

MARCELO DERBLI SCHAFRANSKI

**DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LECTINA
LIGANTE DE MANOSE EM PACIENTES PORTADORES DE
CARDIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Iara José Reason de
Messias

CURITIBA

2004

Schafranski, Marcelo

Determinação das Concentrações Séricas de Lectina Ligante de Manose em Pacientes Portadores de Cardiopatia Reumática Crônica / Marcelo Schafranski. - Curitiba, 2004.

xvii, 103 f.

Orientadora: Prof. Iara José Reason de Messias.

Dissertação (Mestrado) - Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Cardiopatia reumática. 2. Febre reumática. 3. Lectina ligante de manose. I. Título. II. Messias, Iara José Reason de.



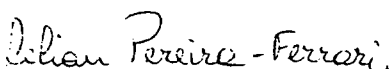
Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Mestrado/Doutorado

PARECER

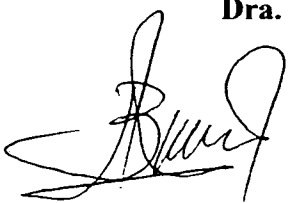
Aos dezanove dias do mês de novembro do ano de dois mil e quatro, a banca examinadora, constituída pelos Professores Dra. Lílian Pereira-Ferrari, Dra. Iara José de Messias Reason e Dr. José Elpidio Barbosa, exarou o presente parecer sobre a Dissertação elaborada por **Marcelo Derbli Schafranski**, do Programa de Pós-Graduação em Medicina – Mestrado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: **“DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LECTINA LIGANTE DE MANOSE EM PACIENTES PORTADORES DE CARDIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA”**.

A Banca Examinadora considerou que **Marcelo Derbli Schafranski** apresentou trabalho adequado para **Dissertação de Mestrado** e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: Conceito "A", correspondente ao Grau "9,5", sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina/Ciências da Saúde** e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 19 de novembro de 2.004.


Dra. Lílian Pereira-Ferrari


Dra. Iara José de Messias Reason


Dr. José Elpidio Barbosa

Dedicada à minha família
e à minha esposa

Obrigado,

Professora Iara,

Renato Nisihara,

Robinson, grande amigo,

Hospital de Clínicas da
UFPR,

Amigos,

Deus.

“A vida não é um corredor reto e tranquilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída.

Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.”

A. J. Cronin

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 FEBRE REUMÁTICA.....	4
3.1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	4
3.1.2 PATOGÊNESE.....	6
3.1.2.1 ESTREPTOCOCOCO GRUPO A (EGA).....	7
3.1.2.2 GENÉTICA.....	11
3.1.2.3 IMUNOLOGIA.....	11
3.1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	13
3.1.3.1 ARTRITE.....	14
3.1.3.2 CARDITE.....	14
3.1.3.3 CORÉIA.....	15
3.1.3.4 NÓDULOS SUBCUTÂNEOS.....	15
3.1.3.5 ERITEMA MARGINADO.....	16
3.1.3.6 MANIFESTAÇÕES MENORES.....	16
3.1.4 EXAMES COMPLEMENTARES.....	17
3.1.4.1 ANTICORPOS ANTIESTREPTOCÓCICOS.....	17
3.1.4.2 REAGENTES DE FASE AGUDA.....	18
3.1.4.3 ANEMIA.....	19
3.1.4.4 OUTROS TESTES LABORATORIAIS.....	19

3.1.4.5 ECOCARDIOGRAMA.....	19
3.1.5 TRATAMENTO.....	19
3.1.6 PROFILAXIA.....	20
3.1.7 PROGNÓSTICO.....	21
3.2 CARDIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA (CRC).....	21
3.2.1 PATOGÊNESE.....	22
3.2.1.1. RESPOSTA CELULAR.....	22
3.2.1.2 CITOCINAS.....	24
3.3 SISTEMA COMPLEMENTO.....	26
3.3.1 GENERALIDADES.....	26
3.3.2 COMPLEMENTO E FEBRE REUMÁTICA.....	31
3.3.3 LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL).....	32
3.3.3.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO.....	32
3.3.3.2 CONCENTRAÇÃO SÉRICA E GENÉTICA.....	38
3.3.3.1 ASSOCIAÇÃO DE MBL COM DOENÇAS.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 PACIENTES.....	42
4.2 CONTROLES.....	47
4.3 SORO.....	48
4.4 MBL.....	48
4.5 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE C3 E C4.....	50
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5 RESULTADOS.....	51
5.1 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL.....	51
5.2 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE C3 E DE C4.....	56
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICES.....	83
APÊNDICE 1 - PLANILHAS DE DADOS DE PACIENTES E CONTROLES.....	84

ANEXOS	92
ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HC/UFPR.....	92
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	93
ANEXO 3 - COMUNICAÇÃO DE APROVAÇÃO DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTA INTERNACIONAL E PROVA (<i>PROOF</i>) DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	95
	97

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- A PESQUISADORA INGLESA REBECCA CRAIGHILL LANCEFIELD.....	9
FIGURA 2	- ESTRUTURA DO EGA.....	9
FIGURA 3	- ESTRUTURA DA PROTEÍNA M DO EGA.....	10
FIGURA 4	- LESÃO DA ESTENOSE MITRAL REUMÁTICA.....	22
FIGURA 5	- REPRESENTAÇÃO DO NÓDULO DE ASCHOFF, LESÃO CARACTERÍSTICA DA CARDITE REUMÁTICA.....	24
FIGURA 6	- MECANISMOS PATOGÊNICOS ENVOLVIDOS NA CRC.....	25
FIGURA 7	- REPRESENTAÇÃO DAS VIAS CLÁSSICA E DAS LECTINAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.....	27
FIGURA 8	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS TRÊS VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.....	29
FIGURA 9	- REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA MOLÉCULA DE MBL.....	33
FIGURA 10	- REPRESENTAÇÃO DAS CADEIAS POLIPEPTÍDICAS DA MBL.....	34
FIGURA 11	- REPRESENTAÇÃO DA CLIVAGEM DE C4, C3 E C2 PELO COMPLEXO MBL-MASP.....	35
FIGURA 12	- REPRESENTAÇÃO DAS FUNÇÕES DA MBL.....	37
FIGURA 13	- CARACTERÍSTICAS DO GENE DA MBL.....	38
FIGURA 14	- CONCENTRAÇÕES SÈRICAS DE MBL DE ACORDO COM O GENÓTIPO.....	39
FIGURA 15	- DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM CRC E DOS CONTROLES SAUDÁVEIS DE ACORDO COM O SEXO..	43

FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DOS PACIENTES E CONTROLES NORMAIS (anos).....	44
FIGURA 17 - GRAVIDADE DA ESTENOSE MITRAL NO GRUPO DE PACIENTES COM CRC SUBMETIDOS OU NÃO À CIRURGIA, AVALIADA ATRAVÉS DE ECOCARDIOGRAMA TRANSTORÁCICO.....	46
FIGURA 18 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM CRC E CONTROLES NORMAIS POR ORIGEM ÉTNICA.....	47
FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO DE ELISA PARA A DETERMINAÇÃO SÉRICA DA CONCENTRAÇÃO DE MBL.....	49
FIGURA 20 - PLACA DE ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE MBL SÉRICA.....	50
FIGURA 21 - DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES COM CRC E CONTROLES NORMAIS.....	51
FIGURA 22 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS MÉDIAS DE MBL (ng/ml) EM PACIENTES COM CRC E CONTROLES NORMAIS.....	52
FIGURA 23 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL DE ACORDO COM O SEXO DOS PACIENTES COM CRC E DOS CONTROLES NORMAIS.....	53
FIGURA 24 - PROPORÇÃO DE INDIVÍDUOS COM VALORES DE MBL CIRCULANTE <50 ng/ml ($p<0.09$) E >1000 ng/ml ($p<0.03$).....	54
FIGURA 25 - CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE MBL CIRCULANTE E A IDADE DOS PACIENTES COM CRC NÃO-OPERADOS.....	55
FIGURA 26 - CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE MBL E ÁREA VALVAR DOS PACIENTES COM CRC NÃO-OPERADOS.....	55

FIGURA 27 - CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE C3 E DE C4 NOS PACIENTES COM CRC.....	57
FIGURA 28 - CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE C3 E DE MBL NOS PACIENTES COM CRC.....	57
FIGURA 29 - CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE C4 E DE MBL NOS PACIENTES COM CRC.....	58

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	- COMPONENTES DO EGA QUE APRESENTAM REAÇÃO CRUZADA COM TECIDOS HUMANOS.....	10
QUADRO 2	- CRITÉRIOS DE JONES MODIFICADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE FR AGUDA.....	17
QUADRO 3	- FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DO COMPLEMENTO.....	28
QUADRO 4	- EFEITOS CLÍNICOS DA DEFICIÊNCIA DE COMPONENTES DO COMPLEMENTO.....	31
QUADRO 5	- SEMELHANÇAS FUNCIONAIS DA MBL.....	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES PORTADORES DE CRC E DOS CONTROLES SAUDÁVEIS.....	43
TABELA 2	- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES SUBMETIDOS OU NÃO À CIRURGIA.....	45
TABELA 3	- CONCENTRAÇÕES DE MBL, C3 E C4 CIRCULANTES NOS PACIENTES COM CRC SUBMETIDOS OU NÃO A TRATAMENTO CIRÚRGICO (valores expressos em média ± SEM).....	54

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AOPP	-	<i>Advanced Oxidation Protein Products</i>
AR	-	Artite Reumatóide
ASO	-	Antiestreptolisina O
CRC	-	Cardiopatia Reumática Crônica
CRD	-	<i>Carboidrate Recognition Domain</i>
DM	-	Diabetes mellitus
EGA		Estreptococo do Grupo A
FR	-	Febre Reumática
HLA	-	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
hs-PCR	-	Proteína C-reativa de alta sensibilidade
ICC	-	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IL-1	-	Interleucina-1
IL-2	-	Interleucina-2
IL-6	-	Interleucina-6
IL7	-	Interleucina-7
LES	-	Lupus Eritematoso Sistêmico
MASP-1	-	<i>Mannan-associated serine protease 1</i>
MASP-2	-	<i>Mannan-associated serine protease 2</i>
MBL	-	<i>Mannose-binding lectin</i> (lectina ligante de manose)
NK	-	Natural Killer
PCR	-	Proteína C-reativa
SUS	-	Sistema Único de Saúde
TNF- α	-	Fator de Necrose Tumoral alfa
VHS	-	Velocidade de Hemossedimentação

RESUMO

A lectina ligante de manose (mannose-binding lectin, MBL) é uma molécula do sistema imune inato envolvida na defesa primária contra microrganismos mediando a fagocitose e a ativação do complemento. Além disso, há evidências crescentes que a MBL, em alguns casos, pode exercer um papel pró-inflamatório. A cardiopatia reumática crônica (CRC) constitui a mais importante e mais grave manifestação da febre reumática (FR), doença que continua a ocorrer em proporções endêmicas em países em desenvolvimento, como o Brasil. Neste estudo, determinamos as concentrações de MBL circulantes em pacientes com CRC. Um total de 100 pacientes (77 mulheres e 23 homens, com média de idade de $45,8 \pm 11$ anos, variando de 19-76 anos) com CRC, apresentando diagnóstico prévio de FR, foram estudados. Com o objetivo de avaliar a doença valvular, ecocardiograma transtorácico foi realizado em todos os pacientes. Como controles foram avaliados 99 indivíduos saudáveis, com idade, sexo e origem étnica semelhantes aos pacientes. As concentrações de MBL foram determinadas através de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), e os níveis de C3 e de C4 por turbidimetria, utilizando-se anticorpos monoclonais e policlonais, respectivamente. As concentrações de MBL foram significativamente maiores nos pacientes com CRC do que nos controles saudáveis (média \pm SEM: 3036.16 ± 298.9 ng/ml vs 1942.62 ± 185.5 ng/ml, $p < 0.003$). Ainda, a deficiência de MBL foi mais prevalente nos controles (17/99) do que nos pacientes (9/100, $p < 0.09$). As concentrações de C4 nos pacientes encontraram-se dentro dos limites da normalidade (média \pm SEM: 22.7 ± 0.8 mg/dl, normal: 10 e 40 mg/dl), e as de C3 encontraram-se elevadas (média \pm SEM: 109.2 ± 3.6 mg/dl, normal: 50 e 90 mg/dl). Não houve correlação dos valores de MBL com a área valvar ou com o tipo de procedimento cirúrgico. Estes dados demonstram que as concentrações de MBL circulantes estão significativamente aumentados em pacientes com CRC, sugerindo que a MBL pode estar causando uma ativação de complemento indesejável e lesão cardíaca nestes pacientes. Além disso, a deficiência de MBL pode exercer um papel benéfico contra o desenvolvimento da CRC.

Palavras-chave: lectina ligante de manose, cardiopatia reumática crônica, estenose mitral, febre reumática

ABSTRACT

Mannose-binding lectin (MBL) is a molecule of the innate immune system involved in the primary defense against microorganisms, mediating fagocytosis and complement activation. Moreover, there are emerging evidences that, in some circumstances, MBL may exert a proinflammatory role. Rheumatic heart disease (RHD) is the most important and severe manifestation of rheumatic fever (RF), disease that still occurs in endemic proportions in developing countries, such as Brazil. In this study we determined the circulating levels of MBL in patients with RHD. A total of 100 patients (77 women, 23 men; mean age 45.8 ± 11 years, range 19-76 years), with chronic RHD and a previous diagnosis of RF, were studied. Transthoracic echocardiography was performed in all patients to evaluate valvular heart disease. Ninety-nine healthy individuals matched for age, sex and ethnic origin were included as controls. MBL concentration was measured by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and C3 and C4 levels by turbidimetry, using monoclonal and polyclonal antibodies, respectively. MBL concentrations were significantly higher in patients with RHD than in healthy subjects (mean \pm SEM: 3036.16 ± 298.9 mg/dl vs 1942.62 ± 185.5 ng/ml, $p < 0.003$). In addition, MBL deficiency was more prevalent in controls (17.1%, 17/99) than in patients (9%, 9/100; $p < 0.09$). Concentrations of C4 were within the normal range (mean \pm SEM: 22.7 ± 0.8 mg/dl, normal: 10 to 40 mg/dl), while C3 concentrations were found to be elevated (mean \pm SEM: 109.2 ± 3.6 mg/dl, normal: 50 to 90 mg/dl). No correlation was observed between serum MBL levels and valve area or the type of surgical procedure. These results demonstrate that circulating MBL concentrations are significantly elevated in patients with RHD and suggest that MBL may cause undesirable complement activation and heart injury in these patients. Furthermore, MBL deficiency may have a beneficial role in the development of RHD.

Key-words: mannose-binding lectin, rheumatic heart disease, mitral stenosis, rheumatic fever.

1. Introdução

A cardiopatia reumática crônica (CRC) é a principal e mais grave complicação da febre reumática (FR), doença que ainda continua a ocorrer em proporções endêmicas nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. A CRC se manifesta de 10 a 20 anos após o surto inicial de FR aguda.

A patogênese da CRC ainda não está completamente esclarecida. Sabe-se que há envolvimento tanto da imunidade humoral quanto da imunidade celular nos eventos patológicos da CRC, assim como a participação do sistema complemento. Um grande número de anticorpos contra componentes do tecido cardíaco já foram demonstrados na CRC, o que confere um caráter auto-imune à doença. Recentes evidências têm demonstrado o envolvimento de processo inflamatório contínuo na CRC, no qual deve haver também a participação do complemento.

A MBL (lectina ligante de manose) é uma molécula do sistema imune inato que pertence à família das colectinas. A MBL tem a capacidade de ativar o sistema complemento numa maneira independente de C1, além de ter propriedades de opsonização. A ativação do complemento via MBL é conhecida como via das lectinas.

A MBL têm um papel importante na defesa do indivíduo contra infecções principalmente nos primeiros anos de vida, quando o sistema imunológico ainda não se encontra totalmente desenvolvido e é ainda dependente dos anticorpos recebidos da mãe. Os pacientes deficientes de MBL podem sofrer infecções severas e repetidas (SUMMERFIELD et al., 1995 e 1997). A deficiência da MBL já foi colocada também como fator de risco para algumas doenças reumáticas, entre elas o lúpus eritematoso sistêmico (LES), a artrite reumatóide (AR) e a dermatomiosite; bem como fator de pior prognóstico na AR e associada a complicações infecciosas e trombóticas no LES (OHLENSCHLAEGGER et al., 2004).

Normalmente, a MBL não reconhece os tecidos do próprio organismo, porém a hipóxia celular pode alterar a glicosilação das superfícies celulares, levando à deposição de MBL e ativação de complemento, fazendo com que a MBL exerça um efeito pró-inflamatório.

A ativação de complemento através da via das lectinas vêm sendo especulada como fator patogênico em algumas doenças, principalmente glomerulonefrites humanas, enfermidades nas quais o complemento exerce um papel importante.

Nosso objetivo no presente estudo foi determinar os níveis de MBL nos pacientes portadores de CRC, buscando averiguar um possível envolvimento da via das lectinas nesta forma de cardiopatia de etiologia auto-imune.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Determinar as concentrações séricas de MBL (lectina ligante de manose) em pacientes portadores de cardiopatia reumática crônica (CRC) e em um grupo de controles saudáveis de idade, sexo, origem étnica e geográfica semelhantes aos pacientes.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar se há relação entre as concentrações séricas de MBL e a gravidade da doença cardíaca, avaliada através de ecocardiograma transtorácico.
- Comparar as concentrações séricas de MBL dos pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos com as concentrações dos pacientes não-submetidos à cirurgia.
- Observar se há relação entre as concentrações séricas de MBL e o tipo de procedimento cirúrgico.
- Comparar o número de indivíduos portadores de MBL circulante acima de 1000 ng/ml, entre pacientes e controles saudáveis
- Comparar o número de indivíduos deficientes de MBL (<50 ng/ml) entre pacientes e controles saudáveis.
- Determinar as concentrações séricas de C3 e de C4 no grupo de pacientes.
- Observar se há correlação entre as concentrações séricas de C3 e de C4 de MBL, no grupo de pacientes.

3 Revisão da Literatura

3.1 Febre Reumática

A febre reumática (FR) é uma doença inflamatória de caráter auto-imune que se desencadeia após a infecção de orofaringe pelo estreptococo do grupo A de Lancefield (EGA). Sua característica clássica anátomo-patológica é o dano às fibrilas do colágeno e à matriz do tecido conjuntivo. O processo inflamatório envolve múltiplos órgãos: primariamente o coração, as articulações, a pele e o sistema nervoso central. As manifestações clínicas da FR seguem uma infecção de orofaringe pelo EGA, com um período de latência de aproximadamente 3 semanas. A maior importância da FR encontra-se no fato que a mesma é capaz de causar fibrose das válvulas cardíacas, com sérios prejuízos hemodinâmicos ao paciente (DAJANI, 1997).

A FR é a causa mais comum de doença valvular adquirida em crianças e adultos jovens em todo o mundo. Embora sua incidência tenha diminuído nas últimas décadas, principalmente nos países desenvolvidos, a FR ainda permanece como um sério problema de saúde nos países em desenvolvimento (GIBOFSKY e ZABRISKIE, 2001). As razões para as flutuações na incidência da doença ainda não estão totalmente compreendidas e, embora a FR esteja sendo estudada extensivamente, a sua patogênese ainda não está completamente esclarecida.

3.1.1 Epidemiologia

A incidência da FR começou a diminuir após a introdução dos antibióticos na prática clínica, caindo de 250 para 100 pacientes por 100.000 habitantes de 1862 a 1962 na Dinamarca (DAJANI, 1997). A introdução dos antibióticos em 1950, rapidamente acelerou seu declínio, até que nos anos 80, neste mesmo país, a incidência

variava de 0.23 a 1.88 pacientes por 100.000 habitantes, principalmente em crianças e adolescentes (GORDIS, 1985). Em muitos países em desenvolvimento, a incidência da FR se aproxima ou excede 100 casos para 100.000 habitantes. Na América do Sul, a incidência da doença varia de 1 a 17 pacientes por 1000 habitantes (DAJANI, 1997). ALVES MEIRA et al. (1995), em estudo realizado de março a dezembro de 1992, relataram 4 casos de FR entre 550 estudantes do ensino médio de escolas locais, em Belo Horizonte (MG), estimando a prevalência da FR nessa cidade em 3.6/1000 habitantes. Segundo levantamento do Ministério da Saúde em 1998, ocorrem no Brasil cerca de 15 a 18 mil novos casos de FR anualmente e 6 mil novos casos de cardiopatia reumática, a principal complicação da FR. De acordo com dados do Sistema Único de Saúde (SUS), entre 1995 e o primeiro semestre de 1996 foram realizadas no Brasil 4500 cirurgias cardíacas decorrentes da FR, com um custo anual de 19 milhões de reais (GONÇALVES e KISS, 2001). O custo de um paciente portador de FR gira em torno de 125 dólares por ano, enquanto que a antibioticoprofilaxia custa anualmente cerca de 9 dólares por paciente. Tais índices geram um gasto anual total pelo governo de mais de 58 milhões de reais por ano, representando a segunda causa de aplicação de recursos financeiros pelo SUS (TERRERI et al., 2002).

O declínio na incidência da FR e da cardiopatia reumática nos países desenvolvidos tem sido atribuído a vários fatores. Além da introdução da antibioticoterapia, melhores padrões sócio-econômicos, condições de moradia mais adequadas, domicílios e escolas menos populosos e um maior acesso ao atendimento médico corroboraram para o declínio da doença (DAJANI, 1997). O surgimento e desaparecimento de cepas reumatogênicas do estreptococo em certas regiões geográficas também parece ter influência no aparecimento da FR em algumas partes do mundo (COLMAN et al., 1993).

As características epidemiológicas da faringite pelo estreptococo e da FR, devido à relação íntima entre as duas doenças, são bastante semelhantes. A chance de desenvolver FR aguda após um ataque de orofaringite pelo EGA é de cerca de 0,3% (WILLIAMS, 2001). Os ataques iniciais de FR geralmente ocorrem entre 6 e 15 anos, sendo raros antes dos 5 anos de idade (DAJANI, 1997). O risco para o desenvolvimento de FR é maior nas populações mais suscetíveis ao desenvolvimento

de faringite estreptocócica, como aquelas que habitam em ambientes mais populosos, tais como estabelecimentos militares e aquelas em contato com crianças em idade escolar. TORRES (2000) observaram a presença do EGA na orofaringe de 76,9% de 1768 crianças de 16 abrigos na cidade de Curitiba/PR, sendo que a maioria delas apresentava sintomas de vias aéreas superiores no momento da coleta.

3.1.2 Patogênese

A evidência do envolvimento do EGA como agente causador do ataque inicial e dos ataques recorrentes de FR é forte, porém indireta, sendo baseada em observações clínicas, epidemiológicas e imunológicas (DAJANI, 1997). É bem conhecido que epidemias de FR seguem intimamente ataques epidêmicos de orofaringites ou escarlatina. O tratamento adequado da faringite estreptocócica reduz drasticamente a incidência de FR subsequente. Além disso, antibioticoprofilaxia adequada em pacientes com FR definida reduz os ataques recorrentes da mesma (GIBOFISKY, KERWAR e ZABRISKIE, 1998). Os níveis séricos de anticorpos contra antígenos do EGA (antiestreptolisina O, hialuronidase e estreptoquinase) estão aumentados em pacientes com FR aguda, mesmo quando estes não se recordam do episódio de orofaringite. Os surtos de FR aguda, por motivo ainda inexplicado, raramente ocorrem após infecções cutâneas pelo EGA (impetigo) (GIBOFISKY, 2000). De acordo com VEASY et al. (1987), o isolamento do EGA na orofaringe dos pacientes ocorre em cerca de 70% dos adultos e 20% das crianças com FR. Portanto o exame negativo deve ser avaliado cuidadosamente, a forte suspeita de FR não deve ser afastada pelo fato da bactéria não ter sido isolada.

O EGA pode ser classificado em dois grupos, de acordo com as diferenças na região C da proteína M: um está claramente associado à infecção orofaríngea, e o outro (com raras exceções), pertence às cepas relacionadas ao impetigo. O tecido linfóide faríngeo se constitui num importante sítio para a iniciação da resposta

humoral anormal do hospedeiro à antígenos de reação cruzada com órgãos-alvo próprios.

3.1.2.1 Estreptococo do grupo A (EGA)

O estreptococo é primeiramente classificado de acordo com o tipo de hemólise que é capaz de produzir em laboratório. Os estreptococos do grupo alfa causam hemólise total; os do grupo beta, hemólise parcial e os do grupo gama são incapazes de causar hemólise. A classificação dos estreptococos do grupo beta é feita pela tipagem do carboidrato de que é composta sua camada média e central, e estende-se de A a V. Apenas o estreptococo do grupo A é capaz de produzir a FR. Apesar de outros grupos sorológicos de estreptococos beta-hemolíticos (por exemplo: B, C, G, e F) estarem associados a infecções de vias aéreas altas, nenhum deles pode causar FR. Apenas os grupos A e G são capazes de produzir a proteína M em sua camada externa, sendo esta proteína o principal antígeno bacteriano relacionado a patogênese da FR, já que confere resistência à fagocitose, aumentando a virulência do patógeno. As diferenças antigênicas da proteína M, por sua vez, são responsáveis pela classificação dos EGA (ISSELBACHER, 1994).

Muitos antígenos do estreptococo do grupo A, tanto de superfície quanto componentes da estrutura celular, podem reagir de maneira cruzada com antígenos de mamíferos (GIBOFSKI, 2000). A cápsula do EGA composta de N-acetil-glucosamina e ácido glicurônico, é estruturalmente idêntica ao ácido hialurônico de mamíferos. Investigações pioneiras de Rebecca Lancefield (**figura 1**) e de outros pesquisadores estabeleceram a proteína M como o principal fator de virulência do EGA, caracterizando cerca de 80 tipos sorológicos distintos, de acordo com suas diferenças antigênicas, sendo os tipos 1, 3, 5, 6, 14, 18, 19, 24, 27 e 29 considerados os mais reumatogênicos (STOLLERMANN, 1990). A **figura 2** representa esquematicamente a estrutura do EGA. A proteína M (**figura 3**) possui uma estrutura helicoidal com uma região variável no seu terminal N, responsável pela especificidade de cada proteína M.

Esta é seguida de uma região de repetição B e de um domínio C e finalmente de uma região de ancoramento, que é comum a muitos microorganismos. A proteína M apresenta estrutura homóloga e reatividade cruzada com o citoesqueleto das proteínas cardíacas tropomiosina e miosina, e também com outras estruturas, como a queratina, o DNA, a laminina e a vimentina (GIBOFSKY, KERWAR e ZABRISKIE, 1998). A imunização em camundongos com proteína M recombinante do EGA pode gerar uma reação auto-imune contra válvulas cardíacas com características anátomo-patológicas semelhantes às encontradas na cardiopatia reumática (QUINN et al., 2001). Além disso, BAIRD et al. (1991) demonstraram que certos epítomos da proteína M do estreptococo são semelhantes a antígenos da cartilagem articular e da sinóvia.

