la reacción fue de 10 μ l, siendo realizadas por triplicado. Todas las muestras analizadas fueron verificadas en gel de agarosa 1%.

Análisis de DNA por electroforesis en gel de agarosa

Después de las amplificaciones, el volumen 5 μ l de cada muestra fue analizado a través de electroforesis en gel de agarosa 1%, acrecido de bromuro de etidio 5 mg/ml y tapón de muestra (azul de bromofenol) 6x.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado a través del test exacto de Fisher. Es un test de la clase de los tests exactos, donde el p-valor es calculado como si los totales marginales

fuesen fijos. Es considerado significativo si inferior a 0,05.

Resultados

Fueron sometidos al tratamiento quirúrgico 27 pacientes, entre los meses de marzo de 2006 y setiembre de 2007, de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión definidos previamente. Dos individuos fueron operados en el Hospital de Base del Distrito Federal y el restante en el Incor-DF. Todos los pacientes consintieron en participar del trabajo. Fueron 15 los pacientes del sexo femenino y 12 del masculino, con una media de edad de 46,2 años (16-67 años; DP: 12,6 - Tabla 1). Del total de la muestra, apenas 10 pacientes (3, 4, 7, 9, 11, 18, 20, 22, 24, 25 - 37% do total) consiguieron determinar el tiempo de su enfermedad, que varió entre 4 meses y 45 años (tiempo medio de 12 años). No hubo óbito transoperatorio, post-operatorio u hospitalario.

De los datos individuales recogidos, observamos pacientes en las cuatro clasificaciones funcionales (NYHA) así distribuidos: 1 paciente en la CF I (paciente 21 - 3,7% de la población); 14 pacientes en la CF II (pacientes 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 24 y 26 - 51,8%); 11 en la CF III (pacientes 4, 5, 6, 8, 13, 14, 15, 22, 23, 25 e 27 - 40,7%) y 1 paciente en la CF IV (paciente 12 - 3,7%). En términos de prevalencia de lesión valvar, observamos doble lesión en 19 pacientes (70,3%), insuficiencia valvar pura en 5 pacientes (18,5%) y estenosis valvar pura en 3 pacientes (11,2%) (Tabla 1).

Los datos ecocardiográficos obtenidos fueron del área valvar, del gradiente transvalvar mitral, de la presión sistólica de la arteria pulmonar, del volumen regurgitante y del orificio regurgitante efectivo (en la insuficiencia mitral). Los hallazgos revelaron un área valvar media de 1,1 cm² (DP: 5,3; 0,6-1,9 cm² - datos de todos los 22 pacientes); gradiente transvalvar medio de 14,8 mmHg (DP: 6,9; 6-32 mmHg - datos de 20 de los 22 pacientes, 90,9%); presión sistólica media de la arteria pulmonar 55,9 mmHg (DP: 16,4; 21-100 mmHg - datos de 21 de los 22 pacientes, 95,4%); volumen regurgitante medio de 88,3 ml (DP: 61,3; 58-209 ml - datos de 6 de los 24 pacientes, 25%); y orificio regurgitante efectivo medio de 0,47 cm² (DP: 0,26; 0,27-1 cm² - datos de 6 de los 24 pacientes, 25% - Tabla 1).

Las manifestaciones clínicas más comunes fueron la disnea (25 de los 27 pacientes - 92,5%), dolor torácico (9 pacientes - 33,3%), disnea paroxística nocturna (7 pacientes - 25,9%), el edema de MMII (3 pacientes - 11,1%) y la ortopnea (en 3 pacientes - 11,1%). Las palpitations se presentaron en 2 pacientes (7,4%) y la taquipnea y los espantos hemópticos se manifestaron cada cual en apenas 1 paciente (3,7%). Apenas 1 paciente se decía asintomático durante la internación (Tablas 2, 3 y 4).

En lo tocante al abordaje quirúrgico, fueron sometidos a reoperación 5 pacientes (18,5% - pacientes 2, 4, 8, 22 y 23), en cuanto a los demás (22 pacientes - 81,5%) fueron abordados quirúrgicamente por primera vez. De aquellos reoperados, el tiempo medio desde la primera cirugía fue de 12,2 años (DP: 6,3; paciente 22: 5 años, paciente 2: 9 años; paciente 23: 10 años; paciente 8: 16 años; paciente 4: 21 años).