O carboidrato grupo-específico do EGA é constituído de uma cadeia de polissacarídeos consistindo de ramnose, envoltas por N-acetil-glucosamina. ADDERSON et al. (1998) demonstraram no soro de pacientes portadores de FR aguda títulos elevados de anticorpos, reativos principalmente contra o epítomo N-acetil-glucosamina do EGA.

A porção mucopeptídica do EGA, a qual é a principal estrutura de sua sustentação, é composta de ácido murâmico e N-acetil-glucosamina, e quando injetada em camundongos, induz o aparecimento de artrite (CROMARTIE et al., 1977).

Por outro lado, o papel do ácido lipoteicóico, outro constituinte da estrutura do EGA que é capaz de induzir a produção de citocinas, ainda não foi estabelecido com exatidão na FR (DAJANI, 1997).

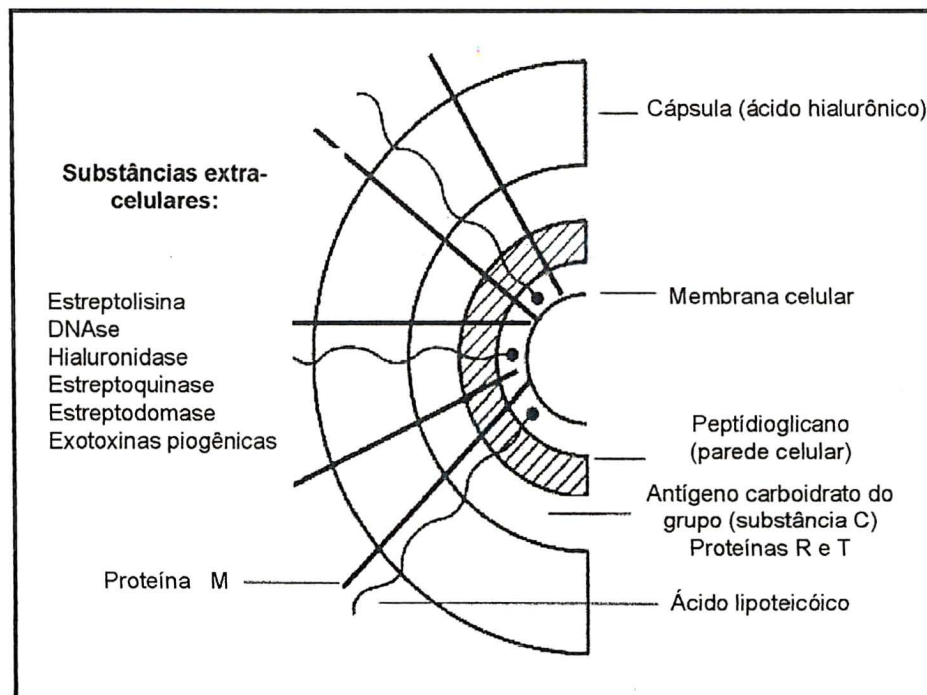
Ainda deve-se considerar a reação cruzada desencadeada pela membrana do EGA com estruturas cardíacas, pois imunização com a mesma gera anticorpos contra o tecido cardíaco de maneira semelhante ao observado na FR aguda (FROUDE et al., 1989).

O **quadro 1** apresenta os principais antígenos estreptocócicos de reação cruzada com tecidos humanos.

FIGURA - 1 A pesquisadora inglesa REBECCA CRAIGHILL LANCEFIELD em 1980, que originalmente descreveu e classificou os diferentes tipos de estrutura do EGA

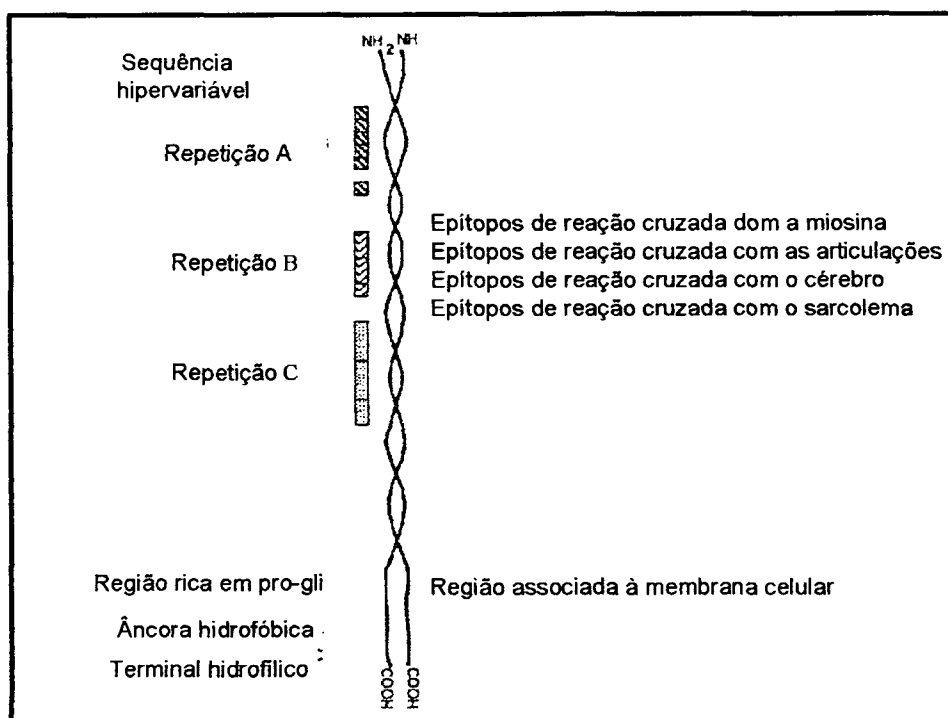


FIGURA 2 – ESTRUTURA DO EGA



FONTE: adaptado de KENNETH, T.

FIGURA 3 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA M DO EGA



FONTE: adaptado de FISCHETTI, A. V.

QUADRO 1 – COMPONENTES DO EGA QUE APRESENTAM REAÇÃO CRUZADA COM TECIDOS HUMANOS

Antígeno Estreptocócico	Tecido humano de reação cruzada
Membrana e parede celular	Miocárdio
Membranas do plasma	Membrana celular miocárdica
Glicoproteína e polissacarídeo	Válvulas cardíacas
Membrana celular	Estruturas citoplasmáticas dos neurônios do núcleo caudado e subtalâmicos
Membrana celular	Miosina cardíaca
Proteína M	Miosina cardíaca e membranas sarcolemas

FONTE: adaptado de WILLIAMS, 2001.

3.1.2.2 Genética

A FR aguda tem uma tendência familiar e diferentes estudos mostram uma concordância definitiva, embora fraca, em gêmeos monozigóticos. Associações entre a FR aguda e antígenos do complexo principal de histocompatibilidade humana (MHC ou HLA) têm sido cada vez mais descritas, sendo que a maioria delas estão relacionadas ao locus DR. Embora a associação com o HLA-DR4 seja a mais comumente citada, outras associações, com DR2, DR3 e DRw53 já foram relatadas (CARAPETIS, CIRRIE e GOOD, 1996). Na população brasileira, observou-se associação com HLA-DR7 e HLA-DR53 (GUILHERME et al., 1991). VISENTAINER et al. (2000), comparando a frequência de HLA-DR7 e DR53 em 35 pacientes brasileiros com FR aguda e 209 controles, confirmaram maior frequência do alelo DR7 nos pacientes (46.7% vs 25.7%, $p=0.015$).

Uma das associações mais importantes, inicialmente descrita por PATARROYO et al. (1979), está relacionada a antígenos de células B, presentes em 70% dos pacientes com FR. Na tentativa de confirmar estes resultados, GIBOFSKY et al. (1985) demonstraram um marcador de células B presentes em aproximadamente 95% dos pacientes com FR. Posteriormente, KAHNNA et al (1989) desenvolveram um anticorpo monoclonal contra o antígeno de células B, denominado D8/17, o qual foi identificado em 100% dos pacientes com FR aguda e em 14% dos controles. Diferentes evidências demonstraram que o antígeno D8/17 não está relacionado ao sistema HLA (KAHNNA et al, 1989).

3.1.2.3 Imunologia

O conceito de reatividade cruzada entre antígenos do EGA e antígenos relevantes do hospedeiro levantou a hipótese de que a imunidade humoral tinha o papel mais importante na patogênese da FR, e em resposta a uma infecção de orofaringe pelo EGA, o hospedeiro produziria certos anticorpos contra estruturas do EGA, que reconheceriam antígenos semelhantes de certos tecidos humanos, levando ao dano do coração, articulações e sistema nervoso central.

Na verdade, os mecanismos patológicos envolvidos na FR são resultantes não só de uma excessiva resposta humoral, como também celular.

Anticorpos anti-EGA de reação cruzada com o coração, articulações e sistema nervoso central foram demonstrados no soro de pacientes com FR aguda, bem como depósito de complemento e imunoglobulinas no tecido cardíaco lesado (KAPLAN, 1979). Entretanto, embora ocorra exacerbação da resposta imune humoral na FR aguda, existem evidências de uma participação ativa da imunidade celular na lesão tecidual (GUILHERME et al., 2001).

Uma pista inicial veio do fato de que os infiltrados celulares encontrados nas válvulas cardíacas são predominantemente de linfócitos T e que os nódulos de Aschoff (**figura 5**) lesão característica da FR cardíaca, consistem basicamente de macrófagos (RAIZADA et al., 1983). O macrófago atua como uma célula apresentadora dos determinantes antigênicos cross-reativos do EGA ao linfócito T, induzindo a ativação de clones de células T auto-reativas (DOS REIS e BARCINSKI, 1980). As células B, que seriam esperadas nos tecidos lesados, sendo raras. Outros estudos demonstram aumento no número de linfócitos CD4 circulantes (MORRIS et al., 1993a) e níveis elevados de interleucina-1 e 2 (IL-1 e IL-2) (MORRIS et al., 1993b), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (NARIN et al., 1995), interleucina-7 e 8 (IL-7 e IL-8) (KUTUKCULER e NARIN, 1995) tanto na FR aguda quanto na cardiopatia reumática crônica. A diminuição de linfócitos T CD8⁺ foi observado no surto inicial da FR aguda. Possivelmente o mecanismo normal de supressão da imunidade celular está danificado na FR, levando a uma ativação descontrolada da mesma nos tecidos afetados (KOTB et al., 1989).

Uma hipótese plausível para o desenvolvimento da FR seria a apresentação de antígenos do EGA por células apresentadoras de antígeno através das moléculas HLA para linfócitos T CD4⁺. Uma apresentação ou reconhecimento anormais resultaria em ativação e proliferação descontrolada das células CD4⁺, provavelmente mediadas por IL-2. Isso levaria a uma liberação de linfocinas, com ativação de células *natural killer* (NK) e células T citotóxicas, com posterior ativação de macrófagos e neutrófilos. Tais fatos erradicariam o EGA, porém com dano a estruturas do próprio hospedeiro. Os antígenos-próprios, então liberados de seus refúgios intracelulares, induziriam uma

resposta imune humoral, com produção de anticorpos. Os anticorpos juntamente com complemento, por sua vez, poderiam levar a mais dano tecidual. (CARAPETIS, CURRIE e GOOD, 1996).

Outro mecanismo auto-imune implicado na FR aguda é o fato da proteína M poder agir como um superantígeno, isto é, estimular diretamente linfócitos T sem a necessidade de células apresentadoras de antígeno. Tal hipótese têm sido deixada de lado, uma vez que o potencial de superantígeno da proteína M provavelmente se deve à contaminação com a toxina pirogênica do estreptococo, esta sim, comprovadamente uma molécula superantigênica (SCHMIDT et al., 1995).

A hipótese do EGA não ser o único agente causador da FR aguda já foi levantada por alguns autores. O vírus Cocksackie, que é responsável por outras doenças cardíacas, como miocardite, pericardite e insuficiências valvulares, já teve alguns de seus antígenos isolados em tecido cardíaco de pacientes com FR (PONGPANICH et al., 1983). Desta maneira, esse vírus tem sido implicado como co-patógeno no desencadeamento da FR, o qual teria uma ação sinérgica sobre o EGA (KOTB et al., 1989). Por outro lado, os autores ZAHER e KASSAM (1993) recomendam a pesquisa do vírus somente nos casos onde houver ausência do EGA.

3.1.3 Características clínicas

A apresentação clínica da FR aguda é bem variável, e a falta de alguma característica patognomônica resultou no desenvolvimento dos critérios de Jones modificados (JAMA, 1992) que são usados para o estabelecimento do diagnóstico (**quadro 2**). Para diagnóstico de FR são necessários dois critérios maiores ou 1 maior e dois menores, além da evidência prévia de infecção estreptocócica. Os critérios foram desenvolvidos para orientar o diagnóstico, mas não devem ser sempre levados à risca. Em certas regiões geográficas, alguns critérios podem ser mais importantes que outros. Um dilema são as manifestações que não podem ser classificadas claramente como FR, devido à antibioticoprofilaxia. O caso mais comum é o de uma poliartrite, a qual possui uma variedade ampla de diagnósticos diferenciais. Uma exceção é a coréia, que

devido a muito poucos diagnósticos diferenciais, possibilita o diagnóstico de FR aguda mesmo sendo uma manifestação isolada (TERRERI et al., 2002).

3.1.3.1 Artrite

Classicamente a artrite da FR aguda afeta várias juntas sucessivamente, por um período curto de tempo. As pernas são acometidas mais precocemente, seguida dos membros superiores. O termo migratório é comumente utilizado, mas não significa que a inflamação desaparece em uma junta e depois aparece em outra. Geralmente ocorre alguma superposição.

O envolvimento articular é mais comum e também mais grave em adolescentes e em adultos jovens que em crianças (WILLIAMS, 2001). A artrite é frequentemente o achado mais precoce, embora cardite indolente pode precedê-la.

Os pacientes acometidos pela FR aguda acabam por desenvolver uma poliartrite verdadeira, acometendo de 6 a 16 juntas. Classicamente cada junta fica inflamada no máximo por uma semana, então apresenta dor leve por mais uma semana e desaparece. As radiografias nesta fase mostram apenas aumento das partes moles, ou são normais.

Na prática clínica, artrites de qualquer espécie acabam por receber tratamento antiinflamatório empírico. Desta maneira, se perde uma pista diagnóstica importante, uma vez que a artrite melhora e não migra para outras juntas. Em pacientes tratados, a artrite da FR se resume a uma ou duas juntas, mais comumente afetando joelhos e tornozelos. Cotovelos, punhos, quadris, ombros e pequenas juntas dos pés e mãos são acometidos em menor proporção. Juntas lombossacrais, cervicais, esternoclaviculares e têmporo-mandibulares são raramente afetadas (GIBOFISKY e ZABRISKIE, 2001).

3.1.3.2 Cardite

O dano valvular e do miocárdico na FR aguda pode se manifestar de diversas maneiras, incluindo sopros, cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e pericardite. A manifestação mais grave da cardite reumática é a insuficiência cardíaca congestiva, que deve ser prontamente reconhecida e tratada agressivamente com diuréticos, antiinflamatórios e ocasionalmente corticosteróides. As anormalidades eletrocardiográficas incluem bloqueios de ramo de diversos graus, incluindo

dissociação átrio-ventricular. Se o bloqueio de ramo estiver associado à ICC, um implante de marcapasso temporário pode ser necessário. Na revisão clássica de BLAND e JONES (1951) foram identificados 65% de pacientes com cardite entre 1000 pacientes com FR aguda. No trabalho prospectivo de DA SILVA (1999), 396 (50.4%) de 786 pacientes com FR aguda apresentaram cardite. VEASY et al. (1987), utilizando ecocardiografia, observaram 91% de cardite durante uma epidemia de FR aguda em Utah, nos Estados Unidos.

3.1.3.3 Coréia

Também chamada coréia de Sydenham, coréia menor ou “dança de São Vito”, é uma manifestação neurológica caracterizada por movimentos abruptos, sem-propósito, rítmicos e involuntários; fraqueza muscular e distúrbio emocional. Os movimentos involuntários desaparecem com o sono, aparecem com o repouso e atrapalham a coordenação motora. Os músculos afetados mais comumente são os da face e das mãos, e inicialmente é possível suprimir os movimentos. Caretas e sorrisos inapropriados são comuns. A escrita do paciente se altera e é um bom indicativo de melhora do quadro neurológico. A fala é arrastada. Os movimentos são mais proeminentes em um lado do corpo e, ocasionalmente, completamente unilaterais (hemicoréia) (GIBOFSKY e ZABRISKIE, 2001).

3.1.3.4 Nódulos subcutâneos

Os nódulos subcutâneos da FR são indolores e duros, com diâmetro variando entre 1 e 2 cm, e são localizados em superfícies ósseas ou proeminências, e sobre tendões. A pele sobrejacente apresenta-se sem características inflamatórias e pode ser deslocada sobre os nódulos. O número varia de 1 até várias dezenas, com média de 3 a 4, aparecendo mais comumente nos cotovelos, sobre o olécrano, raramente ultrapassando um mês. Estes nódulos aparecem praticamente apenas em pacientes com cardite (AMIGO, MARTÍNEZ-LAVÍN e REYES, 1993).

3.1.3.5 Eritema marginado

O eritema marginado é uma erupção evanescente, não-pruriginosa, rósea ou avermelhada, afetando o tronco e as partes proximais dos membros, poupando a face. As lesões são centrífugas, e o centro apresenta melhora gradativa enquanto a lesão se estende. O bordo externo da lesão é bem definido, enquanto que o centro é difuso. Pelo fato de apresentar forma de anel, recebe também a denominação de eritema anular.

Duram poucas horas e podem retornar. Um banho ou ducha quente podem desencadear as lesões. É um achado precoce na doença e pode persistir mesmo após a melhora dos demais sinais e sintomas. Também é uma lesão praticamente exclusiva de pacientes com cardite (WILLIAM e ALTO, 1992).

3.1.3.6 Manifestações menores

Dentre as manifestações menores, incluem-se a febre, a dor abdominal, a epistaxe e a pneumonia reumática (GIBOFSKI, 2000).

A temperatura aumenta em quase todos os pacientes com FR, variando de 38.4°C a 40°C. Sem tratamento, diminui em cerca de 1 semana e pode permanecer baixa por mais 1 ou 2 semanas, desaparecendo em 3 a 4 semanas.

A dor abdominal da FR lembra outras dores causadas por inflamação microvascular mesentérica, é não específica, pode aparecer precocemente na doença, inclusive simulando apendicite aguda (GIBOFSKI, 2000).

No passado, a epistaxe aparecia como manifestação de FR grave, mas é difícil confirmá-la como achado da doença devido ao efeito tromboastênico do ácido acetil-salicílico, usado em altas doses em épocas passadas (GIBOFSKY e ZABRISKIE, 2001).

A pneumonia reumática pode aparecer no curso de uma cardite grave, sendo difícil distinguí-la de edema pulmonar ou injúria pulmonar causada por uma série de outros processos fisiopatológicos.

QUADRO 2 – CRITÉRIOS DE JONES MODIFICADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE FR AGUDA

Critérios Maiores	Critérios Menores
Cardite Poliartrite Coréia Eritema marginado Nódulos subcutâneos	Febre Artralgia FR aguda prévia ou cardiopatia reumática
Achados Laboratoriais	
Reagentes de fase aguda elevados Proteína C-reativa (PCR) Velocidade de hemossedimentação (VHS) Prolongamento do intervalo P-R no eletrocardiograma Evidência de infecção estreptocócica prévia Aumento de antiestreptolisina O ou outro anticorpo estreptocócico Cultura de orofaringe positiva para o EGA Escarlatina recente	

FONTE: adaptado de JAMA, 1992

3.1.4 Exames complementares

3.1.4.1 Anticorpos antiestreptocócicos

O diagnóstico de FR não pode ser realizado por exames laboratoriais porém esses podem ser úteis tanto para documentar uma infecção prévia pelo EGA como para estabelecer a presença e persistência de um processo inflamatório. Radiografias de tórax podem ser úteis para avaliar o curso da cardite e o eletrocardiograma reflete o curso do envolvimento inflamatório do sistema de condução cardíaco. No momento do aparecimento da FR, as culturas de orofaringe são geralmente negativas, no entanto cultura prévia à administração de antibióticos é sempre válido (GIBOFSKY e ZABRISKIE, 2001).

Os anticorpos antiestreptocócicos são muito úteis: atingem um pico conjuntamente com o início da FR e indicam infecção verdadeira e não um estado de portador. Utilizando-se a determinação para diferentes anticorpos, toda infecção recente por estreptococo pode ser identificada. Para se detectar uma elevação significativa nos títulos, os testes devem ser realizados ao ver o paciente pela primeira vez, e após duas semanas (DAJANI, 1997).

Os anticorpos estreptocócicos mais frequentemente usados são aqueles dirigidos contra produtos extracelulares do estreptococo, incluindo antiestreptolisina O (ASO), anti-Dnase B, antihialuronidase e antiestreptoquinase. A ASO é o teste mais usado e difundido no mundo, como instrumento diagnóstico. Os títulos da ASO variam de acordo com a idade, estação do ano e geografia, atingindo um pico nas crianças em idade escolar. Títulos de 200 a 300 unidades Todd por ml são comuns em crianças saudáveis no ensino fundamental (GIBOFSKY, 2000). Após uma infecção estreptocócica, os títulos de ASO atingem um pico na 3^o ou 4^o semana, e na 2^o ou 3^o semana da FR. Os títulos caem rapidamente nas semanas seguintes e lentamente, depois de 6 meses. Como apenas 80% dos pacientes com FR apresentam elevação nos títulos de ASO, em caso de forte suspeita da doença, outros anticorpos devem ser pesquisados, inclusive a antiestreptozima (uma combinação de diversos antígenos estreptocócicos) (ATTAL, SURYAWANSHI e MARATHE, 1980).

Os títulos elevados de anticorpos antiestreptocócicos embasam, mas não provam a existência da FR. Esses podem se normalizar durante o ataque e não têm correlação com a atividade e gravidade da doença (DAJANI, 1997).

3.1.4.2 Reagentes de fase aguda

Tanto a velocidade de hemossedimentação (VHS) quanto a proteína C reativa (PCR) estão quase que invariavelmente elevadas na FR aguda, podendo estar normais porém, em episódios isolados de coréia e eritema marginado. Os valores séricos de PCR e de VHS podem ser usados para monitorar a atividade inflamatória e as recaídas da doença. Se os valores de ambas permanecem normais por meses após a

descontinuação do tratamento, o episódio de FR pode ser considerado terminado, a não ser que a coréia apareça (AMIGO, MARTÍNEZ-LAVÍN e REYES, 1993).

3.1.4.3 Anemia

Anemia normocítica e normocrômica de doença crônica ou inflamação é comum na FR aguda, e resolve com a melhora do processo.

3.1.4.4 Outros testes laboratoriais

Outros testes que podem ser úteis são os anticorpos anti-tecido cardíaco (dirigidos contra antígenos do sarcolema) e anticorpos anti-citoesqueleto (miosina e tropomiosina), os quais aparecem na vasta maioria dos pacientes com FR e não aparecem em pacientes com infecções estreptocócicas não-complicadas (GIBOFSKY, 2000).

O uso do anticorpo monoclonal contra o antígeno D8/17 do linfócito B também representa um teste de utilidade importante, uma vez que praticamente 100% dos pacientes com FR aguda expressam tal antígeno. Quando o diagnóstico é duvidoso, a pesquisa deste antígeno é de grande valia (KHANNA et al., 1989).

3.1.4.5 Ecocardiograma

A alta sensibilidade do ecocardiograma bidimensional mostrou a presença de regurgitação mitral e ocasionalmente aórtica em crianças saudáveis. Desta maneira, o ecocardiograma não é recomendado para o diagnóstico de valvulite cardíaca, na ausência de achados auscultatórios (FOLGER et al., 1992)

3.1.5 Tratamento

Sempre que possível, o paciente deve ser admitido em um hospital para observação e avaliação. O repouso é sempre considerado devido às dores articulares. A

deambulação deve ser permitida assim que haja melhora da febre, dor e os reagentes de fase aguda retornem ao normal. Os pacientes devem receber um curso de erradicação do estreptococo com um regime de 10 dias de penicilina ou, em caso de alergia, eritromicina.

Caso haja insuficiência cardíaca, o paciente deve receber oxigênio, diuréticos, digitálicos e dieta pobre em sódio. Não há uma terapia específica antiinflamatória para a FR. As manobras terapêuticas visam a melhora dos sintomas constitucionais, a melhora dos sintomas tóxicos e uma melhora da função cardíaca (DAJANI, 1997).

Os pacientes sem cardite ou com cardite leve respondem bem a salicilatos. Os sintomas articulares também respondem bem aos salicilatos, melhorando em até 24 horas. Aspirina, numa dosagem de 100 mg/kg/dia em 4 a 5 tomadas diárias geralmente resulta em níveis séricos adequados e melhora dos sintomas.

Os pacientes com sintomas cardíacos significativos, como pericardite e ICC, devem receber terapia com corticosteróides. O regime utilizado varia de 1 a 2 mg/kg/dia de prednisona.

Não há evidência científica que o tratamento com antiinflamatórios ou corticosteróides altere o curso da cardite e reduza o dano valvular. A duração do tratamento é arbitrária e baseada na melhora clínica. Os casos de cardite leve ou sem envolvimento cardíaco são tratados por 30 dias, ou até que não haja evidência clínica e laboratorial de atividade inflamatória. Nos casos em que a utilização de corticóides é necessária, este deve ser mantido por 2 a 3 meses, e então reduzido gradualmente. Cerca de 5% dos pacientes continuam a demonstrar atividade da doença mesmo após 6 meses de terapia (GIBOFSKY, 2000).

3.1.6 Profilaxia

A antibioticoprofilaxia deve ser iniciada tão logo o surto agudo se resolva. Existem dois regimes ideais: penicilina por via oral, 250 mg 2 vezes ao dia, ou penicilina G benzatina 1.2 milhões via intra-muscular a cada 4 semanas. LUE et al (1986) sugerem que a administração da penicilina benzatina a cada 3 semanas é mais efetiva na prevenção de novos ataques. A duração da profilaxia é objeto de controvérsia. De acordo com GIBOFSKY e ZABRISKIE (2001), caso o paciente

tenha evidência de cardite, a profilaxia deve ser mantida por toda a vida. De acordo com DAJANI (1997), a antibioticoprofilaxia deve ser mantida até 10 anos após o último surto de FR ou até os 21 anos.