Tabla 1 - Datos ecocardiográficos de los pacientes

Paciente	Sexo	Edad	C.F. (NYHA)	Disfunción 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	-	-	-

C.F. (NYHA) - clase funcional (New York Heart Association); D - doble lesión; E - estenosis; I - insuficiencia; G.T.M. - gradiente transvalvar medio; PSAP - presión sistólica de la arteria pulmonar; V.R. - volumen regurgitante; O.R.E. - orificio regurgitante efectivo.

La cuantificación de RNA mostró una razón entre absorbencias dentro del intervalo considerado adecuado en 91,3% de las muestras de la región M1 (en 21 de las 23 muestras); en 87,5% de las muestras en la región M2 (21 de las 24 muestras); y en 92% de las muestras en la región M3 (23 de las 25 muestras), todas las cuales fueron sometidas a la realización de cDNA.

El análisis en gel de agarosa fue hecho en 21 de las 27 muestras recolectadas (77,8%); las seis muestras restantes fueron sometidas a PCR en tiempo real (22,2%). Reveló la presencia del gen de la ET-1 en 40,7% de las muestras (11 de las 27 muestras investigadas - pacientes 1, 2, 3, 8, 9, 12, 14, 22, 23, 24, 26) y del receptor A (ETrA) en las 27 muestras investigadas (100%). El gen correspondiente al receptor B (ETrB) fue identificado en 6 muestras (22,2% - pacientes 1, 9, 13, 21, 22 y 26).

Histología

Después de la recolección de los fragmentos valvares, 12 de

ellos fueron sometidos a la inclusión en parafina y coloración por la técnica de hematoxilina-eosina. Posteriormente, fueron analizados respecto a la presencia de fibrosis, calcificación, osificación, neoformación vascular e infiltrado mononuclear. También fueron hechas láminas identificadas como M1, M2 y M3, dependiendo de la disponibilidad de material, priorizando su utilización para las etapas de extracción de RNA y subsecuentes.

Se observó una gran cantidad de fibrocitos, tejido conjuntivo denso, fibras colágenas del tipo I (eosinofílicas) y sustancia fundamental extracelular. El tejido es groseramente avascular. No fueron encontrados miocitos de Anitschkow o los característicos nódulos de Aschoff.

Em los fragmentos M3, fueron vistos: proceso inflamatorio con celularidad alta, vascularización del tejido con capilares permeándolo (destacándose la mayor vascularización tisular relativamente a las demás áreas) y colágeno transformado o

Artículo Original

Tabla 2 - Datos clínicos y análisis molecular individualizado de los pacientes con afectación valvar únicamente mitral

Paciente	C.F. (NYHA)	Gravedad	Sintomatología	Fragmento	ET-1	ETrA	ETrB1
1	2	Moderado	1	M3	+	+	+
5	3	Grave	1,2,3	M2		+	
6	3	Grave	1,3,5	M3		+	
9	2	Grave	1,2,3,5,6	M1	+	+	+
10	2	Grave	1	M2		+	
12	4	Grave	1,3,5	M1	+	+	
13	3	Grave	1	M3		+	+
15	3	Grave	1,2	M2		+	
16	2	Grave	1,2	M2		+	
17	2	Moderado	1	M3		+	
18	2	Grave	1,8	M3		+	
19	2	Grave	1,7	M3		+	
24	2	Grave	1,3	M1	+	+	
25	3	Grave	1	M3		+	
26	2	Moderado	1	M2	+	+	+

C.F. (NYHA): clase funcional (New York Heart Association); Sintomatología: disnea (1); dolor torácico (2); disnea paroxística nocturna (3); edema MMII (4); ortopnea (5); hemópticos (6); palpitaciones (7); taquipnea (8); (+): manifestación del gen correspondiente (ET-1, ETrA, ETrB).

Tabla 3 - Datos clínicos y análisis molecular individualizado de los pacientes con afectación valvar mitroaórtico

Paciente	C.F. (NYHA)	Gravedad	Sintomatología	Fragmento	ET-1	ETrA	ETrB1
3	2	Moderado	2	M2	+	+	
7	2	Grave	1	M3		+	
11	2	Grave	1,2	M1		+	
14	3	Grave	1,2,4	M2	+	+	
20	2	Grave	1,2,7	M2		+	
21	1	Grave	-	M3		+	+
27	3	Grave	1	M3		+	

C.F. (NYHA) - clase funcional (New York Heart Association); gravedad: criterio ecocardiográfico; sintomatología: disnea (1); dolor torácico (2); edema MMII (4); palpitaciones (7). (+): manifestación del gen correspondiente (ET-1, ETrA, ETrB).