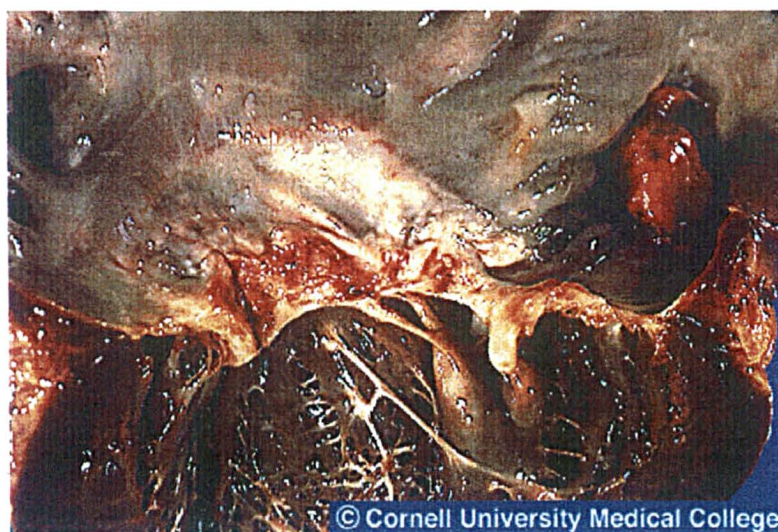
3.1.7 Prognóstico

As recorrências da FR ocorrem mais comumente dentro de 2 anos após o surto inicial. O risco de recorrência diminui com a idade. Cerca de 50% dos pacientes que apresentam a FR aguda evoluem para cardiopatia reumática crônica, especialmente se eram portadores de cardite no surto inicial (GRIFFITHS, WELTON e GERSONY, 1990).

3. 2 Cardiopatia reumática crônica (CRC)

A cardiopatia reumática crônica (CRC) é a seqüela mais grave da FR aguda, que se manifesta clinicamente de 10 a 20 anos após o ataque inicial de FR, sendo a principal causa de valvulopatia adquirida no mundo todo. A principal válvula acometida é a mitral, sendo que o acometimento da válvula aórtica é menos frequente. A lesão cardíaca clássica da CRC é a estenose mitral (**figura 4**), que pode se apresentar juntamente com insuficiência da válvula, secundária à calcificação valvular (BRAUNWALD, 1997). Quando os sintomas de aumento de átrio esquerdo aparecem, correção cirúrgica se faz necessária. A incidência da CRC em pacientes com história de FR aguda varia de 30% a 50% (BLAND e JONES, 1951). A estenose mitral em adultos é quase sempre resultante de inflamação pós-reumática e doença degenerativa, que leva à fusão das comissuras mitrais e ao espessamento das cordoálias tendíneas (BRAUNWALD, 1997). Em casos raros a estenose mitral pode ser secundária a lesões congênitas, síndrome carcinóide, lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide (AR) e mucopolissacaridoses.

FIGURA 4 – LESÃO DA ESTENOSE MITRAL REUMÁTICA



FONTE: WEILL MEDICAL COLLEGE OF CORNELL UNIVERSITY (com permissão).

3.2.1 Patogênese

Durante o episódio agudo de FR, há pouco ou nenhum prejuízo hemodinâmico. O processo agudo se resolve e deixa cicatrizes nos folhetos valvares. Eventualmente, ocorre fusão das comissuras e espessamento do aparato sub-valvular. Episódios repetidos de valvulite reumática e cardite aceleram tal processo.

3.2.1.1 Resposta celular

A CRC é caracterizada por um infiltrado inflamatório, no qual predominam os linfócitos T CD4+, macrófagos, e em menor número, linfócitos B. Os nódulos de Aschoff (**figura 5**), sinal patognomônico da doença, são formados inicialmente por aglomerados de células com predomínio de monócitos, macrófagos e neutrófilos e mais tardiamente por linfócitos T e B (FRASER et al., 1997).

EL-DEMELLAWY et al. (1997), em um estudo *in vitro*, demonstraram que linfócitos T de pacientes portadores de CRC reconhecem uma proteína miocárdica de

50 a 54 kDa, e que a exposição dessas a antígenos estreptocócicos aumenta a habilidade de reconhecimento dos antígenos da proteína miocárdica.

Em um estudo prospectivo, MORRIS et al. (1993) demonstraram que os pacientes portadores de FR aguda e CRC ativa apresentam um número significativamente maior de células T CD4+, células B CD22+ e relação CD4+/CD8+, do que pacientes portadores de CRC quiescente e de faringite estreptocócica.

GUILHERME et al. (1995) estudaram 107 clones de células T obtidas de fragmentos cirúrgicos de tecidos cardíacos de 4 pacientes portadores de CRC. No estudo, os autores testaram *in vitro* a capacidade destas células de reconhecer peptídeos sintéticos derivados da proteína M do EGA e proteínas cardíacas, e concluíram que os clones dos quatro pacientes eram capazes de reconhecer tanto a proteína estreptocócica como o tecido cardíaco.

Por outro lado, YOSHINAGA et al. (1995) mostraram que linhagens de linfócitos T derivadas de tecido valvar e linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de FR são capazes de reconhecer antígenos da parede celular e da membrana do estreptococo. No entanto, estes linfócitos não reagem cruzadamente com a proteína M ou proteínas do citoesqueleto da bactéria.

Um outro estudo realizado também por GUILHERME et al. (2001), baseado no achado que linfócitos T infiltrantes no tecido cardíaco de pacientes com CRC são capazes de reconhecer simultaneamente segmentos da proteína M e proteínas do coração, demonstrou quais regiões da proteína M5 são reconhecidas pelos clones dos linfócitos T. Os resíduos de aminoácidos 81-96, incluídos na região 81-103 da proteína M5 foram preferencialmente reconhecidos por linfócitos T do sangue periférico dos pacientes com CRC grave (46%), enquanto que apenas 8,6% de indivíduos normais foram capazes de reconhecer esta região. Destes pacientes, 70% eram HLA-DR7 e 61% HLA-DR53, sugerindo que tais moléculas HLA estejam preferencialmente envolvidas no reconhecimento da proteína M5 nos pacientes com CRC grave.

Tais dados sugerem que, durante a infecção pelo EGA, linfócitos T previamente sensibilizados na periferia contra antígenos bacterianos (proteína M), migram para o tecido cardíaco e, por mecanismo de mimetismo molecular, reconhecem de forma

cruzada proteínas cardíacas, desencadeando uma resposta inflamatória que acaba por lesar o tecido.

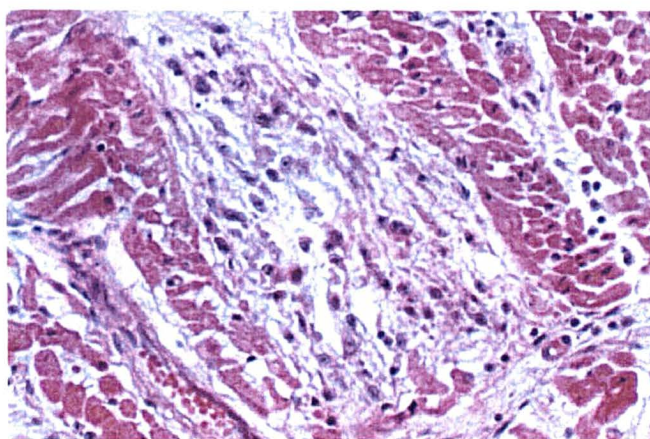
3.2.1.2 Citocinas

MILLER et al. (1989) demonstraram que as células amigdalianas de pacientes portadores de CRC produzem concentrações maiores de IL-1, IL-2, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e imunoglobulinas do que células de indivíduos normais. Esses autores também demonstraram que culturas de células mononucleares sanguíneas de crianças com FR produzem mais TNF- α e IL-2 do que controles normais.

ZEDAN et al. (1992) observaram aumento significativo de IL-2 em pacientes portadores de CRC ativa quando comparados a pacientes com CRC quiescente. No estudo de MORRIS et al (1993b) observou-se que os níveis de IL-1 em portadores de CRC ativa retornam ao normal em cerca de 48 semanas, ao contrário dos níveis de IL-2, que persistiram elevados além deste período.

Através da análise dos nódulos de Aschoff em diferentes estados evolutivos, concluiu-se que a secreção de TNF- α e IL-1 por macrófagos é necessária para a agregação e ativação de linfócitos T e B, que chegam à lesão posteriormente aos macrófagos (FRASER et al., 1997).

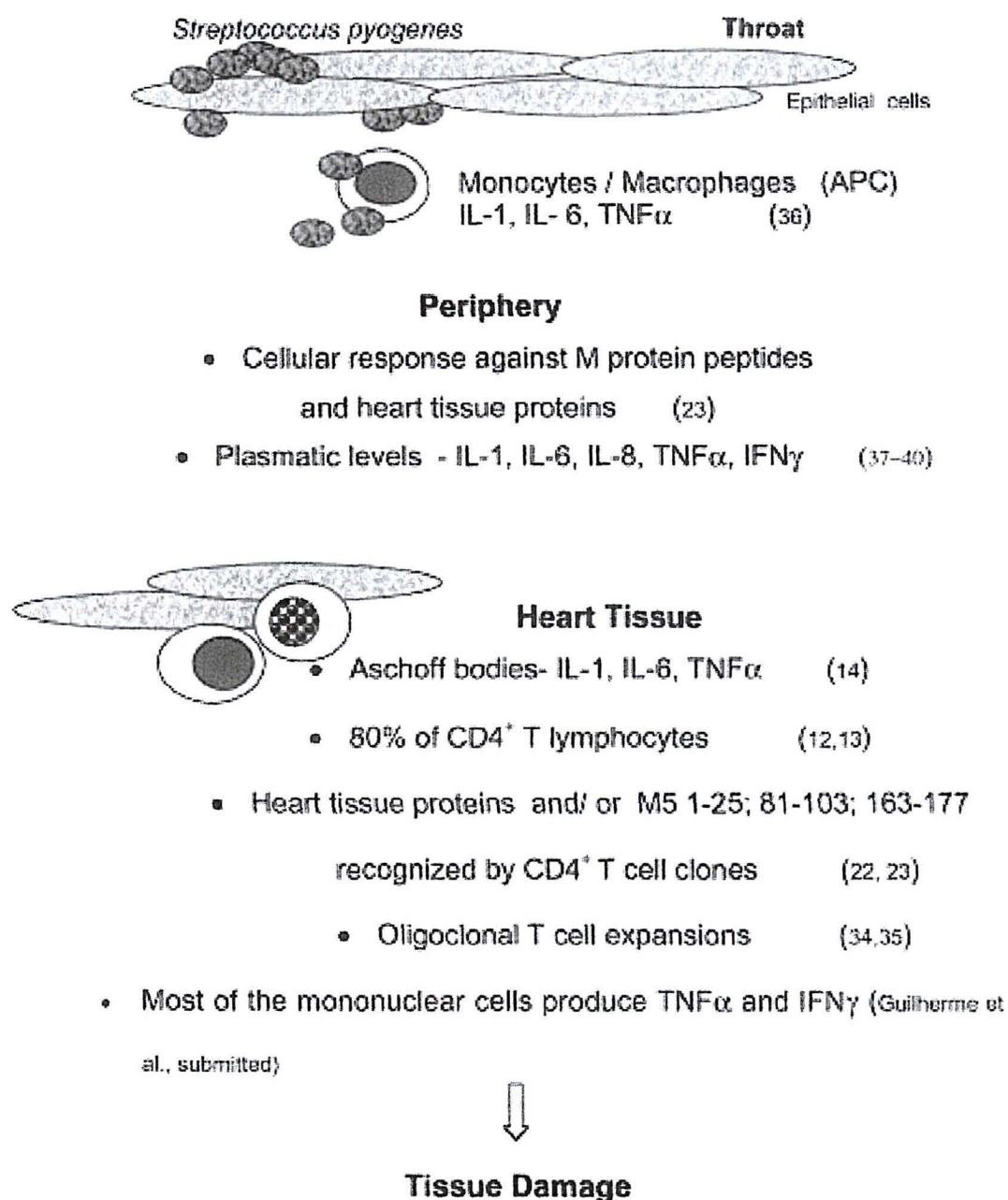
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DO NÓDULO DE ASCHOFF, LESÃO CARACTERÍSTICA DA CARDITE REUMÁTICA



FONTE: GENERAL PATHOLOGY IMAGES FOR INFLAMMATION AND REPAIR

A **figura 6** representa esquematicamente os fatores envolvidos na patogênese da CRC.

FIGURA 6 – MECANISMOS PATOGENICOS ENVOLVIDOS NA CRC



FONTE: GUILHERME e KALIL, 2002.

3. 3. Sistema complemento

3.3.1 Generalidades

O complemento é parte integrante do sistema imune inato e responsável por um dos principais mecanismos efetores da imunidade mediada por anticorpos. Suas principais funções fisiológicas são: defesa contra infecções bacterianas piogênicas, ponte entre o sistema imune inato e adquirido e remoção de imunocomplexos e células apoptóticas (**quadro 3**).

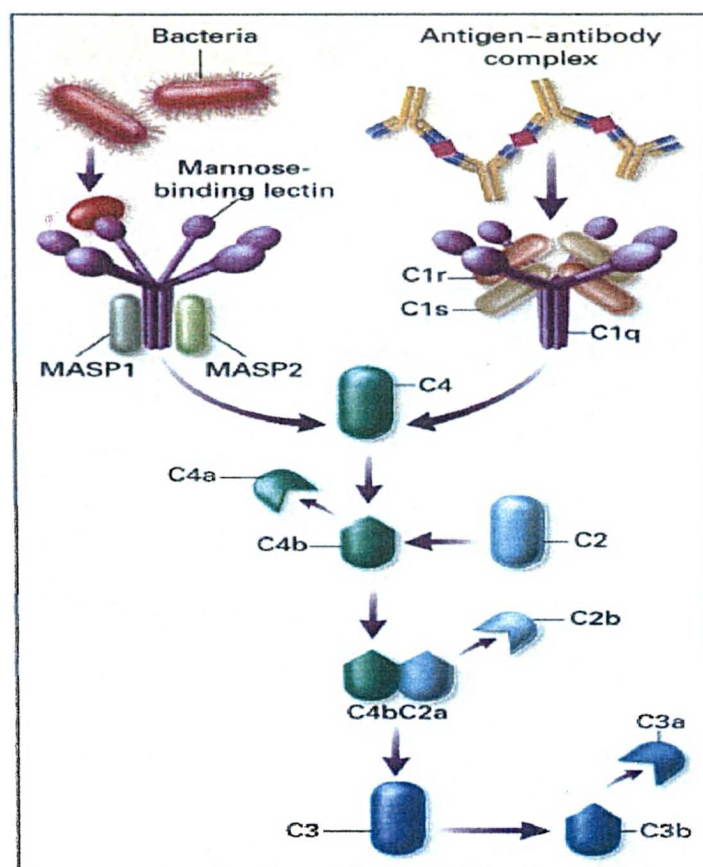
O complemento foi primeiramente descrito como um componente termolábil do soro que “complementava” a atividade dos anticorpos no combate a bactérias (ISSELBACHER, 1994). Atualmente sabe-se que o sistema complemento se constitui de pelo menos 30 proteínas presentes no plasma ou nas superfícies celulares. A concentração de proteínas do complemento no plasma é de cerca de 3 g por litro e constitui cerca de 15% da fração de globulinas. A nomenclatura das proteínas do complemento segue a ordem histórica de seu descobrimento, o que torna o seu entendimento um pouco confuso (WALPORT, 2001).

A primeira via de ativação do complemento a ser descrita foi a via clássica, que inicia-se quando o anticorpo se liga a um antígeno na superfície celular levando à ativação de C1, e termina com a lise da célula. As proteínas desta via recebem as denominações de C1 a C9. As proteínas da via alternativa, a seguinte a ser descoberta, são chamados de fatores, seguidas de uma letra, por exemplo, fator B. As proteínas do complemento nas superfícies celulares podem ser receptores para o complemento ativado ou proteínas que regulam a ativação do sistema (WALPORT, 2001). Os produtos de clivagem do complemento que surgem durante a ativação do mesmo são designados através de uma letra minúscula – por exemplo, C3 é clivado em dois fragmentos, C3a e C3b. Normalmente o fragmento pequeno recebe o “a” e o fragmento grande recebe o “b”, com exceção dos fragmentos de C2. A terceira via capaz de ativar o sistema complemento é a via das lectinas. Através da interação da lectina ligante de manose (MBL), com duas proteases séricas denominadas de MASP1

e MASP2 (*mannan-associated serine proteases*), há a clivagem de C3 (MASP1) e a clivagem e ativação de C4 e C2 (MASP2) (figura 7).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DAS VIAS CLÁSSICA E DAS LECTINAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO

O processo de clivagem de C4, C2 e C3 leva à formação de C3b.



FONTE: MEDZHITHOY e JANEWAY, 2000

As três vias que levam à clivagem de C3 atuam como cascatas de ativação enzimática semelhante ao que ocorre com a coagulação, a fibrinólise e as cininas. O produto final desta ativação leva à formação do complexo de ataque à membrana

(C5b-C9), o qual consiste de um complexo lipofílico que atua sobre membranas celulares, gerado a partir de várias proteínas plasmáticas (**figura 8**).

QUADRO 3 – FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DO COMPLEMENTO

As três principais atividades fisiológicas do sistema complemento	
Atividade	Proteína do Complemento Responsável
Defesa contra infecção	
Opsonização	Fragmentos de C3 e C4 (C3b, C4b), MBL
Quimiotaxia e ativação de leucócitos	Anafilotoxinas (C5a, C3a e C4a), receptores de anafilotoxinas em leucócitos
Lise de bactérias e células	Complexo de ataque à membrana (C5b-C9)
Interface entre sistema imune inato e adquirido	
Amplificação da resposta por anticorpos	C3b e C4b ligados a imunocomplexos e antígenos; receptores de C3 nas células B e células apresentadoras de antígeno
Aumento da memória imunológica	C3b e C4b ligados a imunocomplexos e à antígenos; receptores de C3 nas células dendríticas e foliculares
Remoção de debris celulares	
Remoção de células apoptóticas	C1q, fragmentos de C3 e C4, MBL
Remoção de imunocomplexos	C1q, fragmentos de C3 e C4

FONTE: adaptado de WALPORT, 2001.

A deficiência hereditária de componentes do complemento é um fator de suscetibilidade a doenças, pela diminuição da atividade de opsonização e pelo comprometimento das propriedades líticas do mesmo (**quadro 4**).

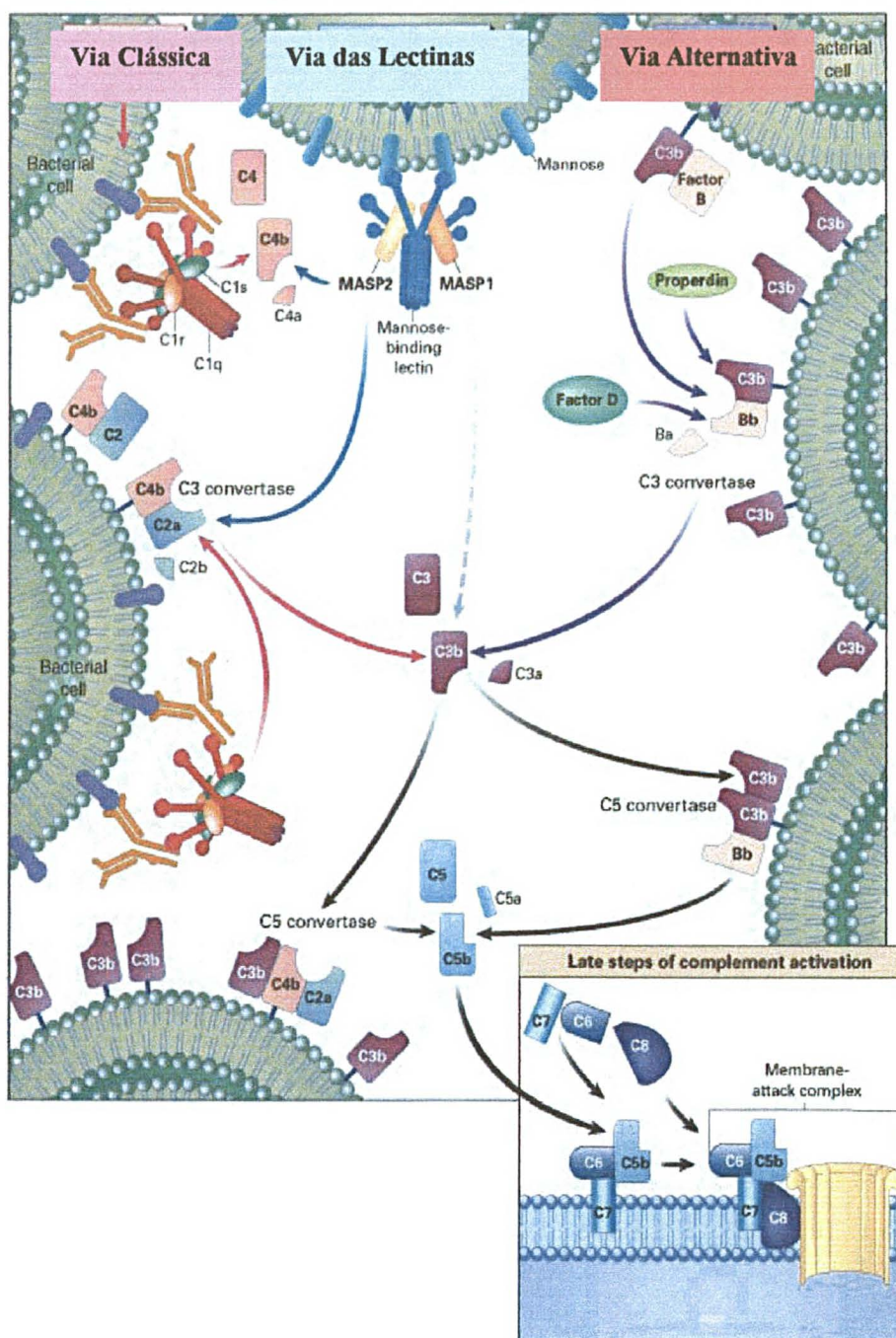
Os mecanismos regulatórios do complemento são balanceados delicadamente, de modo que a ativação do complemento seja concentrada na superfície de

microrganismos invasores e ocorra de maneira limitada em células e tecidos normais. Quando há um descontrole nesses mecanismos, o sistema complemento pode causar dano ao organismo, como o que ocorre na deficiência do inibidor de C1, levando ao angioedema hereditário; na presença do fato nefrítico C3, auto anticorpo que estabiliza a enzima C3 convertase C3bBb, causando glomerulonefrite membranoproliferativa, LES e lipodistrofia parcial; e a deficiência do fator H, causando também a glomerulonefrite membranoproliferativa (WALPORT, 2001).

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS TRÊS VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO

A via clássica, a via das lectinas e a via alternativa. As três vias convergem para o ponto de clivagem de C3. A via clássica é iniciada pela ligação do complexo C1 (que consiste de C1q, duas moléculas de C1r e duas moléculas de C1s) a complexos antígeno-anticorpo, na superfície de uma célula bacteriana. C1s primeiramente cliva C4, que liga-se de maneira covalente à superfície bacteriana, e então cliva C2, levando à formação do complexo enzimático C4b2a, a C3 convertase da via clássica. A via das lectinas é iniciada pela união do complexo lectina ligante de manose (MBL) e das proteases séricas (MASP 1 e MASP 2) a domínios de manose presentes nas superfícies celulares de bactérias. MASP 2 age de maneira semelhante a C1s levando à formação da C3 convertase. MASP 1 pode clivar C3 diretamente. A via alternativa é iniciada pela ligação covalente de pequenas quantidades de C3b a grupos hidroxila nos carboidratos e proteínas celulares, e é ativada pela hidrólise espontânea de C3 no plasma. Este C3 b liga-se ao fator B, uma proteína semelhante a C2, para formar o complexo C3bB. O fator D cliva o fator B ligado a C3b, para formar o complexo C3bBb da via alternativa. A properdina estabiliza esta ligação. As enzimas convertase de C3 clivam várias moléculas de C3 em C3b, que se ligam-se covalentemente em torno da região de ativação de complemento. Algumas moléculas de C3b unem-se a C4b e C3b nas enzimas convertases da via clássica e alternativa, respectivamente, formando as enzimas convertases de C5. Este C3b age como um sítio de ligação para o C5, que é clivado para formar as anafilotoxinas C5a e C5b, iniciando o complexo de ataque à membrana (C5b-C9).

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS TRÊS VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO



FONTE: adaptado de WALPORT, 2001.

QUADRO 4 – EFEITOS CLÍNICOS DA DEFICIÊNCIA DE COMPONENTES DO COMPLEMENTO

Efeitos clínicos da deficiência de complemento	
Deficiência de Complemento	Associação clínica
MBL	Infecções graves na infância e idade adulta
C3	Infecções bacterianas piogênicas Glomerulonefrite membranoproliferativa
C3, properdina, complexo de ataque à membrana	Infecções por neisséria
Inibidor de C1	Angioedema
CD59	Hemólise, trombose
C1q, C1r, C1s, C4, C2	Lúpus eritematoso sistêmico (LES)
Fator H e fator I	Glomerulonefrite membranoproliferativa Síndrome hemolítico-urêmico

FONTE: adaptado de WALPORT, 2001

3. 3.2 Complemento e febre reumática

O envolvimento do sistema complemento na FR já foi objeto de alguns estudos. Anticorpos presentes no soro de pacientes com FR contra uma proteína do estreptococo de 56 kDa, a qual apresenta mimetismo molecular com uma proteína de superfície de células eucarióticas de 52 kDa, reagem com fibroblastos humanos intactos *in vitro*, e são capazes de lisar as células em presença de complemento (PREHM et al., 1995). Em um estudo *in vitro*, demonstrou-se que anticorpos específicos contra a proteína M do estreptococo, quando em contato com a cartilagem articular, ativam mais complemento que o soro de controles normais (BAIRD et al., 1991). Existem evidências de que, tanto pacientes portadores de FR

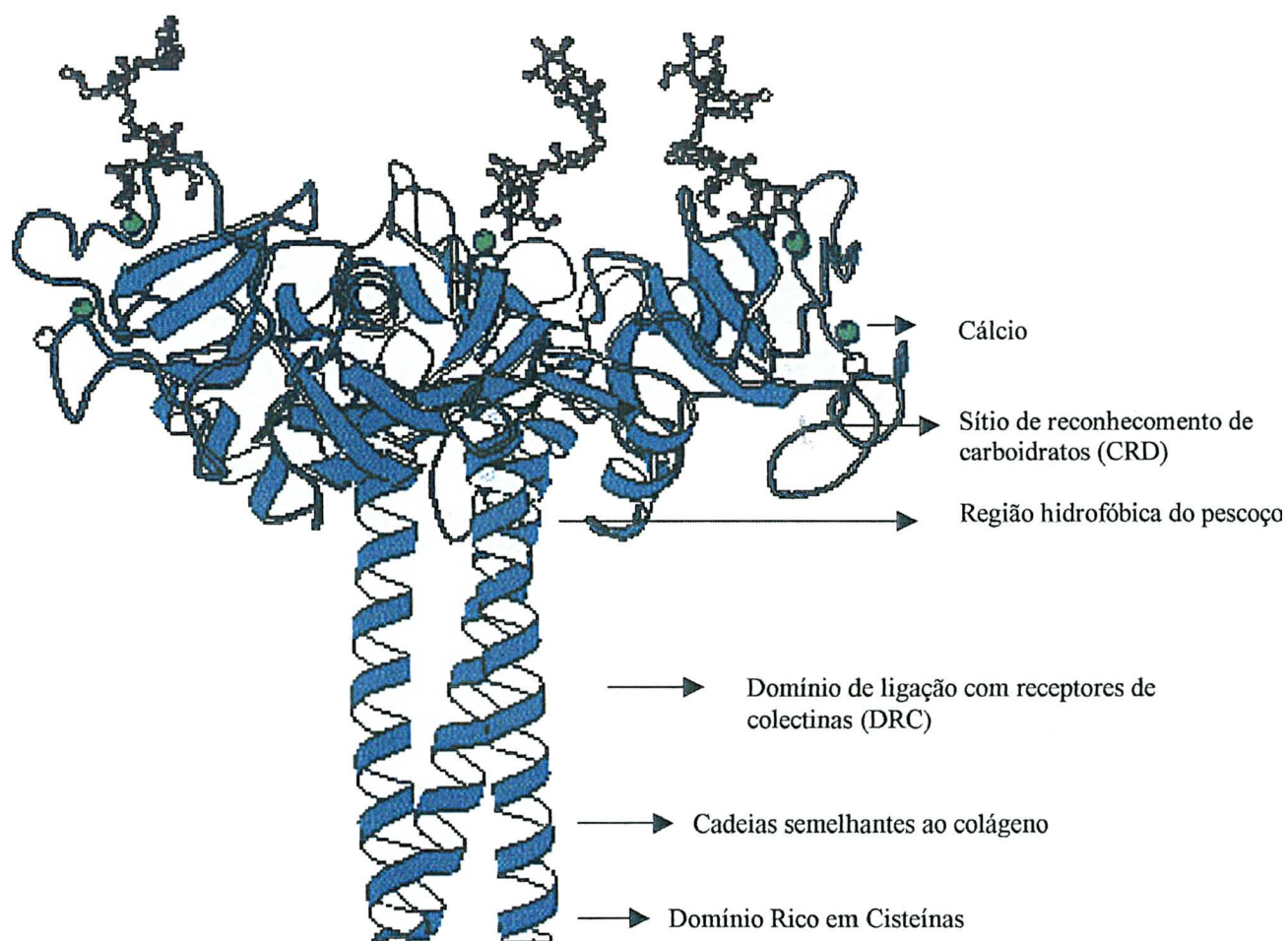
aguda, quanto pacientes portadores de CRC, possuem valores séricos aumentados de imunocomplexos e de produtos de ativação do complemento (C3d) quando comparados com população controle (REDDY et al., 1990). Ainda, deposição de complemento foi observada em amostras de necrópsia de tecido cardíaco em pacientes com cardiopatia reumática aguda (GIBOFSKY, 1998). Há evidência de diminuição dos componentes do complemento nas articulações de pacientes com FR aguda, sugerindo ativação desse sistema por imunocomplexos nesse local (SVARTMAN et al., 1975). A deposição de imunocomplexos em tecidos de pacientes com FR aguda, seguida por ativação do complemento, pode ser o evento inicial para a vasculite vista nos tecidos destes pacientes, com posterior participação dos anticorpos auto-reativos (GIBOFSKI e ZABRISKIE, 2001). Um papel imunogenético do complemento na doença foi demonstrado por de MESSIAS et al. (1995), no qual pacientes portadores de doença reumática cardíaca apresentaram uma maior frequência do alelo raro do componente C4, C4A*6.

3.3.3 Lectina Ligante de Manose (MBL)

3.3.3.1 Estrutura e função

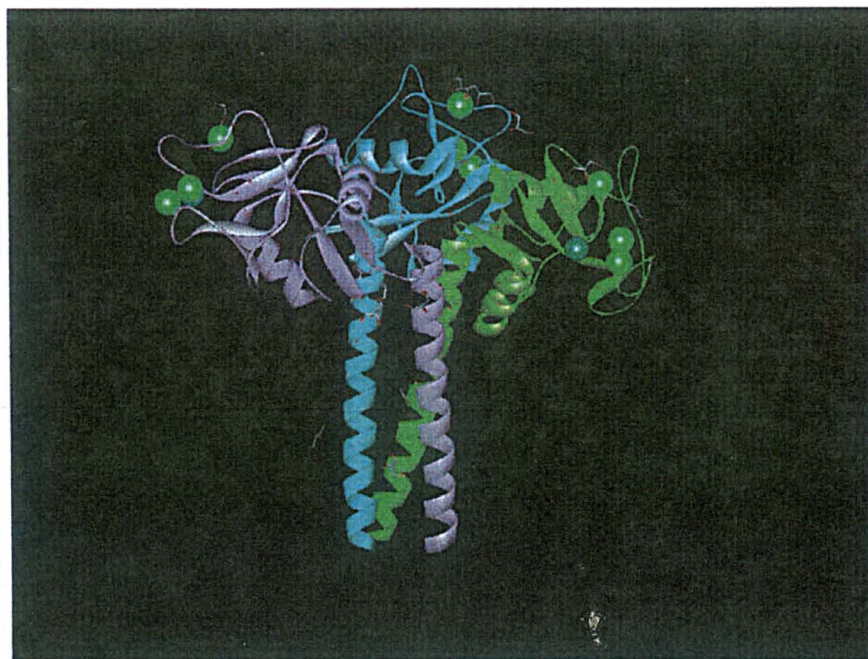
A lectina ligante de manose (MBL) é uma molécula do sistema imune inato que pertence à família das colectinas, caracterizada pela presença de uma seqüência similar à do colágeno e um domínio de reconhecimento de carboidratos. É uma molécula multimérica composta de até 6 subunidades de 96 kDa, cada uma constituída de 3 cadeias polipeptídicas de 32 kDa, com uma estrutura tridimensional semelhante à proteína surfactante A, à conglutinina e ao C1q (TURNER, 1996) **figuras 9 e 10**

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA MOLÉCULA DE MBL



FONTE: WEIS e DRICKAMER.

FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO DAS CADEIAS POLIPEPTÍDICAS DA MBL



FONTE: WEIS e DRICKAMER.

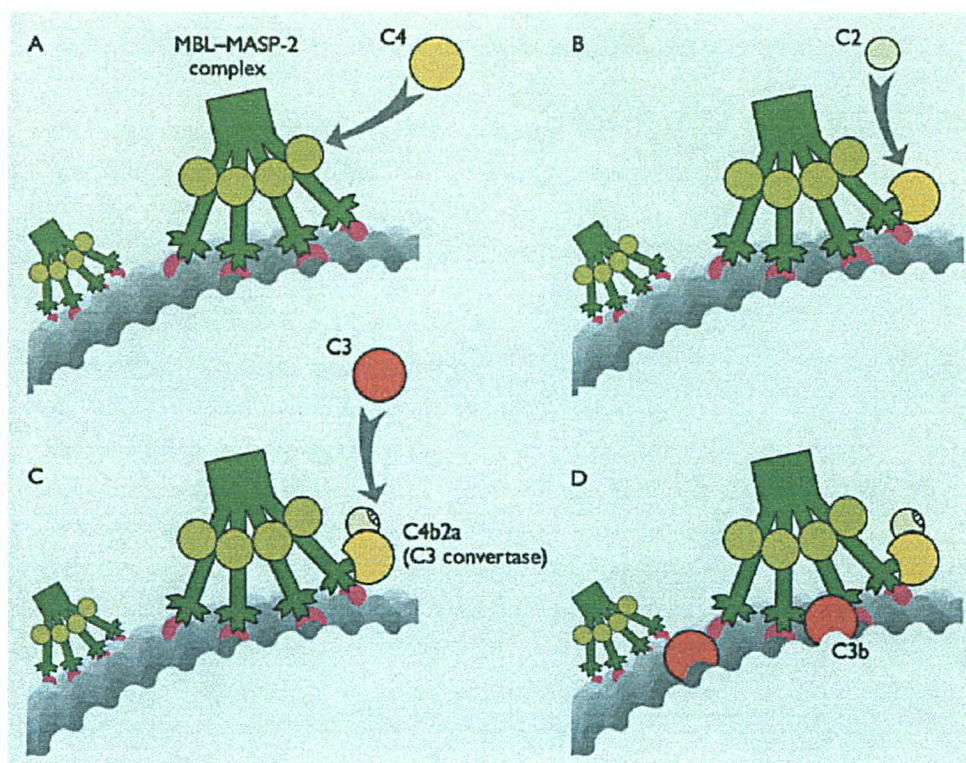
A MBL tem a habilidade de se ligar à uma série de açúcares (manose, fucose, glicose, N-acetil-D-glucosamina) presentes na superfície de bactérias, fungos, protozoários e vírus, promovendo a ativação do complemento através de proteases séricas (MASP – *mannan-associated serine proteases* – 1 e 2), independentemente de C1 e de anticorpos (**figura 11**). A seletividade da ligação com carboidratos varia entre espécies, sendo que no homem, a seletividade é maior para N-acetil-glucosamina, seguida de manose, N-acetil-manosamina e fucose, maltose, glicose e galactose e N-acetil-galactosamina. Ainda, a capacidade de ligação de MBL com bactérias encapsuladas (*N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. agalactiae*) é menor, sugerindo que a ação da MBL é prejudicada pela presença de cápsula (TURNER, 1996). MASP-1 e MASP-2 são estruturalmente semelhantes a C1r e C1s, respectivamente. A clivagem de C2 e C3 é efetuada por MASP-1, enquanto que a clivagem de C4 é realizada pela porção C-terminal de MASP-2 (THIEL et al., 1992) **figura 11**. Como consequência desta reação, é formada a C5 convertase funcional e o complexo

de ataque à membrana (**figura 8**). Além disso, a MBL pode mediar diretamente a opsonização e fagocitose de microrganismos através da interação com receptores de colectinas na superfície de fagócitos (VAN DE WETERING, 2003) **figura 12**.

A MBL parece ser um dos componentes mais versáteis do sistema imunológico inato, sendo funcionalmente semelhante à IgM, IgG e C1q (**quadro 5**).

A MBL, assim como o C1q, também exerce um papel na remoção de células apoptóticas, iniciando a captação dessas células por macrófagos (**figura 12**). Tal processo parece ser dependente de diferentes proteínas/receptores, como calreticulina (cC1qR), C1 qR e CR1, que se ligam à região colagenosa da MBL (TURNER, 2003).

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DA CLIVAGEM DE C4, C3 E C2 PELO COMPLEXO MBL-MASP



FONTE: DOMINIC, 2001.

QUADRO 5 – SEMELHANÇAS FUNCIONAIS DA MBL

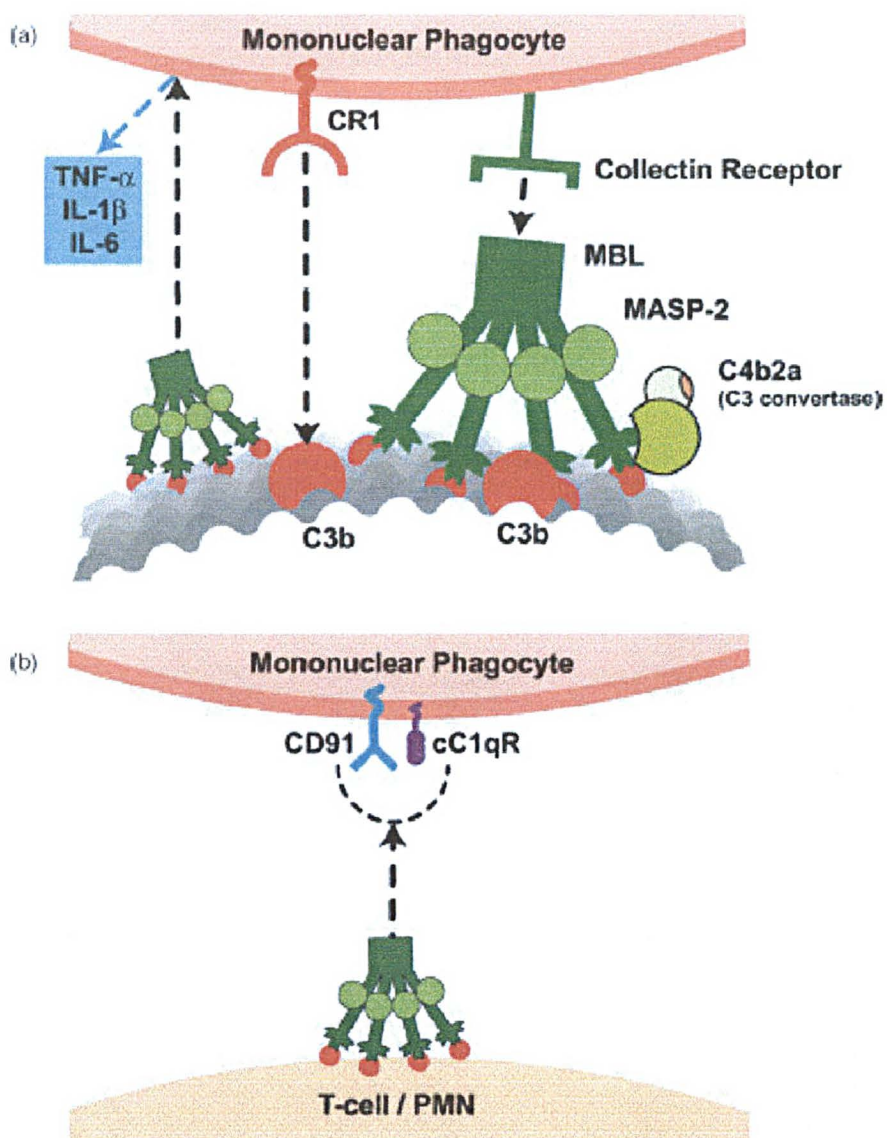
Funções semelhantes à IgM
<p>Liga-se a um amplo número de substratos através de múltiplos domínios para reconhecimento de carboidratos (CRD)</p> <p>Cada CRD liga-se fracamente</p> <p>Atinge uma afinidade funcional alta através de múltiplos CRD</p>
Funções semelhantes à IgG/IgA
<p>Atua diretamente como uma opsonina, cobrindo as superfícies dos microrganismos ricas em açúcares</p> <p>Interage com um ou mais receptores de colectinas</p>
Funções semelhantes a C1q
<p>Interage com proteases séricas (MASP1 E 2)</p> <p>Inicia a ativação da via clássica do complemento</p> <p>Os complexos MBL-MASP se associam a proteases séricas inibitórias (p. ex.: α-2 macroglobulina, inibidor da C1-esterase)</p>

FONTE: adaptado de TURNER, 1996.

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO DAS FUNÇÕES DA MBL

Em (a) está representada a ativação de complemento através da interação com os receptores de colectinas presentes nas superfícies dos fagócitos. Em (b) está representada a função de auxílio na remoção de células apoptóticas.

M.W. Turner / Molecular Immunology 40 (2003) 423–429

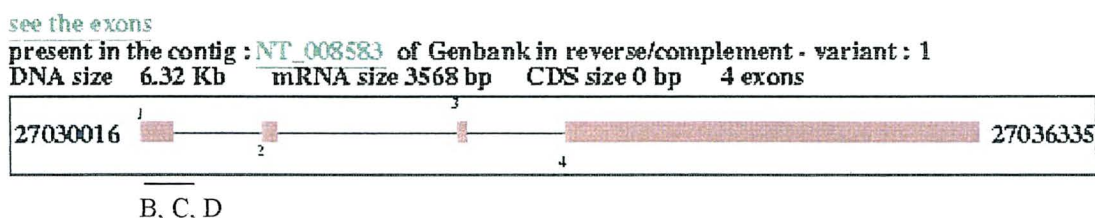


FONTE: TURNER, 2003

3.3.3.2 Concentração sérica e genética

O gene MBL está localizado no braço longo do cromossoma 10 e contém quatro éxons. O éxon 1 codifica uma região de colágeno rica em cisteína e parte da região rica em glicina, o éxon 2 codifica para o resto da região de colágeno, o éxon 3 codifica para a região do pescoço da molécula, e o éxon 4 codifica para a região de ligação ao carboidrato (**figura 13**).

FIGURA 13 – CARACTERÍSTICAS DO GENE DA MBL

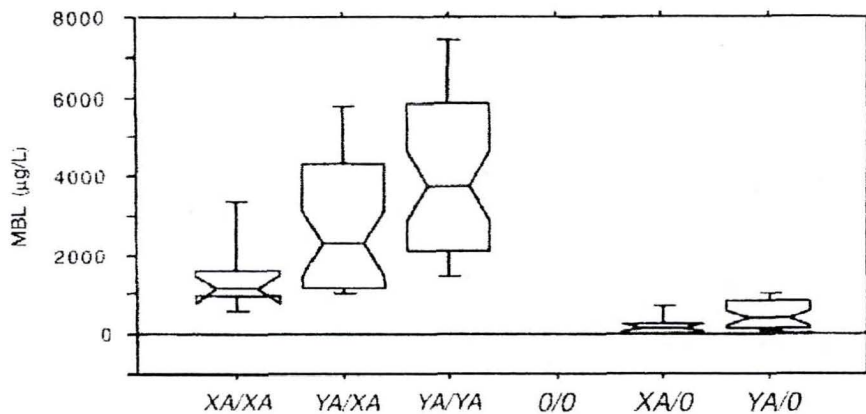


FONTE: GENATLAS: GENE DATABASE, 2004

A concentração sérica normal de MBL em caucasianos saudáveis varia de 800-1000 ng/ml porém, estes valores podem variar amplamente na população devido a mutações pontuais no éxon 1 e ao polimorfismo da região promotora do gene MBL. O alelo normal do éxon 1 é chamado de A. Indivíduos homozigóticos para o alelo A (AA) possuem concentrações 6 a 8 vezes maiores de MBL circulante que indivíduos heterozigóticos para o mesmo alelo (A/0, sendo que 0 pode ser B, C ou D). O alelo B representa uma mutação pontual no códon 54 (gly por asp), o alelo C, uma mutação no códon 57 (gly por glu) e o alelo D, uma mutação no códon 52 (arg por cys). Afetam ainda a concentração sérica da MBL o polimorfismo da região promotora do gene da MBL. Na região -550 são encontrados os alelos H e L, e na região -221, os alelos Y e X. Concentrações altas de MBL são relacionadas ao genótipo HY, e as demais combinações levam a valores séricos menores da proteína (TURNER, 1996). Na **figura 14** pode-se observar a variação das concentrações séricas de MBL de acordo

com o genótipo. Indivíduos com valores séricos de MBL abaixo de 50 a 100 ng/ml são considerados deficientes.

FIGURA 14 – CONCENTRAÇÕES SÈRICAS DE MBL DE ACORDO COM O GENÓTIPO.
Os espaços cheios representam a distância interquartis, e as barras representam a variação do 10º ao 90º percentis



FONTE: GARRED et al., 1996

A deficiência de MBL é a imunodeficiência mais comumente observada, atingindo até 30% da população geral (TURNER, 1996), e está associada a infecções graves na infância (SUMMERFIELD et al 1997) e na fase adulta (SUMMERFIELD et al., 1995). Por outro lado, há também evidência que a deficiência de MBL, em algumas circunstâncias, pode ser vantajosa, devido a uma menor indução de secreção de citocinas por macrófagos (TAKAHASHI et al., 2002). Além disso, alguns autores sugerem que a deficiência de MBL pode ser também vantajosa nas doenças infecciosas por microrganismos intracelulares, como o *Mycobacterium leprae*, devido a uma menor opsonização e fagocitose do patógeno (GARRED et al., 1994).

Recentes evidências têm demonstrado que concentrações significativamente elevadas de MBL podem causar excessiva ativação de complemento, com lesão

tecidual subsequente, devido à ligação de MBL ao endotélio, principalmente em situações de estresse oxidativo (JORDAN, MONTALTO e STHAL, 2003).

Portanto, o efeito pró-inflamatório da MBL é uma fato que foi considerado apenas recentemente.

3.3.3.3 Associação de MBL com doenças

Tanto os valores séricos de MBL, quanto o estudo do polimorfismo que determina tais valores, têm sido objeto de recentes estudos. A deficiência de MBL já foi associada a presença de numerosas doenças, inclusive reumáticas (GRAUDAL, 2000), bem como se mostrou fator protetor em outras (TAKAHASHI et al., 2002).

Concentrações baixas da proteína devido a mutações no códon 54 e o polimorfismo na região promotora relacionados à produção de concentrações baixas de MBL foram significativamente mais frequentes em uma população chinesa de pacientes com AR quando comparados com controles normais (IP et al., 2000). Concentrações séricas diminuídas de MBL também estão associados a um pior prognóstico na AR, possivelmente devido à ação moduladora que essa proteína exerce sobre a secreção de TNF- α , molécula central na patogênese da AR (GRAUDAL, 2000).

Observou-se também que concentrações baixas de MBL estão associadas à dermatomiosite do adulto, provavelmente devido a uma menor remoção de queratinócitos apoptóticos (WERTH et al., 2002).

Os genótipos relacionados a uma menor produção de MBL também foram relacionados ao desenvolvimento de LES, provavelmente associados à remoção deficiente de imunocomplexos (DAVIES et al., 1995; VILLARREAL et al., 2001) e à uma maior suscetibilidade a infecções nesses pacientes (GARRED et al, 1999a). Recentemente, demonstrou-se que complicações trombóticas nesta doença estão associadas a genótipos mutantes homozigóticos desta proteína (OHLENSCHLAEGER et al., 2004)

Segundo GARRED et al. (1992), a deleção dos mecanismos imunológicos relacionados à MBL, particularmente a ativação de complemento, reduz

significativamente a lesão proveniente da liberação de mediadores inflamatórios. Ainda, os autores sugerem que genótipos associados a concentrações séricas menores de MBL conferem proteção contra patógenos intracelulares, cuja opsonização seria dificultada pelo déficit da proteína.

Por outro lado, achados recentes têm também demonstrado a participação da proteína na patogênese de algumas morbidades. Diferentes autores encontraram depósitos de MBL provavelmente implicados na patogênese das manifestações renais da púrpura de Henoch-Schonlein (ENDO et al., 2000), na nefropatia por IgA (ENDO et al., 1998), em outras formas de glomerulonefrites humanas (LHOTTA, WURZNER e KONIG, 1999) e nas complicações vasculares do diabetes mellitus (DM) do tipo 1 (HANSEN et al., 2003).

4 Materiais e Métodos

4.1 Pacientes

Foram selecionados 100 pacientes portadores de estenose mitral reumática em acompanhamento no ambulatório de Cardiologia do HC-UFPR. Foram incluídos no estudo 23 pacientes do sexo masculino, 77 do sexo feminino, com média de idade de $45,8 \pm 11$ anos (19-76 anos). As características demográficas dos pacientes podem ser observadas na **tabela 1** e nas **figuras 15 e 16**.

Todos os pacientes tinham história clínica compatível com FR e ecocardiograma transtorácico comprovando o comprometimento reumático da válvula mitral.

Foram excluídos do estudo pacientes portadores FR ativa e de infecção e pacientes com história mórbida pregressa positiva para neoplasias, endocardite infecciosa e outras doenças inflamatórias, condições que poderiam alterar as medidas de MBL.

Entre os pacientes investigados, 28 não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico na válvula e 72 sofreram alguma intervenção operatória. As seguintes intervenções operatórias foram realizadas: 8 trocas por válvula metálica; 14 valvuloplastias por balão; 24 trocas por válvula biológica e 26 comissurotomias.

No grupo de pacientes não-operados, 14 eram portadores de estenose mitral leve, 11 de moderada e 3 de severa (**tabela 2**). No grupo de pacientes operados, 17 tinham a área valvular normal, 35 tinham estenose mitral leve, 16 moderada e 4 severa (**tabela 2**). A gravidade da estenose mitral, tanto dos pacientes operados quanto dos pacientes não-operados, está representada na **figura 17**. A área valvar média no sub-grupo de pacientes não-operados foi de $1.59 \pm 0.5 \text{ cm}^2$ e no sub-grupo de pacientes operados de $1.93 \pm 0.6 \text{ cm}^2$ (**tabela 2**).

As características clínicas e demográficas dos sub-grupos de pacientes submetidos e não-submetidos a procedimento cirúrgico podem ser vistas na **tabela 2**.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES PORTADORES DE CRC E DOS CONTROLES SAUDÁVEIS

	<i>Pacientes</i> (n=100)	<i>Controles</i> (n=99)
Idade (anos)		
média ± SD	45.8 ± 11	44.7 ± 12
limites	19-76	19-78
Sexo		
M	23	28
F	77	71
Origem étnica		
Caucasianos	82	79
Mulatos	12	15
Negros	5	3
Índios	1	1
Orientais	0	1

FIGURA 15 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM CRC E DOS CONTROLES SAUDÁVEIS DE ACORDO COM O SEXO.