Tabla 4 - Datos clínicos y análisis molecular individualizada de los pacientes sometidos a reoperación mitral

Paciente	CF (NYHA)	Gravedad	Sintomatología	Fragmento	ET-1	ETrA	ETrB1
2	2	Grave	1,3,4	M3	+	+	
4	3	Moderado	1	M1		+	
8	3	Grave	1	M3	+	+	
22	3	Grave	1,2	M1	+	+	+
23	3	Grave	1,3,4	M1	+	+	

C.F. (NYHA) - clase funcional (New York Heart Association); gravedad: criterio ecocardiográfico; sintomatología: disnea (1); dolor torácico (2); edema MMII (4); palpitaciones (7). (+): manifestación del gen correspondiente (ET-1, ETrA, ETrB).

neoformado (hialinización del colágeno). Fueron también observados fibroblastos, linfocitos y áreas de calcificación distrófica (necrosis del tejido con depósito). En las láminas de segmento M2, los hallazgos fueron semejantes, con zonas de

cicatrización, pequeños focos de inflamación y células más alejadas entre sí. Además de eso, también fue vista osificación. En el análisis histológico del segmento M1, fueron encontradas las mismas características ya citadas anteriormente, excepto

por la ausencia de calcificación u osificación. En términos de hallazgos histológicos individuales, fueron encontradas:

- Fibrosis en todos los pacientes en las muestras M3 (2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 22); y en 10 pacientes en las muestras M2 y M1 (2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 22) - 83,3% del total de pacientes analizados;
- Neoformación vascular en 9 pacientes (2, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 22) - 75% del total de pacientes analizados; también encontrada en 2 muestras M1 (22,2%), 4 muestras M2 (44,4%), 5 muestras M3 (55,5%) y en 2 pacientes (11 y 15 - 22,2%), siendo encontrada en dos fragmentos simultáneamente (M1/M3 y M2/M3, respectivamente);
- Infiltrado de mononucleares en 6 pacientes (2, 5, 6, 8, 9, 22) - 50% del total analizado; encontrado en 1 muestra M1 (16,6%), 3 muestras M2 (50%), 2 muestras M3 (33,3%), siendo que en ningún paciente fue encontrado en dos o más fragmentos simultáneamente;
- Calcificación en 3 pacientes (9, 13, 22) - 25% del total de pacientes analizados; no fue encontrada en muestra M1, pero en 1 muestra M2 (33,3%) y en dos muestras M3 (66,6%), siendo que en ningún paciente fue encontrado en dos o más fragmentos simultáneamente;
- Osificación en apenas una muestra (M2) del paciente 9 - 8,3% del total de pacientes analizados.

Discusión

El estudio mostró la manifestación del gen de la ET-1 en 40,7% de los sujetos (11 de las 27 valvas) y de su receptor A en todas las muestras examinadas de valvas reumáticas en la población descrita, con manifestación minoritaria del gen

del receptor B (6 de las 27 muestras - 22,2%).

Los pacientes fueron escogidos a partir de su indicación para corrección quirúrgica valvar⁶. En ciertos casos, las informaciones que constaban en las historias clínicas, algunas muy relevantes, fueron extraviadas permanentemente de los registros del paciente, impidiendo su apreciación en nuestro estudio.

No fueron excluidos individuos anteriormente sometidos a valvoplastia (portadores de fragmentos valvares acometidos por reacción inflamatoria artificialmente aumentada por la manipulación operatoria previa), por la importancia del grupo para comparación con pacientes cuya intervención operatoria realizada sería la primera. El número de pacientes sometidos a reoperación correspondió a 18,5% de los casos (5 pacientes) - una fracción significativa si es comparada al número total de casos.

Según pudimos evaluar (con base en la Tabla 1 y 4), los pacientes reoperados en esa serie fueron, en su mayoría, mujeres (pacientes 2, 4, 8 y 22 - 80%). Entre ellas, 75% se encontraban en la menopausia (pacientes 2, 4 y 8). No obstante tratarse de números inexpressivos, la condición hormonal diferenciada de esas personas puede determinar cambios en la expresión de los genes codificadores de los péptidos del sistema de endotelinas.

Optamos por la subdivisión de la valva en diferentes regiones, siguiendo descripciones que muestran la heterogeneidad en la composición valvar, cuando es considerada en su sección longitudinal (extremidad libre hasta su inserción en el anillo mitral)². En ese sentido, buscamos evidenciar posibles diferencias en la identificación (o no) de los genes de la ET-1 y receptores A y B, que podrían existir entre los segmentos M1, M2 y M3. Se sabe que la ET-1 tiene importante función reguladora en la deposición de colágeno en los tejidos⁷; nos falta definir si el aumento de la composición tisular de colágeno tiene

Tabla 5 - Datos histológicos individualizados de los pacientes

Paciente	Histología														
	Fibrosis			Neoformación vascular			Infiltrado de mononucleares			Calcificación			Osificación		
	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	

(X): presencia de la alteración histológica correspondiente.