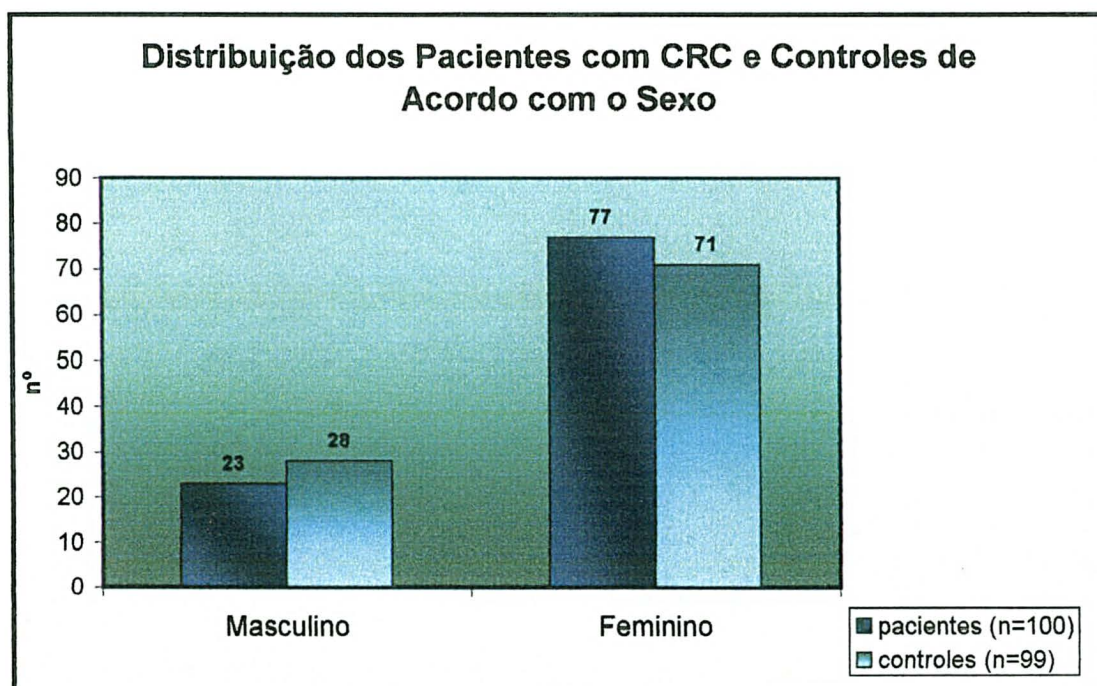


FIGURA 16 – DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DOS PACIENTES E CONTROLES NORMAIS (anos)

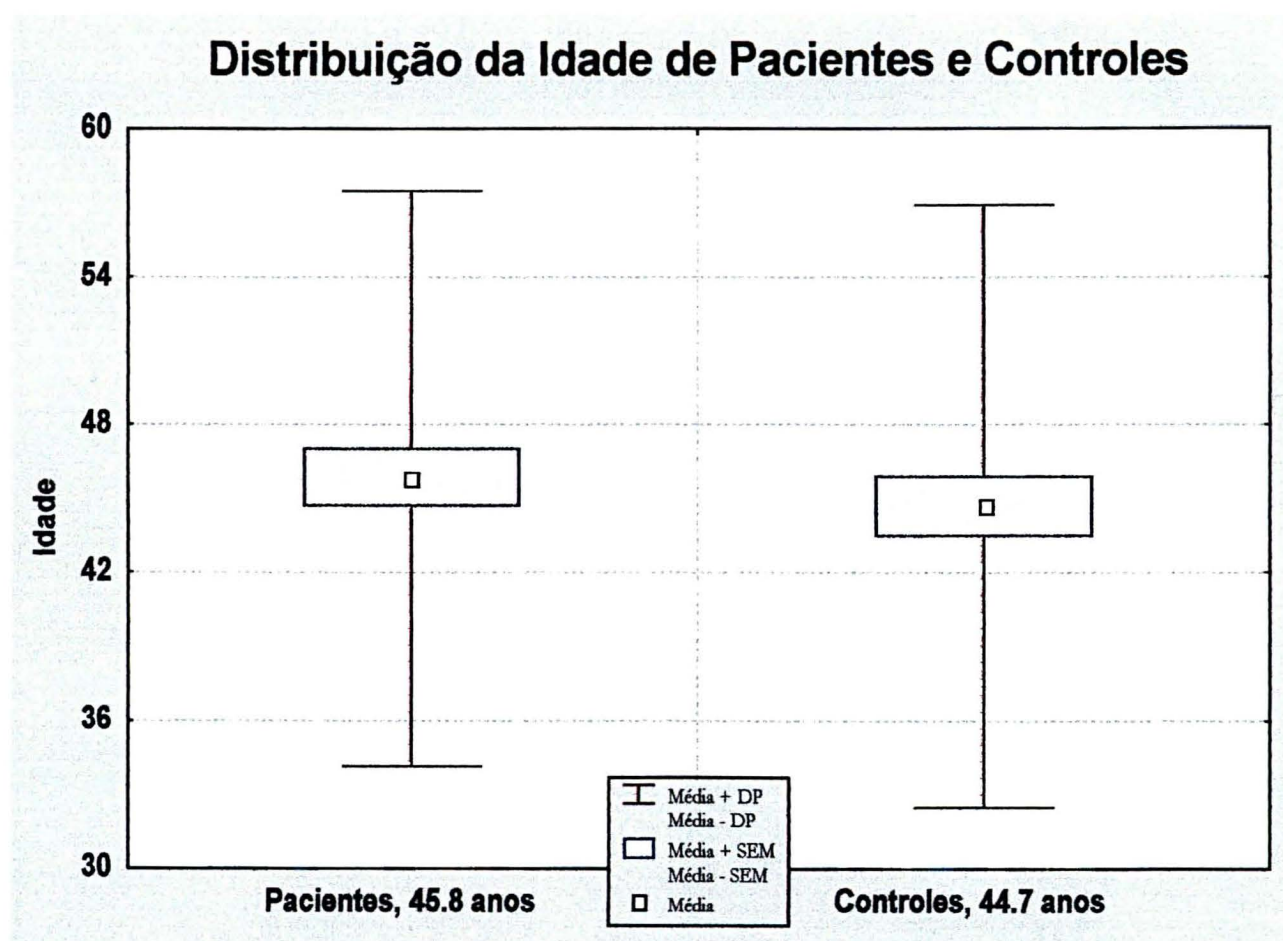
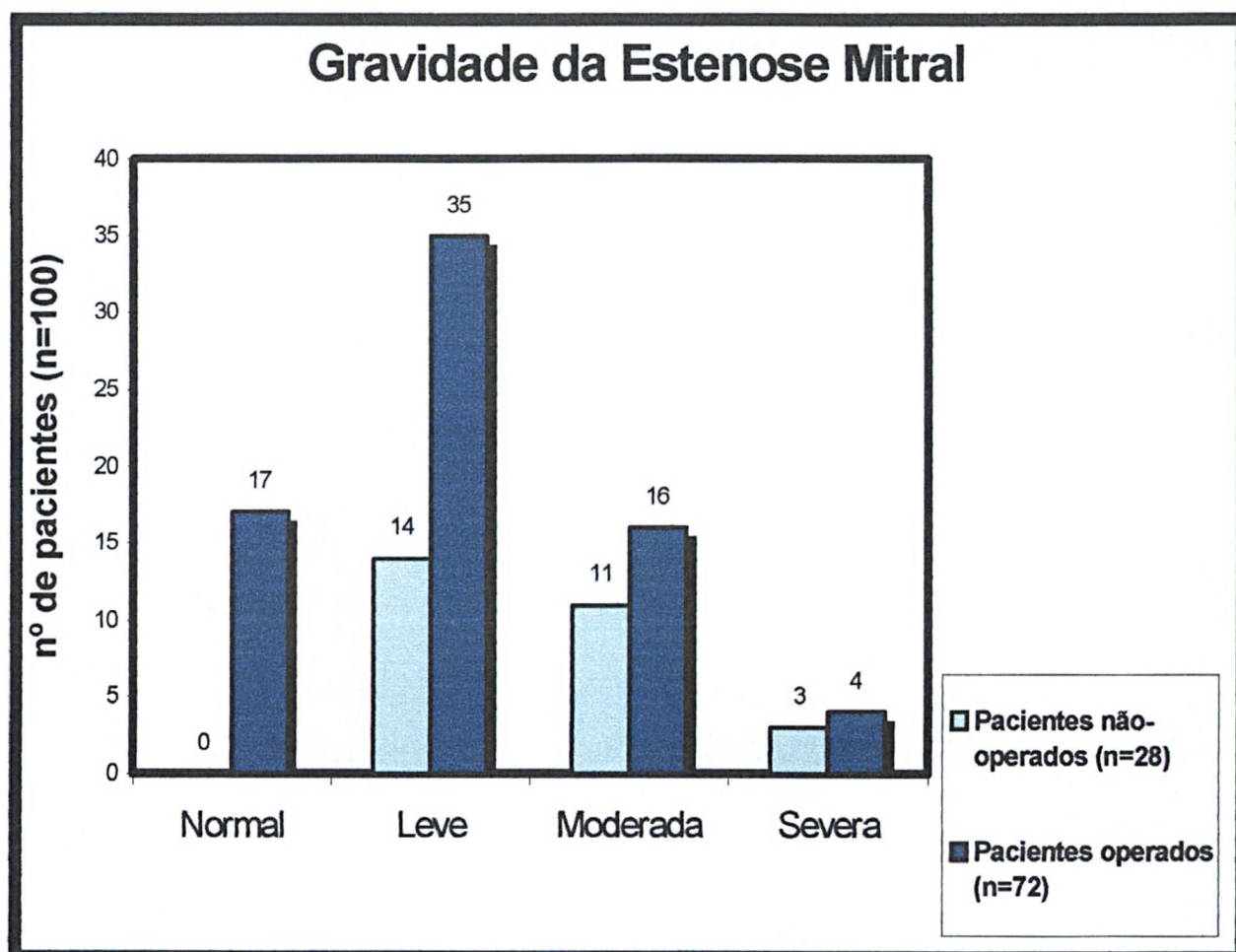


TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES SUBMETIDOS OU NÃO À CIRURGIA

	Não-submetidos à cirurgia (n=28)	Submetidos à cirurgia (n=72)	<i>p</i>
Idade (anos)	45,5±10	45,9±12	ns
Sexo			
Feminino	20	57	ns
Masculino	8	15	ns
Origem étnica			
Caucasianos	21	61	ns
Mulato	6	6	ns
Negro	1	4	ns
Índio	0	0	ns
Oriental	0	1	ns
Área valvar média (cm²)	1.59 ± 0.5	1.93 ± 0.6	0.012
Gravidade da estenose mitral			
Normal	0	17	
Leve	14	35	
Moderada	11	16	
Severa	3	4	

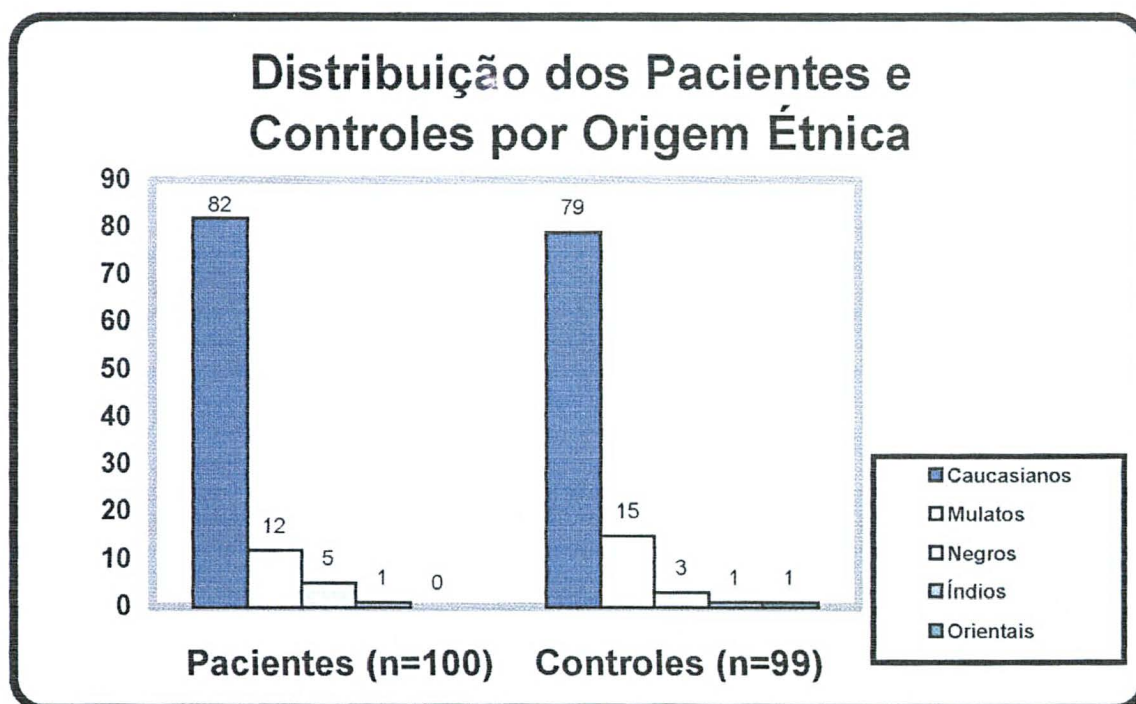
ns = não-significativo

FIGURA 17 – GRAVIDADE DA ESTENOSE MITRAL NO GRUPO DE PACIENTES COM CRC SUBMETIDOS OU NÃO À CIRURGIA, AVALIADA ATRAVÉS DE ECOCARDIOGRAMA TRANSTORÁCICO



Quanto à origem étnica, entre os 100 pacientes estudados, 82% foram de origem caucasóide, 12% mulatos, 5% negros e 1% de origem indígena (**figura 18**).

FIGURA 18 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM CRC E CONTROLES NORMAIS POR ORIGEM ÉTNICA



4.2 Controles

Como grupo controle, foram selecionados 99 voluntários saudáveis, com idade, sexo e origem étnica e geográfica semelhantes aos pacientes (tabela 1). A média de idade entre os controles foi de $44,7 \pm 12$ anos (19-78). Dentre eles, 28 eram do sexo masculino e 71 do sexo feminino. A origem étnica caucasóide foi observada em 79% dos indivíduos, seguida de 15% de mulatos, 3% de negros, 1% de índios e 1% de orientais.

Tanto os pacientes quanto os controles assinaram um termo de compromisso livre e esclarecido de participação no estudo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC/UFPR.

4.3 Soro

Foram coletadas amostras de 10 ml de sangue venoso sem anticoagulante de cada paciente e controle, as quais foram centrifugadas a 2000 r.p.m. por 15 minutos e tiveram o soro separado e aliquotado em frascos de Ependorff com capacidade de 0.5 ml cada. As alíquotas foram armazenadas a -70°C , até o dia das determinações laboratoriais.

4.4 MBL

A avaliação da concentração sérica da MBL foi realizada através de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se kits comerciais (Staten Serum Institute, Dinamarca). Foram considerados como normais os valores de MBL acima de 1000 ng/ml. Os indivíduos com valores de MBL sérica abaixo de 50 ng/ml foram considerados deficientes.

O ensaio de ELISA foi realizado em micro placas adsorvidas com anticorpo monoclonal dirigido contra o domínio de carboidratos da MBL. O ensaio se desenvolveu em quatro etapas (**figuras 19 e 20**):

Passo 1: As alíquotas dos calibradores e as amostras diluídas de soro dos pacientes e dos controles (em uma proporção de 1/100 com a solução de diluição) foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. A MBL presente na solução se liga aos anticorpos monoclonais anti-MBL, e o material restante foi removido por lavagem com uma solução própria, por 3 vezes.

Passo 2: Anticorpo monoclonal biotinizado anti-MBL é acrescido à reação e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Esse anticorpo de detecção se liga aos oligômeros de MBL através do sítio de ligação com carboidratos que não estão sendo utilizados na ligação com o anticorpo primário. Os anticorpos não ligados foram removidos por lavagem, da mesma maneira que no passo anterior.

Passo 3: 100 μL de estreptavidina conjugada com HRP (*horseradish peroxidase*) foi acrescentada à placa formando um complexo com o anticorpo biotilado. O conjugado não-ligado foi removido por lavagem.

Passo 4: Como substância cromógena utilizou-se tetrametilbenzidina (TMB). A estreptavidina reage com o substrato, gerando um produto colorido.

A reação enzimática foi bloqueada quimicamente com 50 μL de uma solução de bloqueio por 30 minutos e a intensidade de cor foi aferida em um leitor de ELISA a 450 nm. A densidade óptica é proporcional à concentração de formas oligoméricas de MBL presentes na reação. Os resultados dos calibradores foram utilizados para se construir uma curva, através da qual os valores séricos de MBL foram determinados.

FIGURA 19 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO DE ELISA PARA A DETERMINAÇÃO SÉRICA DA CONCENTRAÇÃO DE MBL

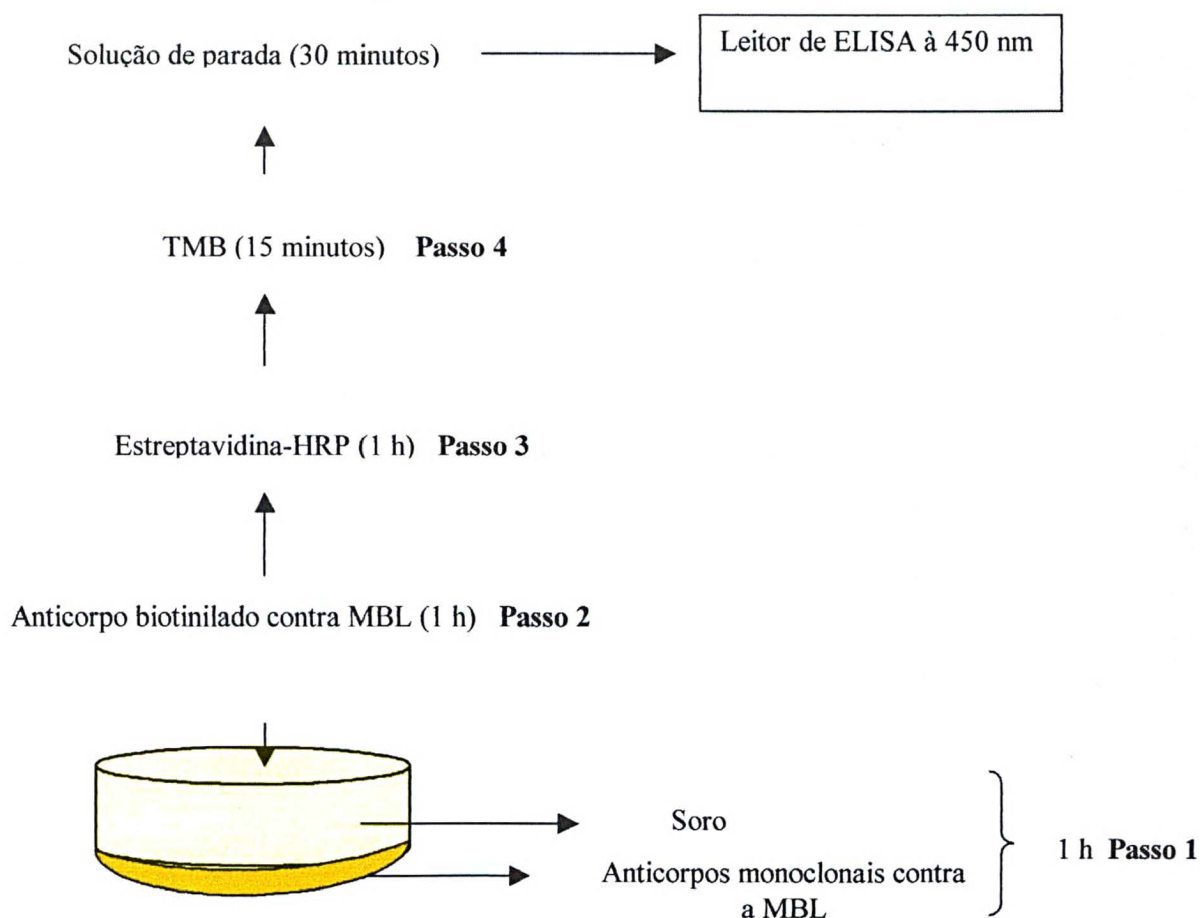
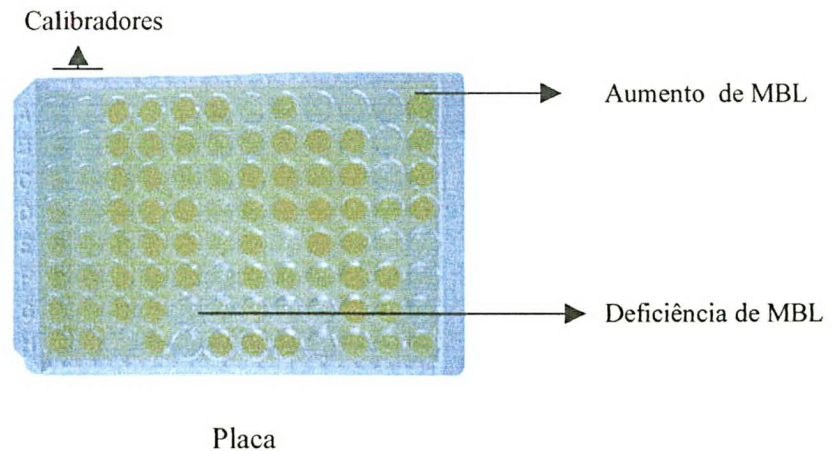


FIGURA 20 – PLACA DE ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE MBL SÉRICA



4.5 Determinação das concentrações séricas de C3 e C4

A concentração sérica de C3 e de C4 foi determinada em 80 pacientes, através de imunoturbidimetria, utilizando-se kits comerciais (Dade Behring, Alemanha), considerado-se como valores normais de C3 os situados entre 50 e 90 mg/dl e de C4 entre 10 e 40 mg/dl.

4.6 Análise estatística

Todos os dados foram testados quanto ao padrão de distribuição (normal ou não). As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas utilizando-se o teste *t de Student* bi-caudal e o teste de *Kruskal-Wallis*. Para determinação das correlações foram utilizados os coeficientes de correlação de *Pearson* e *Spearman*. Para diferenças entre valores encontrados e esperados foi utilizado o teste do *qui-quadrado* com correção de *Yates*. Os resultados estão apresentados como média \pm SEM (erro-padrão da média). Toda a análise estatística foi realizada com o programa *Statistica for Windows* versão 99. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5 Resultados

5.1 Concentração sérica de MBL

As concentrações circulantes de MBL encontraram-se significativamente elevadas nos pacientes quando comparadas com os controles (3036.16 ± 298.9 SEM vs 1942.62 ± 185.5 SEM ng/ml; $p < 0.003$). Entre os pacientes, as concentrações de MBL variaram de 0 até 14.000 ng/ml, e entre os controles as concentrações variaram de 0 a 6.200 ng/ml.

A distribuição da concentração sérica de MBL nos pacientes com CRC e controles normais pode ser observada nas **figuras 21 e 22**.

FIGURA 21 – DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES COM CRC E CONTROLES NORMAIS

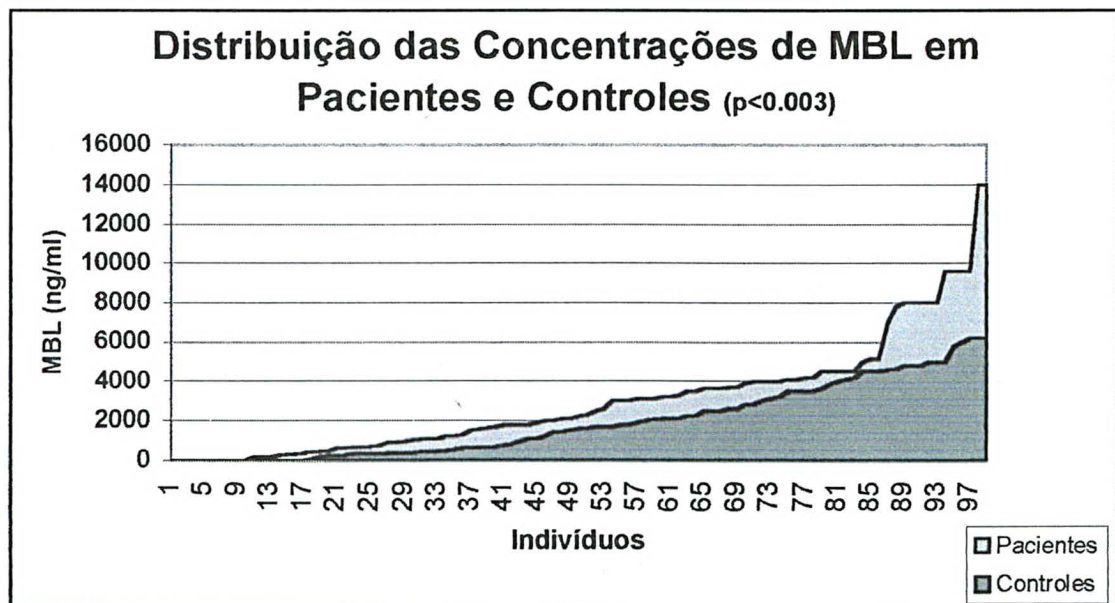
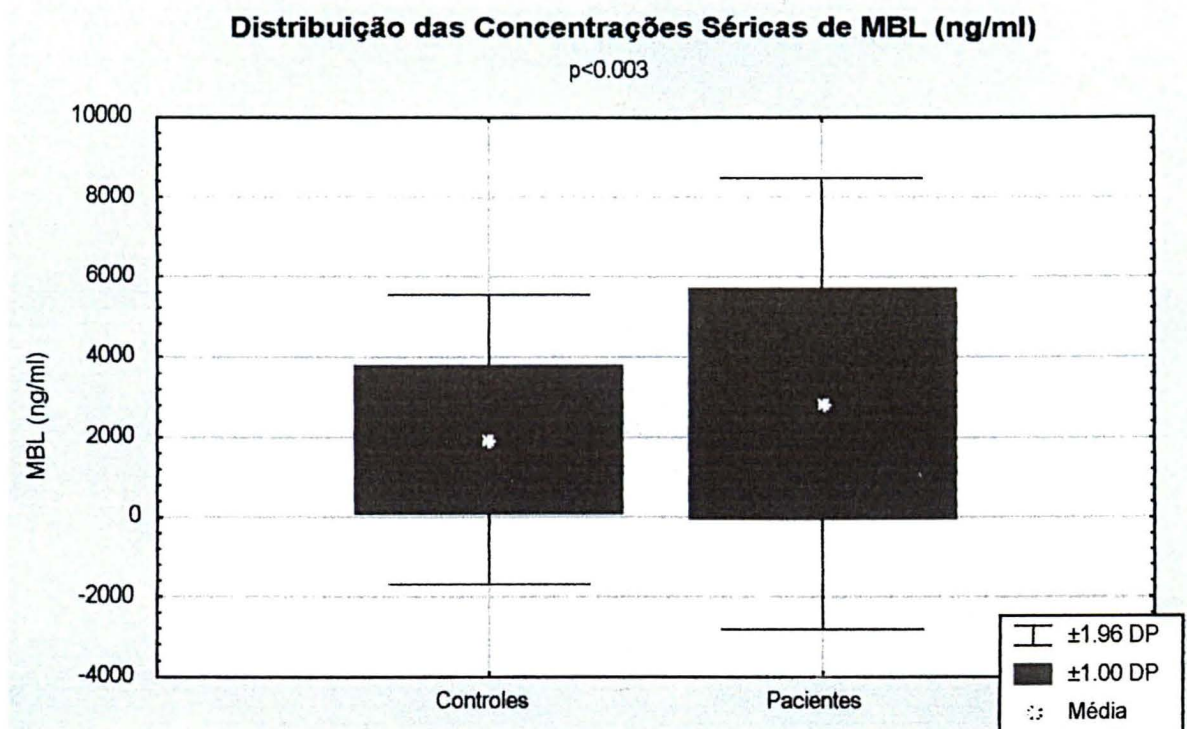


FIGURA 22 – DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS MÉDIAS DE MBL (ng/ml) EM PACIENTES COM CRC E CONTROLES NORMAIS



Os valores de MBL sérica observados não diferiram quanto ao sexo tanto nos pacientes quanto nos controles. Entre os pacientes, a concentração média de MBL no grupo do sexo masculino foi de 3819.56 ± 555.9 ng/ml e no grupo do sexo feminino foi de 2799.0 ± 348.5 ng/ml ($p < 0.13$) **figura 23**.

Entre os controles, a concentração média de MBL no grupo do sexo masculino foi de 2390.35 ± 403.5 ng/ml, e no grupo do sexo feminino foi de 1766.05 ± 202.1 ng/ml ($p < 0.18$) **figura 23**.

Não houve diferença também nas concentrações de MBL em relação à origem étnica, tanto do grupo de pacientes como do grupo de controles ($p < 0.81$ no grupo de pacientes e $p < 0.83$ no grupo dos controles).

A concentração sérica de MBL foi indetectável em 9% dos pacientes e em 17.1% dos controles ($p < 0.09$) e estes foram portanto considerados como deficientes de MBL. Dos 9 pacientes deficientes de MBL, todos pertenciam ao sexo feminino

($p < 0.071$). Entre os controles deficientes de MBL, 6 eram do sexo masculino, e 11 pertenciam ao sexo feminino ($p < 0.48$).

Valores de MBL acima de 1000 ng/ml compatíveis com genótipos YA/YA e YA/XA foram observados em 71.0% dos pacientes e em 55.5% dos controles ($p < 0.035$) (figura 24).

Não houve diferença significativa entre os valores de MBL dos pacientes operados e não-operados (2944.2 ± 185.5 SEM vs 3269.2 ± 298.0 SEM; $p < 0.66$), como pode ser observado na tabela 3. Porém os valores de MBL foram mais elevados tanto no sub-grupo de pacientes não-operados ($p < 0.007$) quanto no grupo de pacientes operados ($p < 0.005$) quando comparados estes sub-grupos com os controles normais.

FIGURA 23 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL DE ACORDO COM O SEXO DOS PACIENTES COM CRC E DOS CONTROLES NORMAIS

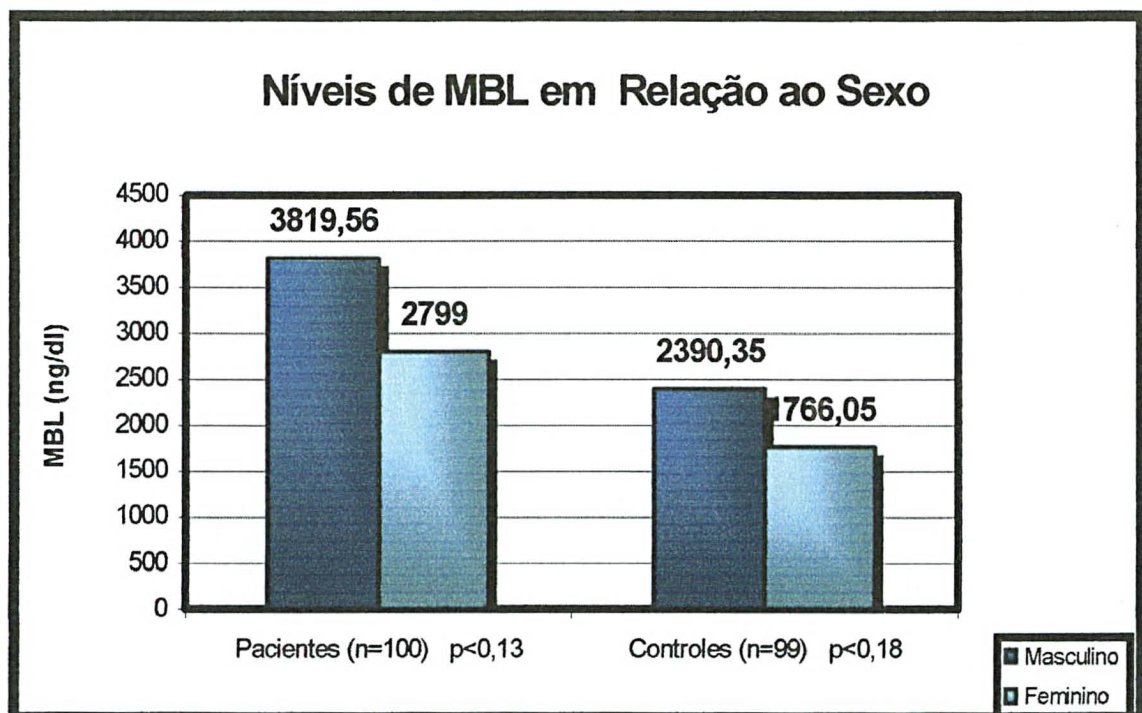
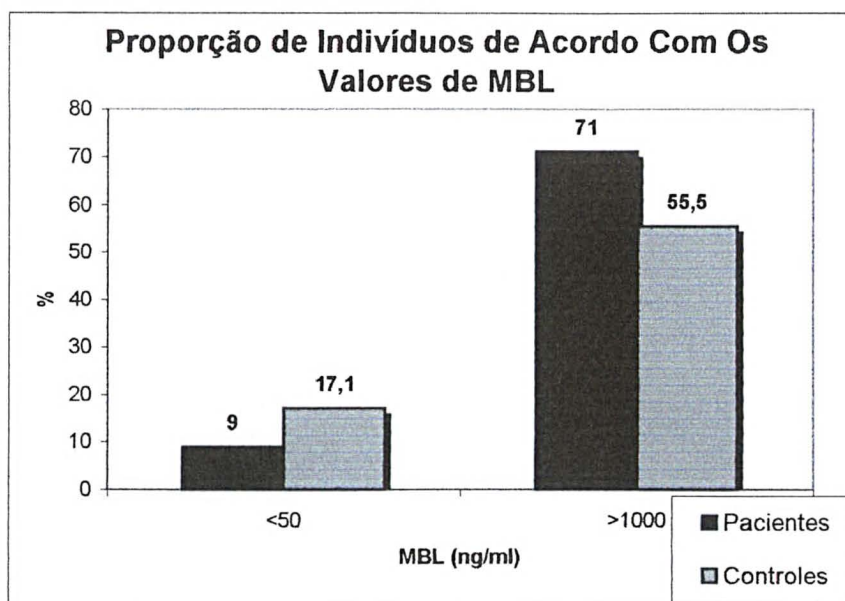


FIGURA 24 – PROPORÇÃO DE INDIVÍDUOS COM VALORES DE MBL CIRCULANTE <50 ng/ml ($p<0.09$) E >1000 ng/ml ($p<0.03$)



A distribuição da MBL circulante foi avaliada quanto à gravidade do acometimento valvar nos pacientes não-operados, avaliada ecocardiograficamente. Os resultados demonstraram que não houve correlação entre as concentrações de MBL e a área valvar ($r=0.27$, $p<0.17$) e a idade ($r= -0.19$; $p<0.3$) no grupo de pacientes não-operados (**figuras 25 e 26**).

TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DE MBL, C3 E C4 CIRCULANTES NOS PACIENTES COM CRC SUBMETIDOS OU NÃO A TRATAMENTO CIRÚRGICO (valores expressos em média \pm SEM)

	Não-submetidos à cirurgia (n=28)	Submetidos à cirurgia (n=72)	<i>p</i>
MBL (ng/dl)	3269.28 \pm 298.0	2944.22 \pm 185.5	0.66
C3	97.4 \pm 4.2 (n=22)	113.6 \pm 4.5 (n=58)	0.044
C4	20.7 \pm 0.8 (n=22)	23.5 \pm 1.0 (n=58)	0.16

FIGURA 25 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE MBL CIRCULANTE E A IDADE DOS PACIENTES COM CRC NÃO-OPERADOS

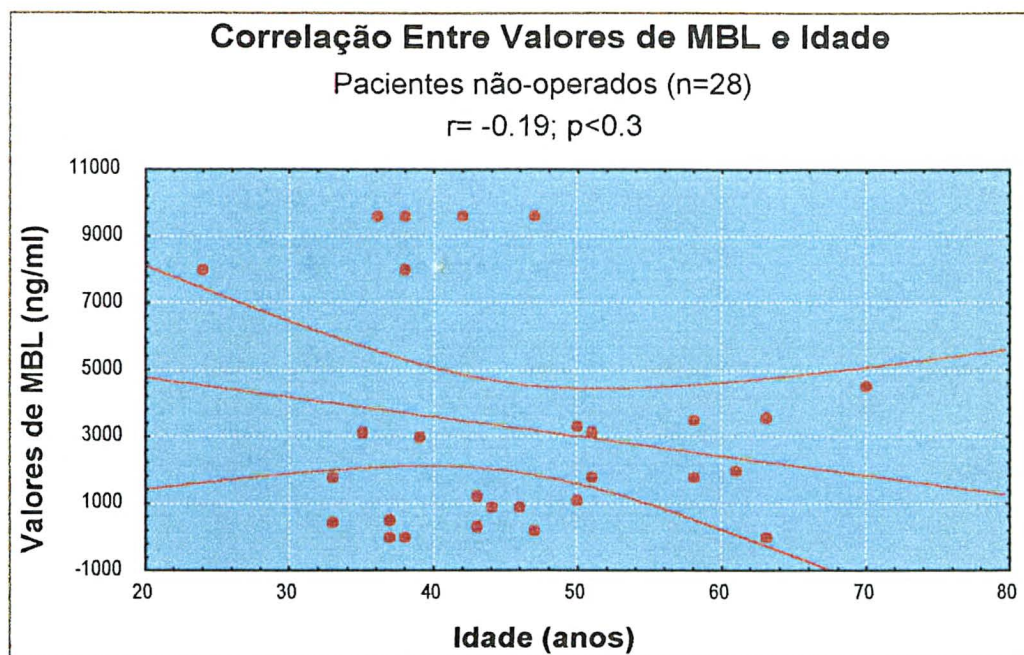
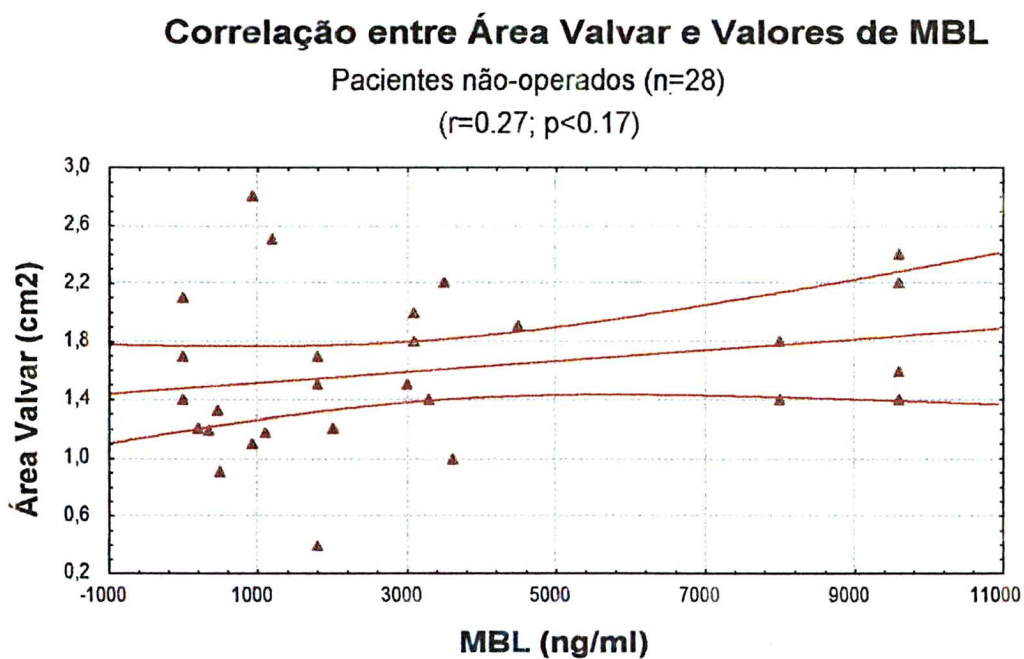


FIGURA 26 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE MBL E ÁREA VALVAR DOS PACIENTES COM CRC NÃO-OPERADOS



Com relação ao tipo de cirurgia, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa dos valores de MBL entre os pacientes submetidos à comissurotomia ou valvuloplastia por balão ($3321.5 \pm 529.4.0$ ng/ml, $n=38$) e os pacientes submetidos a troca valvar (2451.4 ± 339.1 ng/ml; $n=34$; $p<0.29$).

5.2 Concentrações séricas de C3 e de C4.

Observou-se um aumento na concentração média de C3 nos pacientes avaliados: 109.2 ± 3.6 mg/dl ($n=80$). Os valores de C3 variaram de 50.3 a 198.0 mg/dl. Observou-se também que as concentrações séricas de C3 foram significativamente maiores nos pacientes operados ($n=58$) do que nos pacientes não-operados ($n=22$) (113.6 ± 4.5 vs 97.4 ± 4.2 mg/dl; $p<0.04$).

A concentração sérica média de C4 observada nos pacientes ficou dentro dos limites normais: 22.7 ± 0.8 mg/dl ($n=80$). Os valores de C4 variaram de 6.8 a 45.4 mg/dl. Não houve diferença estatística dos valores de C4 entre os pacientes não-submetidos a algum procedimento cirúrgico e os operados (20.7 ± 0.8 vs 23.5 ± 1.0 mg/dl, $p<0.18$) **tabela 3**.

Observou-se correlação positiva entre os valores de C3 e C4 observados nos pacientes ($r=0.27$; $p<0.012$) **figura 27**. Porém não houve correlação entre os valores de C3 e MBL ($r= -0.17$; $p<0.23$) **figura 28**, nem entre os valores de C4 e MBL ($r= -0.008$; $p<0.16$) **figura 29**.

FIGURA 27 – CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE C3 E DE C4 NOS PACIENTES COM CRC

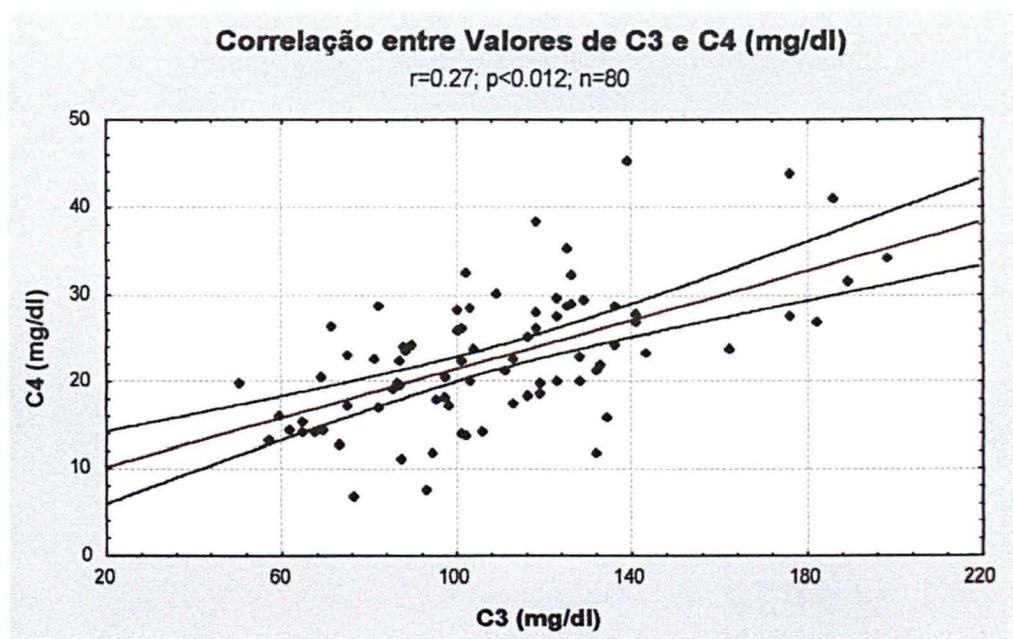


FIGURA 28 – CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE C3 E DE MBL NOS PACIENTES COM CRC

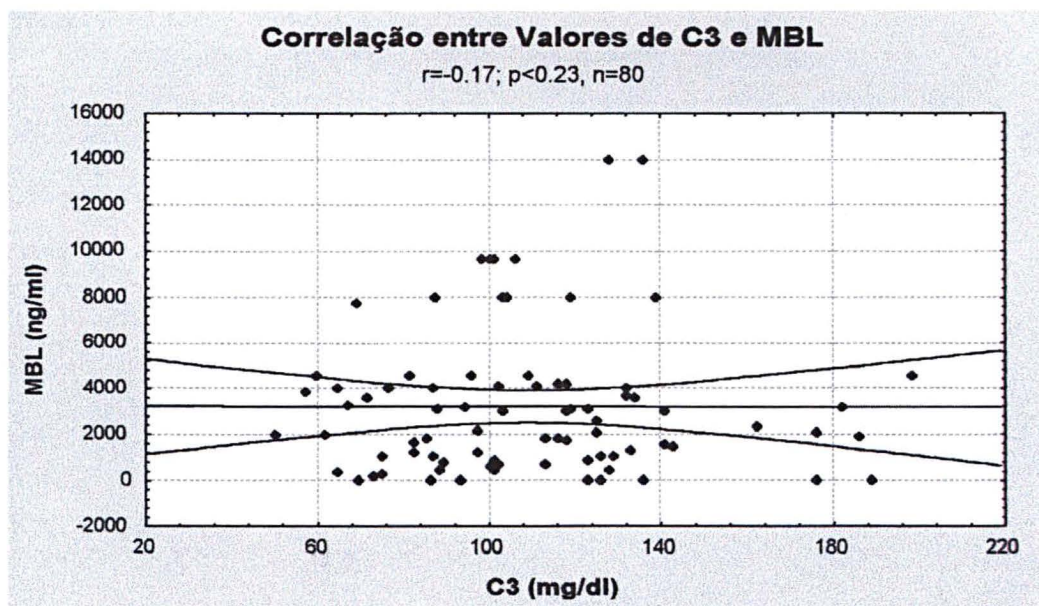
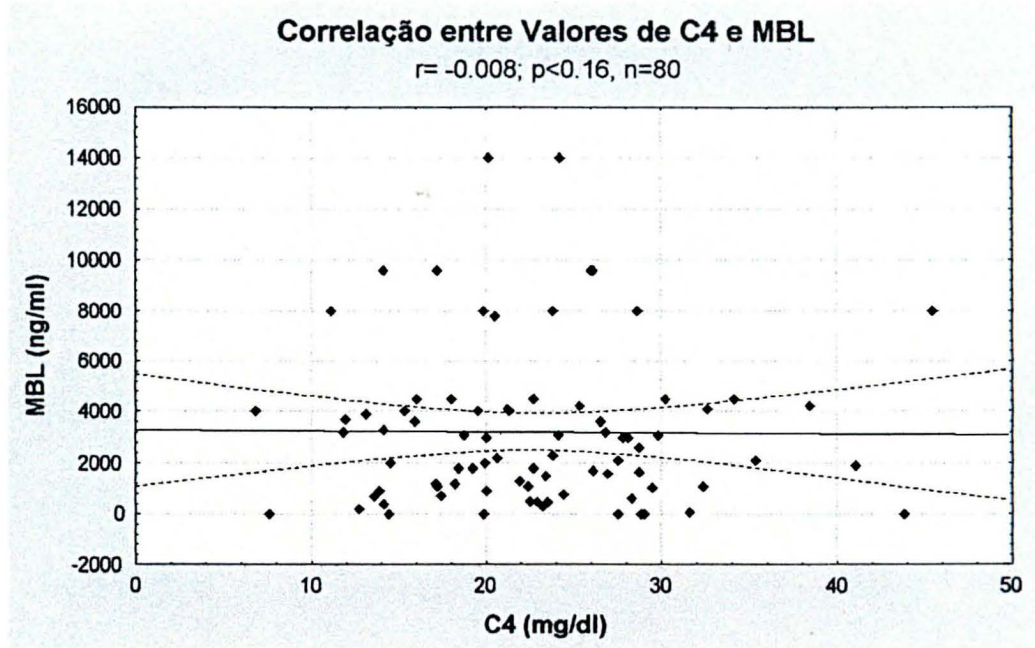


FIGURA 29 – CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE C4 E DE MBL NOS PACIENTES COM CRC



6 Discussão

A determinação da concentração de MBL circulante nos pacientes portadores de CRC revelou valores significativamente maiores da proteína quando comparados aos controles saudáveis utilizados no estudo.

A MBL recentemente ganhou reconhecimento como um fator importante na imunidade inata do indivíduo. Enquanto que a associação da deficiência de MBL já foi relatada em uma variedade de doenças de caráter auto-imune e infecciosas (DAVIES et al., 1995, GRAUDAL, 1998, VILLARREAL et al., 2001, WERTH et al., 2002), a associação de valores circulantes elevados da proteína com doenças só foi descrita recentemente (GRAUDAL, 1998, COLLARD et al., 2000, HANSEN et al., 2003).

A deficiência de MBL é comum, atingindo de 5 a 30% das pessoas, em diferentes populações. A mutação do gene da MBL mais freqüente em caucasóides ocorre no códon 54, numa freqüência que varia de 11 a 16% (TURNER, 1996). Em alguns indivíduos a deficiência de MBL parece não trazer problemas, porém em outros, a deficiência da mesma leva a uma suscetibilidade maior a infecções recorrentes severas (SUMMERFIELD et al., 1995). O papel da MBL na defesa contra infecções parece ser mais importante nos primeiros anos de vida, quando o sistema imunológico do indivíduo ainda não se encontra plenamente desenvolvido. Em crianças, as concentrações de MBL podem variar de 500 ng/ml, quando ainda encontram-se em vida intra-uterina, na 25^a. semana de gestação; a 1780 ng/ml, na vigésima semana de vida pós-termo (TURNER, 1996).

DAVIES et al. (1995) compararam a freqüência da mutação no códon 54 do gene da MBL, responsável por concentrações séricas menores da proteínas, entre 42 pacientes portadores de LES e 41 controles saudáveis e encontraram uma freqüência maior desta mutação no grupo de pacientes ($p=0.08$). Também estudando pacientes portadores de LES, VILLARREAL et al. (2001) encontraram uma freqüência também maior desta mesma mutação no grupo de pacientes, quando compararam 125 portadores de LES com o mesmo número de controles saudáveis ($p=0.007$).

GRAUDAL (1998), em um estudo longitudinal de pacientes dinamarqueses portadores de AR, observaram que mais pacientes (11%) que controles saudáveis (3%), tinham concentrações séricas de MBL indetectáveis, e que as concentrações baixas de MBL são associadas com pior prognóstico nesta doença.

Como a MBL é uma molécula capaz de ativar complemento e a ativação excessiva do mesmo pode levar a danos ao indivíduo, a participação da MBL como fator patogênico tem sido investigada em algumas doenças.

Recentemente, concentrações séricas elevadas de MBL foram associadas à patogênese de algumas doenças, como o diabetes mellitus (HANSEN et al., 2003) e a injúria pós-reperfusão (COLLARD et al., 2000).

Uma vez que pacientes renais crônicos são propensos ao desenvolvimento de doenças infecciosas e complicações ateroscleróticas e que a ativação de complemento está envolvida na aterogênese, SATOMURA (2002) avaliaram a concentração sérica de MBL em pacientes renais crônicos em tratamento-pré-dialítico, tratamento dialítico e controles saudáveis. Os autores encontraram concentrações aumentadas da proteína em ambos os grupos de pacientes, notadamente naqueles em tratamento dialítico, quando comparados com os controles saudáveis. Esses resultados sugerem o envolvimento da MBL nas complicações aterogênicas da insuficiência renal crônica.

LHOTTA, WURZNER e KONIG (1999) demonstraram deposição glomerular de MBL em pacientes portadores de glomerulonefrites. Os autores encontraram depósitos de MBL em pacientes portadores de nefropatia lúpica (15 de 16 pacientes), nefropatia membranosa (10 de 15), glomerulonefrite membranoproliferativa do tipo I (5 de 6) e nefrite anti-membrana basal (2 de 4). O depósito de MBL foi semelhante ao de imunoglobulinas, C1q, C3 e do complexo terminal do complemento. Através desses dados, os autores concluíram que a MBL se liga a estruturas do glomérulo através de seu sítio de ligação a carboidratos, levando à clivagem de C2 e de C4 através das serina-proteases MASP-1 e MASP-2. Assim, a via das lectinas estaria envolvida no mecanismo de lesão glomerular vista nestes pacientes.

ENDO et al., (1998), observaram em 11 de 45 pacientes portadores de nefropatia por IgA (24,4%) o depósito glomerular do complexo de MBL/MASP-1, associado a C3b, C3c e C5b-9, demonstrando ativação local de complemento. Como

controles foram utilizados 35 pacientes portadores de outros tipos de glomerulonefrites, sendo que a deposição do complexo MBL-MASP-1 foi observado em apenas um deles. Tais dados colocam a via das lectinas também como fator patogênico para o desenvolvimento deste sub-grupo de glomerulonefrite. Diversos antígenos virais (citomegalovírus, vírus Epstein-Baar, adenovírus, herpes simples, vírus da hepatite B) e bacterianos (*Haemophilus parainfluenzae*, *Escherichia coli*) têm sido propostos como desencadeantes dos depósitos mesangiais de IgA. Como a MBL é uma molécula capaz de se ligar a uma ampla variedade de bactérias e vírus, esta seria uma explicação para os depósitos de MBL nestes glomérulos. Um outro mecanismo especulado para tal depósito seria baseado nos estudos de MALHOTRA et al. (1995), que demonstraram que a MBL é capaz de se ligar também a formas de IgG que sofreram alteração da constituição de carboidratos e não possuem galactose (sub-tipo de IgG que aparece em algumas condições inflamatórias crônicas), levando também a ativação do complemento.

Essas mesmas formas de IgG sem galactose estão relacionadas com a artrite reumatóide (AR), aparecendo tanto no soro quanto nas articulações desses pacientes. Uma vez que a MBL é capaz de se ligar a esta forma de IgG e promover ativação de complemento, KILPATRICK (1997) compararam as concentrações séricas de MBL de 99 pacientes portadores de AR com 352 controles normais, encontrando valores maiores de MBL sérica no grupo de pacientes com AR ($p=0.06$). Os autores concluíram que desta maneira a MBL poderia ser responsável pela ativação do complemento que é observada nas articulações dos pacientes portadores de AR.