Artículo Original

algún tipo de efecto sobre la presencia o aumento de la concentración de la ET-1 y sus receptores⁸. Mientras, la escasez de algunas muestras no permitió la recolección de tejido valvar suficiente para análisis histológico y molecular, o aún dos o tres segmentos de interés. Otra dificultad, presentada cuando los fragmentos de las tres áreas eran recogidos, fue encontrar muestras poco celularizadas, de donde poco contenido nuclear podría ser extraído.

La etapa siguiente, de extracción del RNA de las muestras, tiene por finalidad la demostración de la expresión de un gen. El proceso requería pérdida y degradación mínimas del fragmento (muchas veces exiguo). El tejido estudiado era poco celularizado, conteniendo gran cantidad de colágenos y elastina, y células mesenquimales (como miofibroblastos y miocitos cardíacos) en pequeña cantidad. Eso influyó decisivamente en la obtención del RNA, ya que este es

oriundo de aquellas últimas. La muestra de RNA resultante, invariablemente, fue escasa.

Enseguida, fue hecha la cuantificación de RNA por espectrofotometría. El intervalo considerado adecuado comprendía valores entre 1,6 y 2,6 de la razón mencionada. La Tabla 6 muestra que los resultados obtenidos en esa lectura nos informaron valores adecuados en la enorme mayoría de las muestras, indicando grado de pureza satisfactorio.

La presencia de ETrA en las muestras es un resultado interesante y aguardado ya que, además de ser el receptor predominante en los miocitos cardíacos⁹, ese receptor se correlaciona a procesos inflamatorios, exuberantes en la enfermedad reumática en su fase exudativa, también presentes en la fase proliferativa¹⁰. A pesar de que los sujetos del estudio se encontraban en fases más tardías, en las cuales falta sólo saber las secuelas cicatrizales de procesos otrora vigentes¹⁰,

Tabla 6 - Datos de la extracción de RNA total de las muestras. UnB-FM, 2006-2008

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

creemos que pueda ser posible la permanencia de receptores celulares residuales, aún después de la defervescencia de la actividad inflamatoria primaria.

Los receptores B (ETrB) fueron encontrados en pocas muestras de la serie, según podemos observar en las Tablas 2, 3 y 4. Como ya fue discutido, la manifestación de tales péptidos ocurre en células endoteliales y epiteliales responsables por la modulación de la resistencia vascular y natriuresis, entre otros¹¹. Además de eso, tales receptores se caracterizan por la rápida desensibilización e internalización, cuyos resultados en la concentración tisular son poco estudiados¹². Creemos que el tiempo de convivencia con la enfermedad valvar reumática sea, asociado a otras características individuales, un posible determinante de la manifestación del gen del ETrB en el tejido valvar mitral. Esa afirmación demandará investigación específica en ese sentido.

Según destacamos anteriormente, puede ocurrir cambio fenotípico de un subtipo de receptor de ET para otro de acuerdo con condiciones encontradas *in vitro* en los cultivos de células musculares lisas vasculares y, si esas expresaran ETrB, la ET-1 se vuelve un mitógeno más potente en tales células¹³. No sabemos si eso se repite *in vivo* o en otros tejidos (como lo valvar), pero justificaría la mayor prevalencia de ETrA en las muestras estudiadas, estimulando más remodelado arterial e hipertrofia ventricular⁴.

Creemos que la principal limitación del estudio se debe a la ausencia de un grupo control, libre de enfermedad reumática o de otra especie, del cual fuese posible extraer informaciones semejantes acerca de la presencia de los péptidos, objeto de nuestra evaluación. Mientras tanto, la obtención de esos sujetos sólo sería posible cuando fuesen oriundos de tejido valvar normal y todavía viable.

El análisis estadístico fue hecho a través del test exacto de Fisher, usado para examinar la significancia de la asociación entre tablas de contingencia. Este es un test estadístico utilizado en análisis de datos categorizados cuando el tamaño de la muestra es pequeño. El test demostró una disposición, entre los pacientes del sexo masculino de esa muestra poblacional, para una mayor probabilidad de presentar el ET-1, además de fuerte tendencia para que haya asociación entre la presencia de ese gen y las variables edema de MMII ($p = 0,056$) y disnea paroxística nocturna ($p = 0,084$). Mientras tanto, sea por la pequeña muestra, sea por el valor de p , no podemos afirmar tal correlación.