ENDO et al., em outro estudo (2000), analisaram biópsias renais de 10 pacientes portadores da síndrome de Henoch-Schonlein e encontraram depósitos glomerulares de MBL e MASP-1 em 8 deles, bem como depósitos de produtos de ativação do complemento (C3b/C3c, C5b-9 e proteína ligante de C4). Os autores compararam as concentrações séricas dos fragmentos de ativação do complemento C4d e C4bp destes pacientes com as concentrações de 10 pacientes portadores de glomerulonefrites não-dependentes de IgA. Nos pacientes portadores da síndrome de Henoch-Schonlein, as concentrações séricas dos fragmentos de ativação do

complemento foram maiores, levantando a hipótese da participação da via das lectinas como mecanismo patogênico neste tipo de vasculite.

Em outro estudo, HANSEN et al. (2003) demonstraram concentrações séricas aumentadas de MBL em pacientes portadores de diabetes mellitus (DM) quando comparados a controles saudáveis. Normalmente, a MBL não reconhece os tecidos do próprio organismo, porém a hipóxia celular pode alterar a glicosilação das superfícies celulares, levando à deposição de MBL e ativação de complemento (COLLARD et al., 2000). O diabetes está associado a glicosilações não-enzimáticas anormais, não somente na hemoglobina, mas em uma ampla variedade de outras moléculas, como estruturas endoteliais, proteínas circulantes e lipídios. Desta maneira, os autores levantam a hipótese de que a MBL colabora para o estado inflamatório crônico visto nos pacientes diabéticos através da ativação crônica de complemento.

A reperfusão, embora necessária para a preservação de tecidos após injúria, está associada com injúria adicional mediada por neutrófilos. Adicionalmente, a restauração de fluxo sanguíneo a tecidos isquêmicos inicia uma série de eventos pró-inflamatórios incluindo sequestração de neutrófilos, disfunção endotelial e ativação de complemento, que podem levar a um dano maior subsequente. O sistema complemento exerce uma ação fundamental no desenvolvimento de lesão tecidual após estresse oxidativo. COLLARD et al. (2000), em um estudo experimental, investigaram a participação da MBL e da via das lectinas na ativação de complemento após estresse oxidativo. Através da análise do miocárdio de ratos submetidos a estímulo hipóxico, os autores observaram uma deposição endotelial precoce de MBL e C3. Em animais tratados com anticorpo monoclonal anti-MBL, os autores observaram diminuição da deposição de C3 e iC3b, mostrando uma provável participação da MBL nas lesões induzidas pelo estresse oxidativo pós-reperfusão. Tendo em vista tais afirmações, JORDAN, WURZNER e KONIG (2003) realizaram um estudo bloqueando a atividade da MBL através de anticorpos monoclonais específicos anti-MBL em ratos submetidos a restauração do fluxo coronariano após infarto agudo do miocárdio (IAM), observando que a extensão do dano miocárdico foi menor nos animais submetidos à inibição da MBL. Nesses a expressão de moléculas de adesão (ICAM, VCAM) e a concentração de interleucina-6 também foram

menores do que nos animais não-submetidos ao bloqueio de MBL. Esses dados indicam a participação da via das lectinas nos danos conseqüentes à injúria pós-reperusão.

O papel do estresse oxidativo já foi estudado em algumas doenças reumáticas. AMES et al. (1999) avaliaram um marcador de estresse oxidativo denominado 8-epi-PGF_{2α} (molécula derivada do ataque de radicais livres ao ácido araquidônico) no soro de pacientes portadores de doenças reumáticas com envolvimento vascular. Os autores encontraram concentrações elevadas dessa molécula em pacientes portadores de LES, esclerodermia e vasculites (granulomatose de Wegener, síndrome de Churg-Strauss e doença de Behçet), quando comparados a controles saudáveis.

CHIU et al (2003), estudando as concentrações séricas de produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) e proteína C-reativa de alta sensibilidade (hs-CRP) - marcadores sensíveis de estresse oxidativo e de inflamação sistêmica, respectivamente - em 61 pacientes portadores de CRC, encontraram valores significativamente mais elevados desses marcadores nos pacientes quando comparados a controles normais. Esses dados indicam a participação do estresse oxidativo na inflamação crônica vista nos pacientes com CRC.

A enzima NADPH oxidase está envolvida diretamente na produção de radicais livres. KUMAR et al. (1991) estudaram a atividade desta enzima após estimulação da atividade oxidativa de monócitos e neutrófilos de pacientes portadores de febre reumática aguda, cardiopatia reumática crônica e faringite estreptocócica. O seguimento foi feito no 15º dia e nos 3º e 6º meses. Houve elevação da atividade enzimática no grupo FR e CRC, mas não no grupo da faringite estreptocócica. E durante o período de seguimento, houve um declínio progressivo na atividade enzimática no grupo FR, o que não ocorreu na CRC, onde a atividade permaneceu estável por todo o período, indicando um processo contínuo de estresse oxidativo na CRC.

Através desses dados, poderíamos especular que o estresse oxidativo crônico presente nos pacientes portadores de CRC, seria um fator desencadeante de ativação de complemento com participação da MBL e da via das lectinas, nesses pacientes. Em condições normais, a MBL não se liga a tecidos próprios, porém em situações de

hipóxia celular, pode haver glicolização de superfícies celulares, levando à deposição de MBL e ativação do complemento (COLLARD et al., 2000).

Além disso, as concentrações elevadas de MBL observadas nos pacientes com CRC podem ser um fator intensificador da inflamação crônica nesses pacientes, contribuindo para a lesão cardíaca através de complemento.

No presente estudo, as concentrações de MBL foram significativamente elevadas no grupo dos pacientes, porém não houve correlação entre os valores de MBL com a gravidade da doença cardíaca, determinada através de ecocardiograma transtorácico. Além disso, um significativo número de pacientes (71%), apresentaram concentrações de MBL acima de 1000 ng/ml. Por outro lado, a deficiência de MBL foi mais prevalente entre os controles saudáveis, uma vez que concentrações séricas de MBL menores que 50 ng/ml foram encontradas em 9% dos pacientes com CRC e em 17% dos controles saudáveis. Estes resultados sugerem que a deficiência de MBL pode representar uma vantagem em relação ao desenvolvimento de CRC, e que concentrações elevadas da mesma podem estar relacionadas ao desenvolvimento da doença.

A deficiência de MBL é também considerada como um fator protetor contra certos patógenos intracelulares, particularmente aqueles que se utilizam de receptores de C3 para parasitar o hospedeiro, como as micobactérias, pelo fato de atuar na opsonização desses micorganismos (BELLAMY et al., 1998).

Existem amplas evidências de atividade inflamatória crônica na CRC. Em um estudo CHOPRA et al. (1988), através de análise de apêndices atriais de 50 pacientes portadores de CRC, coletados durante valvulotomia mitral fechada, demonstraram a presença de nódulos de Aschoff em 56% das amostras, sendo que não havia evidência clínica e laboratorial de atividade reumática em nenhum dos pacientes. As proporções de células encontradas foram: linfócitos T CD4+ (45,1%), linfócitos T CD8+ (23,5%) e macrófagos (29,3%). A presença de nódulos de Aschoff com infiltrados mononucleares abundantes sugerem a possibilidade de cardite subclínica nesses pacientes.

YETKIN et al. (2001) demonstraram elevadas concentrações séricas de moléculas de adesão (E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1) em pacientes portadores de

estenose mitral reumática quando comparados a controles saudáveis. O papel fundamental das moléculas de adesão em condições inflamatórias e imunológicas tem sido elucidado nos últimos anos. Essas têm uma função importante na migração das células para os sítios de inflamação e na transmigração de linfócitos, e são expressas no endotélio vascular servindo como ligantes de células inflamatórias circulantes. As moléculas de adesão aparecem em pequenas quantidades circulantes no soro de pessoas saudáveis, mas aumentam naquelas com certas doenças, particularmente vasculares e inflamatórias, como no LES e na esclerodermia (FERRUFINO, 2002). O aumento das moléculas de adesão circulantes encontrados em pacientes com estenose mitral reumática é um outro dado que corrobora a hipótese de inflamação contínua na CRC.

STAKISAITIS et al. (2004), tendo em vista as similaridades entre as alterações encontradas em válvulas cardíacas reumáticas fibrosadas e as placas de aterosclerose, determinaram a concentração de apolipoproteína A-1 em pacientes portadores de CRC. A apolipoproteína A-1 é o principal componente do HDL (high-density lipoprotein) e possui efeitos antiinflamatórios, inibindo a ativação de neutrófilos mediada por IgG. Nesse estudo, os níveis da apolipoproteína foram significativamente menores no grupo de pacientes, dado que corrobora o papel da inflamação na CRC.

GOLBASI et al. (2002), comparando a concentração sérica de proteína C-reativa de 81 mulheres portadoras de CRC, 31 mulheres portadoras de válvulas prostéticas e 102 controles saudáveis, encontraram valores significativamente maiores nas pacientes portadoras de CRC. A proteína C-reativa (PCR) é um reagente de fase aguda, e o fato dessa proteína se encontrar elevada no grupo de portadoras de CRC pode refletir que a atividade inflamatória é persistente, nesse grupo de pacientes.

A MBL é considerada uma proteína de fase aguda, embora sua concentração tenha um aumento modesto nos processos inflamatórios. Em pós-operatório, situação em que há resposta inflamatória sistêmica, a concentração de MBL circulante aumenta em até 3 vezes, elevação semelhante à encontrada em indivíduos com malária, valores que são modestos quando comparados ao aumento das concentrações de PCR, que podem chegar a 40 vezes o valor normal (THIEL et al., 1992). Em um estudo experimental com ratos, após estímulo peritoneal com lipopolissacarídeo, a

concentração de MBL circulante se elevou em 2 vezes, com pico máximo em 32 horas (LIU et al, 2001). THIEL et al. (1992), estudando pacientes sudaneses portadores de malária, encontrou níveis aumentados da proteína que variavam de 1.5 a 2 vezes do valor normal.

Os valores de MBL encontrados em nossos pacientes portadores de CRC foram de quase 4 vezes o valor normal, o que, além de poder ser em parte reflexo da resposta inflamatória, devem estar relacionados ao polimorfismo do gene MBL nos pacientes com CRC.

Há também evidência de ativação de complemento crônica na CRC. REDDY et al. (1990) encontraram valores elevados de C3d e imunocomplexos circulantes em pacientes portadores de CRC quando comparados a controles saudáveis.

Em nosso estudo, as concentrações de C3 estavam aumentadas nos pacientes com CRC e significativamente elevadas nos pacientes submetidos a cirurgia quando comparados aos pacientes não-operados. Esses achados sugerem a presença de inflamação contínua nos pacientes operados, com provável ativação de complemento devido à presença de estenose mitral mais severa ou válvula artificial. Porém, as concentrações de MBL não diferiram entre os dois últimos grupos. C3 é uma reagente de fase aguda cujos níveis aumentam significativamente em resposta a estímulos infecciosos e inflamatórios, enquanto os níveis de MBL se alteram moderadamente nessas condições (TURNER, 1996). Além disso, não houve correlação entre as concentrações séricas de C3 e as concentrações de MBL, indicando que a elevação da concentração de MBL circulante é um evento independente de C3.

Em um estudo experimental, TAKAHASHI et al. (2002) observaram o padrão de secreção de citocinas em ratos submetidos a sépsis peritoneal induzida. Os autores observaram que os ratos incapazes de expressar o gene MBL mostravam um padrão de secreção menor de citocinas do que os ratos normais, notadamente de TNF- α e IL-6, fato que foi mais evidente em fases tardias da sépsis (após 36 h). Os ratos deficientes de MBL apresentaram uma maior sobrevivência do que os ratos normais para o gene. Por outro lado, SAEVARSDOTTIR et al. (2001) relacionaram a deficiência de MBL a um pior prognóstico na AR, provavelmente pelo fato da mesma atuar inibindo a secreção de TNF- α , molécula central na patogênese da AR. Tais fatos demonstram

que a MBL é uma molécula imunomoduladora, podendo atuar, como expressaram CASANOVA e ABEL (2004), como “amigo, inimigo ou ambos”.

Em nosso estudo, a deficiência de MBL foi mais freqüente nos controles saudáveis do que nos pacientes, sugerindo que a deficiência de MBL pode ser vantajosa contra o desenvolvimento da CRC. Sabe-se que na CRC a secreção de TNF- α e IL-1 por macrófagos é necessária para a agregação e ativação de linfócitos T e B, que chegam à lesão posteriormente aos macrófagos. Deste modo, o efeito benéfico do déficit de MBL poderia se dever a uma secreção menor de citocinas pró-inflamatórias, particularmente do TNF- α , nesta doença.

Por estes achados poderíamos incluir a MBL como marcador da inflamação crônica presente em pacientes com CRC, bem como fator de ativação de complemento e molécula imunomoduladora na complexa patogênese da doença.

7 Conclusões

Através do presente estudo concluímos que:

- As concentrações séricas de MBL são significativamente maiores nos pacientes portadores de CRC quando comparados a controles saudáveis, de idade, sexo, origem étnica e geográfica semelhantes.
- Os valores elevados de MBL não se correlacionaram com a gravidade da doença cardíaca, comprovada através do grau de estenose valvar, aferida por ecocardiograma transtorácico.
- Não houve diferença estatística entre as concentrações circulantes de MBL dos pacientes submetidos à cirurgia quando comparados com os pacientes não-operados, nem com o tipo de procedimento cirúrgico realizado, no sub-grupo operado.
- Concentrações de MBL acima de 1000 ng/ml foram mais prevalentes no grupo de pacientes ($p < 0.03$).
- A deficiência de MBL (< 50 ng/ml) foi mais prevalente no grupo de controles saudáveis (17,1% vs 9%, $p < 0.09$).
- As concentrações séricas de C4 não foram significativamente diferentes entre pacientes e controles saudáveis .
- As concentrações séricas de C3 apresentaram-se elevadas no grupo de pacientes, notadamente no sub-grupo cirúrgico.
- Os valores de C4 e C3 não se correlacionaram com as concentrações de MBL, indicando que o aumento desta deva ser um evento independente.

- As elevadas concentrações de MBL encontradas nos indivíduos com CRC podem corroborar a atividade inflamatória presente nestes indivíduos, contribuindo para lesão valvar através da ativação de complemento.
- A deficiência de MBL, por outro lado, pode representar um fator benéfico contra o desenvolvimento da doença.

Referências

ADDERSON, E. et al. Molecular Analysis of Polyreactive Monoclonal Antibodies from Rheumatic Carditis: Human Anti-N-Acetylglucosamine/Anti-Myosin Antibody V Region Genes. **J Immunol**, v. 161, p. 2020-31, 1998.

ALVES MEIRA, Z. M.; DE CASTILHO, S. R.; LINS BAROS, M. V.; MARIA VITARELLI, A.; DINIZ CAPANEMA, F.; MOREIRA, N. S.; MOREIRA CAMARGO, P. A.; COELHO MOTA, C. C. Prevalence of rheumatic fever in children from a public high school in Belo Horizonte. **Arq Bras Cardiol**, v. 65(4), p. 331-4, out. 1995.

AMES, P. R. J. et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and allied conditions with vascular involvement. **Rheumatology**, v. 38, p. 529-34, 1999.

AMIGO, M., MARTÍNEZ-LAVÍN, M., REYES, P. Acute Rheumatic Fever. **Rheum Dis Clin N Am**. V. 19, p. 333-351, 1993.

ATTAL, H. C., SURYAWANSHI, S. D., MARATHE, S. V. Throat swab cultures and ASO titres in rheumatic fever in adolescents and adults. **Indian Heart J**. v. 32(3):173-6, 1980.

BAIRD, R. et al. Epitopes of group A streptococcal M protein shared with antigens of articular cartilage and synovium. **J Immunol**, v. 146, p. 3132-3137, 1991.

BELLAMY et al. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. **Q J Med**, v. 91, p. 13-18, 1998.

BLAND, E. F.; JONES, T. D. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: a twenty-year report on 1000 patients followed since childhood. **Circulation**, v. 4, p. 836-843, 1951

BRAUNWALD, E. Valvular Heart Disease. In: BRAUNWALD, E. Heart Disease: a Textbook of Medicine. Saunders WB, 1997. p. 1007-18.

CARRAPETIS, R.; CURRIE, B. J.; GOOD, M. F. Towards Understanding the Pathogenesis of Rheumatic Fever. **Scand J Rheumatol**, v. 25, p. 127-31, 1996.

CASANOVA, J. L.; ABEL, L. Human mannose-binding lectin in immunity: friend, foe, or both? **J Exp Med**, v. 199 (10), p. 1295-9, 2004.

CHOPRA, P. et al. Immunohistochemical characterisation os Aschoff nodules and endomyocardial inflammatory infiltrates in left atrial appendages from patients with chronic rheumatic heart disease. **Int J Cardiol**, v. 20 (1), p. 99-105, 1988.

COLLARD, C. et al. Complement activation after oxidative stress. Role of the lectin complement pathway. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1549-56, 2000.

COLMAN, G.; TANNA, A.; EFSTATIOU, A. et al. The serotypes of *Streptococcus pyogenes* present in Britain during 1980-1990 and their association with disease. **J Med Microbiol**, v. 39:165, p. 165-78, 1993.

CROMARTIE, W. J. et al. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cells walls. **J Exp Med**, v. 146, p. 1585-1602, 1977.

CHIU et al. Levels of advanced oxidation protein products (AOPP) and high sensitive C-reactive protein (hs-CRP) in patients with chronic rheumatic valve disease. In: 2º Congresso Internacional de Imunologia, 2003, Peru. **Anais do Congresso**. Lima: Universidade Peruana Ceyetano Heredia, 2003, p. 24.

DAJANI, A. Rheumatic Fever. In: BRAUNWALD, E. Heart Disease: a Textbook of Medicine. Saunders WB, 1997. p. 1769-1775.

DA SILVA, C. H. Rheumatic fever: a multicenter study in the state of São Paulo Pediatric Committee – São Paulo Pediatric Rheumatology Society; **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo**, v. 54 (3), p. 85-90, 1999.

DAVIES, E. J. et al. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 38, p. 110-14, 1995.

DE MESSIAS, I. J. T. Increased frequency of the C4A*6 rare allele in Rheumatic Heart Disease. **Scand J Rheumatol**, v. 4, p. 164-80, 1995.

DOMINIC, L. et al. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunol Rev**, v. 180, p. 86-99, 2001.

DOS REIS, G. A.; BARCINSKI, M. A. Role of macrophage-dependent determinant selection in induction phase of streptococcal carditis. **Lancet**, v. 2, p. 777-9, 1980.

EL-DEMELLAWY, M. et al. Preferential Recognition of Human Myocardial Antigens by T-Lymphocytes from Rheumatic Heart Disease Patients. **Infec Immun**, v. 65, n. 6, p. 2197-2205, 1997.

ENDO, M. et al. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. **Nephrol Dial Transplant**, v. 13 (8), p. 1984-90, 1998.

ENDO, M. et al. Complement activation through the lectin pathway in patients with Henoch-Schönlein purpura nephritis. **Am J Kidney Dis**, v. 35(3), p. 401-719, 2000.

FERRUFINO, C. et al. As moléculas de adesão e a patogênese das doenças reumáticas sistêmicas. **RBAC**, v. 33 (3), p. 149-154, 2001.

FISCHETTI, V. A. **Model of Streptococcal M Protein**. Disponível em: <http://www.rockefeller.edu/vaf/m.htm>> Acesso em 28 setembro 2004.

FOLGER G. M. et al. Occurrence of valvular heart disease in acute rheumatic fever without evident carditis: colour-flow Doppler identification. **Br Heart J**, v. 67, p. 434-38, 1992.

FRASER, W. J. et al. Rheumatic Aschoff nodules revisited. II. Cytokine expression corroborates recently proposed sequential stages. **Histopathology**, v. 31, p. 460-4, 1997.

FROUDE, J. et al. Cross-reactivity between streptococcal and human tissue: a model of molecular mimicry and autoimmunity. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 145, p. 5-26, 1989.

GARRED, P. et al. Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. **Eur J Immunogenet**, v. 19, p. 403-412, 1992.

GARRED. et al. Dual Role of Mannan-Binding Protein In Infection: Another Case of Heterosis. **Eur J Immunogenet**, v. 21 (2), p. 125-131, 1994.

GARRED, P. et al. Mannose-binding lectin polymorphism and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 42, p. 2145-52, 1999 (a).

GARRED, P. et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. **J Clin Invest**, v. 104 (4), p. 431-437, 1999 (b).

GENATLAS: GENE DATABASE. Disponível em: <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?symbol=MBL2> > Acesso em 28 setembro 2004.

GENERAL PATHOLOGY IMAGES FOR INFLAMMATION AND REPAIR.
Rheumatic Carditis. Disponível em: <http://erl.pathology.iupui.edu/C603/GENE428.HTM> > Acesso em 28 setembro 2004.

GIBOFSKY, A. et al. Rheumatic Fever-Associated B cell Alloantigens as identified by Monoclonal Antibodies. **Arthritis Rheum**, v. 28 (9), p. 1047-51, 1985

GIBOFSKY, A.; KERWAR, A; ZABRISKIE, J. Rheumatic Fever: The Relationship Between Host, Microbe and Genetics. **Rheum Dis Clin N Am**, v. 24, p. 237-59, 1998.

GIBOFSKY, A. et al. In: Textbook of Autoimmune Diseases. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p. 679-692.

GIBOFSKY, A; ZABRISKIE, Z. Rheumatic Fever: etiology, diagnosis and treatment. In: KOOPMAN, J. Arthritis and allied conditions. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p. 1761-1773.

GOLBASI, Z. et al. Increased levels of high sensitive C-reactive protein in patients with chronic rheumatic valve disease: evidence of ongoing inflammation. **Eur J Heart Fail**, v. 4 (5), p. 593-5, 2002.

GONÇALVES, H; KISS, M. H. Febre Reumática. São Paulo: BG Cultural, 2001. Série Diagnóstico e Tratamento Atual de Doenças Reumáticas.

GORDIS, L. The virtual disappearance of rheumatic fever in the United States: lessons in the rise and fall of disease. **Circulation**, v. 72, p. 1155-1162, 1985.

GRAUDAL, N. A., Mannose binding lectin in rheumatoid arthritis, a longitudinal study. **J Rheumatol**, v. 25, p. 629-635, 1998.

GRAUDAL, N. A. The association of variant mannose-binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 43: p. 515-21, 2000.

GRIFFITHS, S., WELTON, M., GERSONY, M. D. Acute rheumatic fever in New York City (1969-1988): A comparative study of two decades. **J Pediatr**, v. 116, p. 882-887, 1990.

GUILHERME, L. et al. Association of human leukocyte class II antigens with rheumatic fever or rheumatic heart disease in a Brazilian population. **Circulation**, v. 83, p. 1995-98, 1991.

GUILHERME, L. et al. Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. **Circulation**, v. 92, n. 3, p. 415-20, 1995.

GUILHERME, L. et al. T-cell reactivity against streptococcal antigens in the periphery mirrors reactivity of heart-infiltrating T lymphocytes in rheumatic heart disease patients. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5345-51, 2001.

GUILHERME, L., KALIL, J. Rheumatic fever: the T cell response leading to autoimmune aggression in the heart. **Autoimmun Rev**, v. 1, p. 261-266, 2002.

HANSEN, T. K. et al. Elevated levels of mannan-binding lectin in patients with type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88(10), p. 4857-61, 2003.

ISSELBACHER et al. **Harrison's – Medicina Interna**. 13. ed. México: Nueva Editorial Interamericana S. A., 1994.

IP, W. K. et al. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern chinese. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 8, p. 1679-87, 2000.

Jones Criteria 1992 Update. Guidelines for diagnosis of rheumatic fever. **JAMA**, v. 269, p. 2069-70, 1992

JORDAN, J. E.; MONTALTO, M. C.; STAHL, G. L. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. **Circulation**, v. 104: p. 1413-18, 2003.

KAPLAN, M. H. Rheumatic fever, rheumatic heart disease and the streptococcal connection: the role of streptococcal antigens cross-reactive with heart tissue. **Rev Infect Dis**, v. 1, n. 6, p. 986-8, 1979.

KHANNA, A. K. et al. Presence of a non-HLA B cell antigen in rheumatic fever patients and their families as defined by a monoclonal antibody. **J Clin Invest**, v. 83, p. 1710-16, 1989.

KILPATRICK, D. C. Mannan Binding protein in Sera Positive for Rheumatoid Factor. **Br J Rheumatol**, v. 36, p. 207-9, 1997.

KENNETH, T. Streptococcus pyogenes. Disponível em: <<http://textbookofbacteriology.net/strep.fig2.jpeg&imgrefurl=http://textbookofbacteriology.net/streptococcus.html&h=414&w=597&sz=58&tbnid=AGK6nuTUXHAJ:&tbnh=92&tbnw=132&start=4&prev=/images%3Fq%3Dstructure%2Bstreptococcus%26hl%3Dpt-BR%26lr%3D%26ie%3DUTF-8>> Acesso em 28 setembro 2004.

KOTB, M. et al. Cellular and biochemical responses of human T-lymphocytes stimulated with streptococcal M proteins. **J Immunol**, v. 142, p. 966-70, 1989.

KUMAR, V. et al. NADPH oxidase activity in the monocytes and neutrophils of patients with rheumatic fever. **Cardioscience**, v. 2 (2), p. 93-7, 1991.

KUTUKCLER, N.; NARIN, N. Plasma interleukin-7 (IL-7) and IL-8 concentrations in acute rheumatic fever and chronic rheumatic heart disease. **Scand J Rheumatol**, v. 24 (6), p. 383-5, 1995

LHOTTA, K.; WURZNER, R.; KONIG, P. Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. **Nephrol Dial Transpl**, v. 87(4), p. 374-5, 1999.

LIU, H. et al. Characterization and quantification of mouse mannan-binding lectins (MBL-A and MBL-C) and study of acute-phase responses. **Scand J Immunol**, v. 53(5), p. 489-97, 2001.

LUE, H. C. et al. Rheumatic fever recurrences: controlled study of 3 weeks versus 4 weeks benzathnic penicilin prevention programs. **J Pediatr**, v. 108, p. 199-304, 1986.

MALHOTRA, R. et al. Glycosilation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. **Nature Med**, v. 1 p. 237-43, 1995.

MEDZHITHOY, R., JANEWAY, C. Advances in Immunology: Innate Immunity **N Engl J Med**, v. 343, p.338-344, 2000.

MILLER, L. et al. Cytokines and Immunoglobulins in Rheumatic Heart Disease: Production by Blood and Tonsilar Mononuclear Cells. **J Rheumatol**, v. 16, p. 1436-42, 1989.

MORRIS, K. et al. Increase in activated T cells and reduction in suppressor/cytotoxic T cells in acute rheumatic fever and active rheumatic heart disease: a longitudinal study. **J Infect Dis**, v. 167 (4), p. 979-83, 1993 (a).