La búsqueda de la cura de la cardiopatía valvar reumática por intermedio de agentes farmacológicos, en sustitución del reemplazo valvar o valvoplastia quirúrgicas, todavía carece de investigación y permea diversos sectores de la salud pública. El control de los brotes de estreptococos a través de medidas sanitarias sería un buen comienzo. El diagnóstico precoz,

determinando menor o ningún compromiso de la valva y de su aparato subvalvar, permitiría el tratamiento de innúmeros individuos de manera menos onerosa. La identificación de valvópatas en riesgo, por medio de un acompañamiento ambulatorial regular, los encaminaría al tratamiento invasivo, antes del surgimiento de complicaciones.

Tal vez la creación de estrategias adecuadas en las políticas de salud, aliada a las investigaciones médicas en áreas básicas y clínicas, permitan encontrar opciones a las terapéuticas actuales. En ese contexto, posiblemente el sistema de endotelinas y sus antagonistas colaboren, limitando la reacción inflamatoria valvar, modulando la vasorreactividad y modificando el curso fisiopatológico y clínico de la valvopatía reumática.

Conclusiones

A pesar de no haber significancia estadística, existe una tendencia a la presencia de ET-1 en pacientes del sexo masculino. Todos los pacientes, independientemente de las características individuales (sexo, edad, clase funcional y alteración valvar mitral), expresaron la presencia del gen del receptor A.

De los pacientes reoperados, 4 son mujeres en la menopausia; una de ellas se encontraba en edad fértil y expresó los tres genes estudiados.

No hubo diferencia estadística en cuanto a la gravedad de la enfermedad, expresada en clase funcional, y a los subgrupos estudiados (valvópatas mitrales, mitro-aórticos y pacientes reoperados), así como tampoco hubo diferencia en cuanto a la expresión de los genes de la ET-1 y sus receptores entre los subgrupos estudiados (valvópatas mitrales, mitro-aórticos y pacientes reoperados).

Hubo una tendencia a la mayor presencia de ET-1, en la población estudiada, entre los pacientes con edema de miembros inferiores y disnea paroxística nocturna, donde hubo un mayor número de mujeres.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio no tuvo fuentes de financiación externas.

Vinculación Académica

Este artículo es parte de la disertación de Maestría de Edmilson Bastos de Moura por la Universidad de Brasília-UnB.

Referencias

1. Stollerman GH. Rheumatic fever in the 21st century. *Clin Infect Dis*. 2001; 33 (6): 806-14.
2. McDonald PC, Wilson JE, Gao M, McNeill S, Spinelli JJ, Williams OD, et al. Quantitative analysis of human heart valves: does anorexigen exposure produce a distinctive morphological lesion? *Cardiovasc Pathol*. 2002; 11 (5): 251-62.
3. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial

Artículo Original

- cells. *Nature*. 1988; 332 (6163): 411-5.
- 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.
 - Kirkby NS, Hadoke PwF, Bagnall AJ, Webb DJ. The endothelin system as a therapeutic target in cardiovascular disease: great expectations or bleak house? *Br J Pharmacol*. 2008; 153 (6): 1105-19.
 - Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon AC Jr, Faxon DP, Freed MD, et al. American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease); Society of Cardiovascular Anesthesiologists. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing Committee to Revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease) developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48 (3): e1-148.
 - Sticherling M. The role of endothelin in connective tissue diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45 (Suppl. 3): iii8-10. Erratum in: *Rheumatology (Oxford)*. 2008; 47 (2): 234-5.
 - Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. Contrasting actions of endothelin ET (A) and ET (B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007; 47: 731-59.
 - Hilário MOE, Andrade JL, Gasparian AB, Carvalho AC, Andrade CT, Len CA. The value of echocardiography in the diagnosis and follow-up of rheumatic carditis in children and adolescents: a 2 year prospective study. *J Rheumatol*. 2000; 27 (4): 1082-6.
 - Meneghelo ZM, Ramos AIO. Lesões das valvas cardíacas – diagnóstico e tratamento. São Paulo: Atheneu; 2007.
 - D'Orléans-Juste P, Plante M, Honoré JC, Carrier E, Labonté J. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003; 81 (6): 503-10.
 - Oksche A, Boese G, Horstmeyer A, Furkert J, Beyermann M, Bienert M, et al. Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol Pharmacol*. 2000; 57 (6): 1104-13.