MORRIS, K. et al. Enhancement of IL-1 and IL-2 production and IL-2 receptor generation in patients with acute rheumatic fever and active rheumatic heart disease; a prospective study. **Clin Exp Immunol**, v. 91 (3), p. 429-36, 1993 (b).

NARIN, N. et al. Lymphocyte subsets and plasma IL-1 alpha, IL-2 and TNF-alpha concentrations in acute rheumatic fever and chronic rheumatic heart disease. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 77 (2), p. 172-6, 1995.

OHLENSCHLAEGER, T. et al. Mannose-Lectin Variant Alleles and the Risk of Arterious Thrombosis in Systemic Lupus Erythematosus, **N Engl J Med**, v. 351, n. 3, 2004.

PATARROYO, M. E. et al. Association of a B cell alloantigen with susceptibility to rheumatic fever. **Nature**, v. 278, p. 173-77, 1979.

PONGPANICH, B. et al. Immunopathology of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. The demonstration of Coxsackie group B viral antigen in the myocardium. **Clin Rheumatol**, v. 2 (3), p. 217-22, 1983.

PREHM, S. et al. Antibodies against proteins of streptococcal hyaluronate synthase bind to human fibroblasts and are present in patients with rheumatic fever. **J Anat**, v. 187, p. 271-7, 1995.

QUINN, A. et al. Induction of Autoimmune Valvular Heart Disease by Recombinant Streptococcal M Protein. **Infect Immun**, v. 69, n. 6, p. 4072-4078, 2001.

RAIZADA, V. et al. Tissue distribution of lymphocytes in rheumatic heart valves as defined as monoclonal anti-T-cell antibodies. **Am J Med**, v. 74 (90), p. 225-37, 1983.

REDDY, K. S. et al. Immunologic and immunogenetic studies in rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Indian J Pediatr**, v. 57(5), p. 693-700, 1990.

SAEVARSDOTTIR, S. et al. Low mannose-binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study. **J Rheumatol**, v. 28 (4), p. 728-34, 2001.

SATOMURA, A. Significant elevations in serum mannose-binding lectin levels in patients with chronic renal failure. **Nephron**, v. 92 (3), p. 702-4, 2002.

SCHMIDT, K. H. et al. Mitogenicity of M5 protein extracted from *Streptococcus pyogenes* cells is due to streptococcal pyrogenic exotoxin C and mitogenic factor MF. **Infect Immunol**, v. 63, p. 4569-4575, 1995.

STAKISAITIS, D. et al. Blood serum apolipoproteins B and A-I in females suffering from rheumatic heart valve disease. **Medicina (Kaunas)**, v. 40, p. 33-7, 2004.

STOLLERMANN, G. H. Rheumatogenic group A streptococci and the return of rheumatic fever. **Adv Int Med**, v. 35, n. 1, p. 1-25, 1990.

SUMMERFIELD, J. A. et al. Mannose-binding protein gene mutations associated with unusual severe infections in adults. **The Lancet**, v. 345, p. 886-9, 1995.

SUMMERFIELD, J. A. et al. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **BMJ**, v. 314, p. 1229-31, 1997.

SVARTMAN, M. et al. Immunoglobulins and complement components in synovial fluid of patients with acute rheumatic fever. **J Clin Invest**, v. 56 (1), p. 111-7, 1975.

TAKAHASHI, K. et al. Lack of mannose-binding lectin-A enhances survival in a mouse model of acute septic peritonitis. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 773-84, 2002.

TERRERI, M. T.; LEON, C.; HILÁRIO, M. O. E.; GOLDENBERG, J.; FERRAZ, M. B. Utilização de recurso e custos de pacientes com febre reumática. **Rev Bras Reumatol**, v. 42, p. 211-37, 2002.

TERRERI, M. T. et al. Sydenham's chorea--clinical and evolutive characteristics. **Sao Paulo Med**. v. 3;120(1):16-9, 2002.

THIEL, S. et al. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during acute-phase response. **Clin Exp Immunol**, v. 90, p. 31-5, 1992.

TORRES, R. S. L. A. Prevalência de estreptococos do grupo A e outros grupos sorológicos em crianças abaixo de sete anos de idade em creches na cidade de Curitiba, Brasil. Londrina, 2000. Monografia (Especialização em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina.

TURNER, M. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today**, V. 17 (11), P. 532-40, 1996.

TURNER, M. The Role Of Mannose-binding Lectin in Health and Disease. **Mol Immun**, v. 40, p. 423-429, 2003.

VAN DE WETERING, J. K. Collectins. **Mol Immunol** , V. 40 (7), P. 423-9, 2003.

VEASY, L. G. et al. Resurgence of acute rheumatic fever in the intermountain area of the United States. **N Engl J Med**, v. 316, p. 421-27, 1987.

VILARREAL, J. et al. Mannose binding lectin and Fc γ RIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology**, v. 40, p. 1009-12, 2001.

VISENTAINER, J. E. et al. Association of HLA-DR7 with rheumatic fever in the Brazilian population. **J Rheumatol**, v. 27, p. 1518-20, 2000.

WALPORT, M. Complement – First of Two Parts. **N Engl J Med**, v. 344, n. 14, p. 1058-1065, 2001.

WEILL MEDICAL COLLEGE OF CORNELL UNIVERSITY. Rheumatic Heart: Mitral Stenosis. Disponível em: <http://edcenter.med.cornell.edu/Pathology_Images/314.gif> Acesso em: 28 setembro 2004.

WEIS, W. I., DRICKAMER, K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. Disponível em: < <http://www2.bioch.ox.ac.uk/~drick/mannA.htm>> Acesso em: 28 setembro 2004.

WEIS, W. I., DRICKAMER, K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. Disponível em: < <http://www.cermav.cnrs.fr/cgi-bin/lectines/menu2.cgi?1RTM>> Acesso em: 28 setembro 2004.

WERTH, V. P. et al. Mannose binding lectin (MBL) polymorphisms associated with low MBL production in patients with dermatomyositis. **J Invest Dermatol**, v. 119(6), p. 1394-9, 2002.

WILLIAM, A., ALTO, M. D. Acute Rheumatic Fever: an Update. **Am Fam Phys**, v. 45, p. 613-620, 1992.

WILLIAMS, R. Acute Rheumatic Fever. In: KELLEY, W. Textbook of Rheumatology. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p. 1529-40.

YETKIN, E. et al. Levels of circulating adhesion molecules in rheumatic mitral stenosis. **Am J Cardiol**, 2001, v. 88, p. 1209-1124, 2001.

YOSHINAGA, M. et al. Antigens Specificity of lymphocytes isolated from valvular specimens of rheumatic fever patients. **J Autoimmun**, v. 8, p. 601-13, 1995.

ZABRISKIE et al. Rheumatic Fever Associated B-cell Alloantigens as Identified By Monoclonal Antibodies. **Arthritis Rheum**. v. 28 (9), 1047-51, 1985.

ZAHER, S. R.; KASSAM, A. S.; Hughes, J. J. Cocksackie virus infection. In: Rheumatic Fever. **India J Pediatr**, v. 60, p. 289-98, 1993.

ZEDAN, M. et al Interleukin-2 in relation to T cell subpopulations in rheumatic heart disease. **Arch Dis Child**, v. 67, n. 11, p. 1373-5, 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - PLANILHAS DE DADOS DE PACIENTES E CONTROLES

Pacientes

Nº	Idade	Sexo	Raça	EM	Área	C3	C4	MBL (ng/ml)
1	51	2	2	1	2,2	87	19,5	4000
2	61	2	2	3	1,2	61,5	14,5	2000
3	58	2	1	3	0,4	85,2	19,2	1800
4	63	1	1	3	1	71,4	26,5	3600
5	56	2	2	1	1,8	119	19,8	8000
6	38	2	3	2	1,4	98,3	17,2	9600
7	55	1	2	1	2	57,1	13,1	3900
8	36	2	1	1	1,6	93,2	7,6	0
9	24	2	3	1	1,8	87,1	11,1	8000
10	19	2	3	1	2,1	176	43,8	0
11	70	1	2	1	1,9	59,4	16	4500
12	71	2	2	3	0,9	64,5	15,3	4000
13	51	2	1	0	2	162	23,8	2300
14	60	2	2	0	2	82,3	28,7	1650
15	44	2	3	1	1,7	89,5	24,4	780
16	44	2	3	2	1,6	136	24,2	14000
17	39	2	2	1	2,5	74,8	17,2	1100
18	38	2	1	0	2	132	11,9	3700
19	28	2	1	2	1,19	186	41	1900
20	26	1	2	3	0,5	134	15,9	3600
21	43	2	3	1	2,5	97,4	18,2	1200
22	57	2	1	1	2,4	103	20	3000
22	39	2	3	1	1,5	118	28,1	3000
24	33	2	2	2	1,7	116	18,4	1800
25	50	1	2	2	1,4	67,2	14,1	3300
26	59	2	6	2	1,1	86,7	22,4	1100
27	40	2	3	0	2,2	118	26,1	1700
28	50	2	2	2	1,18	126	32,4	1100
29	56	2	4	1	1,52	103	28,6	8000
30	57	1	2	1	1,9	64,6	14,1	400
31	76	2	1	0	2,2	128	22,9	480
32	56	2	2	1	1,8	74,9	23,2	280
33	33	2	1	2	1,32	88,1	23,5	450
34	37	2	3	1	1,7	126	29	0
35	61	2	2	2	1,4	123	29,8	3100
36	36	1	1	1	1,6	100	26	9600
37	60	1	2	0	2	113	17,4	720
38	53	2	2	0	2,18	86,3	19,8	0
39	39	1	2	0	1,9	102	32,6	4100
40	36	2	1	0	2,6	111	21,2	4100
41	56	2	2	0	2,6	76,4	6,82	4000
42	35	2	2	1	2,01	95,5	18	4500
43	51	1	2	0	4,6	139	45,4	8000
44	58	2	1	1	1,5	141	27,8	3000
45	30	2	1	3	0,9	68,9	20,5	7800
46	59	2	3	1	1,8	189	31,6	60
47	37	2	1	2	0,9	101	22,5	500
48	34	1	1	0	1,6	141	26,9	1580
49	44	2	1	1	1,8	81,2	22,7	4500
50	52	2	1	0	2,1	132	21,3	4000
51	56	2	1	0	2,4	136	28,8	0
52	46	1	1	0	2	125	28,7	2600
53	35	2	4	1	1,4	129	29,5	1050
54	34	1	2	0	1,8	116	25,3	4200
55	48	2	1	2	1,1	118	38,4	4200
56	51	2	1	1	1,8	119	18,7	3100

Cirurgia
2
0
0
0
3
0
3
1
0
3
0
1
3
4
3
1
2
1
1
2
0
3
0
0
0
1
3
0
1
3
3
1
0
0
1
0
3
1
4
4
4
2
3
1
1
1
0
4
1
4
3
4
3
1
3
0
1

57	41	2	1	2	1,2	97,3	20,6	2200
58	39	2	4	1	2,4	100	28,3	620
59	42	2	1	0	2,2	109	30,2	4500
60	50	2	1	1	1,6	133	21,9	1300
61	66	1	1	1	1,7	198	34,1	4500
62	35	1	1	1	2	87,9	24,1	3100
63	59	2	1	1	2,08	123	27,5	0
64	42	2	1	2	1,5	125	35,3	2100
65	38	2	2	2	1,8	94,5	11,8	3200
66	37	1	1	2	1,98	182	26,8	3200
67	47	1	3	1	2,2	101	26,1	9600
68	43	2	2	2	3,6	69,5	14,4	0
69	33	2	2	2	1,4	50,3	19,9	2000
70	69	2	2	2	2,1	73	12,7	200
71	42	2	2	1	2,4	106	14,1	9600
72	57	2	4	1	1,8	102	13,6	700
73	45	2	2	1	3	128	20,1	14000
74	32	2	1	1	2,3	113	22,7	1800
75	38	2	4	2	1,4	104	23,8	8000
76	38	2	1	1	1,6	143	23,4	1500
77	46	2	1	1	2,8	123	20	920
78	30	2	1	1	1,9	82,3	17,1	1200
79	44	2	1	2	1,1	101	13,9	920
80	57	1	1	1	2,2	176	27,5	2100
81	47	1	1	2	1,2			200
82	54	2	2	1	1,8			3600
85	41	2	1	1	1,7			700
86	45	2	1	1	2,5			200
87	43	1	1	2	1,19			350
88	30	2	3	2	1,5			3500
89	58	2	1	3	0,8			950
92	54	1	1	1	2,9			7000
93	40	2	1	2	1,3			3700
94	32	2	1	1	2			320
95	38	2	1	2	1,33			
96	51	2	1	1	1,5			1800
98	58	2	1	1	2,2			3500
100	38	2	1	1	2,1			0
101	63	2	1	2	1,4			0
102	25	2	2	1	2,2			650
103	56	2	1	1	2,2			5200
104	40	1	1	1	2,5			2500
105	40	1	1	1	3,6			5200
106	31	2	1	2	1,4			5000

3
3
4
3
0
3
1
3
2
0
3
2
1
0
1
1
1
0
1
0
3
0
2
0
3
1
2
0
3
2
2
1
2
2
0
0
0
0
2
3
1
2
1

Controles

Número	Idade	Sexo	Etnia	MBL
1	50	1	3	1100
2	42	2	1	280
3	34	2	1	3500
4	19	2	1	500
5	29	1	1	3500
6	52	1	3	3600
7	70	1	1	1400
8	51	1	1	480
9	54	1	4	4500
10	26	1	2	250
11	20	1	1	550
12	75	1	3	350
13	41	1	3	4500
14	33	1	1	0
15	37	1	1	3100
16	29	1	2	4000
17	45	2	2	3500
18	31	1	2	2000
19	51	1	2	800
20	78	2	2	400
21	25	2	2	3500
22	41	2	2	4200
23	37	2	2	780
24	49	2	3	4500
25	27	2	3	350
26	61	2	1	640
27	41	2	1	0
28	63	2	2	600
29	57	2	3	2050
30	57	2	6	2100
31	45	2	3	0
32	52	2	3	0
33	49	2	1	1100
34	50	2	2	980
37	55	2	1	0
38	48	2	3	2100
39	50	2	1	400
40	51	2	1	2600
41	64	2	1	1700
42	68	2	1	2500
43	26	2	1	1700
44	60	2	1	370
45	56	2	3	450
46	40	2	1	650
47	56	2	3	1500
48	39	2	2	1400
49	28	2	2	370
50	49	2	1	2800
51	40	2	2	1800
52	37	2	1	2500
53	31	2	1	1200
54	52	2	1	3200
55	51	2	2	400
56	36	2	2	0
57	41	2	4	450
58	38	2	4	600

59	59	2	2	2500
60	52	2	2	1800
61	38	2	5	200
62	59	2	2	700
63	52	2	2	400
64	38	2	2	70
65	30	2	2	1900
66	54	2	1	2600
67	35	1	1	0
68	54	2	2	5000
69	37	1	1	0
70	46	2	1	6000
71	30	2	1	3000
72	47	1	1	5800
73	42	1	1	6200
74	59	1	2	1600
75	42	2	2	1600
76	45	2	2	0
77	58	2	1	0
78	51	2	1	0
79	33	1	2	5000
80	32	2	1	6200
81	43	1	2	4600
82	30	2	3	4600
83	33	1	2	5000
84	69	2	2	6200
85	57	2	1	2800
86	38	1	3	0
87	51	2	1	0
88	33	1	2	0
89	32	2	1	2100
90	41	2	1	250
91	42	1	1	4800
92	32	2	1	2200
93	54	2	2	1700
94	41	2	1	4800
95	42	1	1	3800
96	58	2	1	4100
97	51	2	1	4800
98	30	2	3	0
99	42	1	1	0
100	45	2	2	0
101	32	2	1	2200

Sexo	
M	1
F	2
Estenose Mitrál (EM)	
Normal	0
Leve	1
Moderada	2
Severa	3
Cirurgia	
Nenhuma	0
Comissurotomia	1
Valvuloplastia	2
Troca valvar biológica	3
Troca valvar metálica	4
Raça	
Branco-brasileiro	1
Branco-europeu	2
Mulato	3
Negro	4
Oriental	5
Índio	6

Branços foram considerados caucasianos

ANEXOS

**ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
EM SERES HUMANOS DO HC/UFPR**



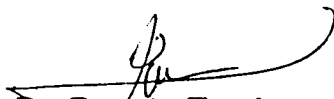
Curitiba, 28 de junho de 2.002.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dr. Marcelo Derbli Schafranski
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA EM PACIENTES PORTADORES DE VALVULOPATIA MITRAL REUMÁTICA", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 25 de junho de 2.002, o referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96 , 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.
Protocolo CEP-HC Nº 491.073/2002-06

Atenciosamente,



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você é portador de Valvulopatia Mitral e está sendo convidado a participar de um estudo intitulado: “Avaliação da Atividade Inflamatória em pacientes portadores de Estenose Mitral Reumática”, e sua participação é de fundamental importância.
- b) O objetivo desta pesquisa é estudar a resposta inflamatória em pacientes portadores de estenose mitral reumática.
- c) Caso você participe da pesquisa, será necessário responder questionários sobre a sua doença e doar uma amostra de 10 ml de sangue, para estudo.
- d) Você poderá experimentar algum desconforto, principalmente relacionados com a coleta de sangue
- e) O médico-residente, Dr. Marcelo Derbli Schafranski, celular: 9982 8827, que poderá ser contatado de manhã e de tarde, de segunda à sexta, é o responsável pelo estudo e fará o acompanhamento através de visitas ambulatoriais, conforme consta no padrão Ético e Vigente no Brasil.
- f) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de seu atendimento, que está assegurado.
- g) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.
- h) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos, etc...) não são da responsabilidade do paciente.
- i) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no próprio H.C.
- j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- k) Durante o estudo, não há restrição quanto ao uso de medicamentos.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo e os tratamentos alternativos. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi o que não posso fazer durante o tratamento e sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Data: ___/___/___.

Investigador: _____.

Assinatura: _____.

Assinatura do Responsável (se necessário): _____.

ANEXO 3 - COMUNICAÇÃO DE APROVAÇÃO DO ARTIGO PARA
PUBLICAÇÃO EM REVISTA INTERNACIONAL E PROVA
(*PROOF*) DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Iara Messias Reason

De: <s.tobin@immunology.org>
Para: <iarareason@hc.ufpr.br>; <patrick_iara@onda.com.br>
Cc: <cate@immunology.org>
Enviada em: quarta-feira, 15 de setembro de 2004 11:37
Assunto: CEI-2004-0485.R2 accepted

Dear Dr. Iara Messias-Reason

RE: Significantly Increased Levels of Mannose-Binding Lectin (MBL) in Rheumatic Heart Disease: A Protective Role of MBL Deficiency

Authors: 1) Iara Messias-Reason 2) Marcelo Schafranski 3) Renato Nisihara 4) Arnaldo Stier
Manuscript ID: CEI-2004-0485.R2

Thank you for submitting the above-mentioned manuscript to 'Clinical and Experimental Immunology'. I am pleased to say, on behalf of Prof. David Oliveira, that this paper has now been accepted for publication.

The proofs will follow from the publishers: the corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author and, in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs as they should be dealt with promptly and accurately. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from the website. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Please return payment of the publication charge as instructed below. You should include a copy of the invoice, your full postal address if not already present and state the invoice number (Inv no. 2645) when paying the charge. Please also indicate whether you wish your year's subscription to be for the current or the forthcoming year.

~~~~~  
Clinical and Experimental Immunology

INVOICE NO.: 2645

15/09/04



## Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role of MBL deficiency

M. D. SCHAFRANSKI\*, A. STIER†, R. NISHIHARA\* & I. J. T. MESSIAS-REASON\* \*Laboratory of Immunopathology, Department of Clinical Pathology and †Cardiology Clinic, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

(Accepted for publication 15 September 2004)

### SUMMARY

Although mannose-binding lectin (MBL) is known to be involved in the primary defense against microorganisms, there are emerging evidences of an active proinflammatory role for MBL in different chronic diseases. In this study we determined the circulating levels of MBL in patients with rheumatic heart disease (RHD). A total of 100 patients (77 women, 23 men; mean age  $45.8 \pm 11$  years, range 19–76 years) with chronic RHD and a previous diagnosis of rheumatic fever, were studied. Transthoracic echocardiography was performed in all patients to evaluate valvular heart disease. Ninety-nine healthy individuals matched for age, sex and ethnic origin were included as controls. MBL concentration was measured by enzyme-linked immunosorbent assay and C3 and C4 levels by turbidimetry. MBL levels were significantly higher in patients with RHD than in healthy subjects (mean  $\pm$  SEM:  $3036.2 \pm 298.9$  ng/ml versus  $1942.6 \pm 185.5$  ng/ml,  $P < 0.003$ ). In addition, MBL deficiency was more prevalent in controls (17.1%) than in patients (9%  $P < 0.09$ ). Concentrations of C4 were within the normal range ( $22.7 \pm 0.8$  mg/dl, normal: 10.0–40.0 mg/dl), while C3 concentrations were found to be elevated ( $109.2 \pm 3.6$  mg/dl, normal: 50.0–90.0 mg/dl). No correlation was observed between serum MBL levels and valve area or the type of surgical procedure. The significantly elevated circulating MBL levels in patients with RHD together with the greater prevalence of MBL deficiency in controls suggest that MBL may cause undesirable complement activation contributing to the pathogenesis of RHD.

**Keywords** mannose-binding lectin rheumatic heart disease complement rheumatic fever

### INTRODUCTION

Rheumatic fever (RF) is the most common cause of acquired valvular disease in children and young adults worldwide. Although the incidence of RF has decreased over the last few decades in developed countries, the disease continues to be a serious health problem in developing countries, including Brazil. Mitral stenosis, the classical cardiac manifestation of chronic rheumatic heart disease (RHD), is a late complication of RF which takes at least 2 years to develop after the initial outbreak of RF. Generally, a period of 10–20 years is necessary after an initial episode of carditis for the clinical manifestations of rheumatic mitral stenosis to become evident [1].

The pathogenic mechanisms responsible for the development of RF/RHD are associated to an abnormal host immune response (both at humoral and cellular level) to crossreactive streptococcal antigens. In fact, RF/RHD is considered to be a streptococcal-induced autoimmune disease, due to antigenic mimicry between

streptococcal antigens and relevant host antigens that occurs in genetically susceptible individuals [2]. Although extensively studied, the pathogenesis of the disease is not yet fully understood.

Mannose-binding lectin (MBL) is a calcium dependent lectin shown to play an important role in the first line of host defense against microorganisms. MBL binds to different sugars such as mannose, fucose, glucose and N-acetyl-D-glucosamine present on the surface of bacteria, fungi, protozoa and viruses. Binding of MBL to microbial surface, promotes C1- and antibody-independent activation of complement by the lectin pathway [3]. In addition, MBL mediates the opsonization and phagocytosis of microorganisms through interaction with collectin receptors present on phagocytic cells [4]. The concentration of MBL in plasma is determined genetically, primarily by the genetic polymorphism of the first exon of the structural gene and promoter region. Normal serum levels of MBL range from 800 to 1000 ng/ml in healthy Caucasians, however, wide variations can occur due to point mutations in codons 52, 54 and 57 of exon 1 and/or in the promoter region of the MBL gene [3]. The exon 1 mutations are referred to as D, B and C variants, respectively, in contrast to the wild type A. Heterozygous individuals for these mutations have a substantial decrease in MBL serum concentration, whereas MBL

Correspondence: Iara de Messias Reason, R. Padre Camargo 280, 80-069-900 Curitiba - PR Brazil.  
E-mail: iarareason@hc.ufpr.br

is undetectable in the serum of homozygous individuals. MBL deficiency is considered to be the most common immunodeficiency, with B mutation occurring in 26% of Caucasian populations [5]. While it is well known that MBL deficiency is associated with increased susceptibility to infection during infancy [6] and adulthood [7], evidence of an active proinflammatory role for MBL in different chronic diseases is emerging. Recent studies have demonstrated that MBL can bind to the endothelium causing excessive complement activation and subsequent tissue damage [8]. On the other hand, MBL deficiency may be advantageous in some circumstances since MBL may lead to an increased cytokine secretion by macrophages [9]. It has also been shown that MBL is associated to disease severity in both infectious and autoimmune disease [10,11]. There is no data available on the role of MBL in RHD. In the present study we present evidence that significantly elevated levels of MBL may contribute to the pathogenesis of chronic RHD.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients and controls

One-hundred patients with chronic RHD being accompanied by the Cardiology Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas of the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil (23 men and 77 women, mean age of  $45.8 \pm 11$  years, range 19–76 years) were studied (Table 1). All subjects had a clinical history compatible with RF and an echocardiogram confirming mitral valve involvement. Twenty-eight of the patients were not submitted to any surgical valve procedure whereas 72 underwent the following surgical intervention: 8 exchanged for a metal valve; 24 exchanged for a biological valve; 14 had balloon valvuloplasty and 26 underwent commissurotomy. Eighty-two patients were of Caucasian origin, 12 were *Mullatos* and one was an Indian. Patients with active RF, infection, history of neoplasias, infective endocarditis or other inflammatory diseases were excluded from the study.

Ninety-nine healthy volunteers that matched with the patients for age, sex, ethnic and geographical origin were selected as

controls. Both patients and controls signed a free informed consent form, and the study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas of the Federal University of Paraná.

### Serum samples

Venous blood (10 ml) was collected from each patient and control and allowed to clot. Serum was collected after centrifugation, separated and aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

### MBL, C3 and C4 assays

Serum MBL levels were determined by ELISA using commercial kits (Statens Serum Institute, Denmark). MBL levels above 1.0 mg/ml were considered to be normal and individuals with values below 50.0 ng/ml were considered to be deficient. C3 and C4 levels were measured in 80 patients by immunoturbidimetry (Dade Behring, Germany), C3 levels between 50.0 and 90.0 mg/dl and C4 levels between 10.0 and 40.0 mg/dl were considered as normal.

### Statistical analysis

Data are given as mean  $\pm$  SEM. Statistical differences between groups were determined by the two-tailed Student *t*-test, Pearson and Spearman correlation were used to estimate the strength of association between variables. The chi-square test with Yates correction was used to determine differences between observed and expected values. All statistical analysis was performed using Statistica for Windows version 99 software. Differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Serum MBL levels

The distribution of circulating MBL concentration among patients and controls is presented in Fig. 1. MBL levels were significantly higher in patients than in controls (mean  $\pm$  SEM  $3036.2 \pm 298.9$  versus  $1942.6 \pm 185.5$  ng/ml;  $P < 0.003$  Fig. 2). MBL was undetectable in 9/100 (9.0%) patients and in 17/99 (17.1%)

**Table 1.** Demographic, clinical characteristics and MBL, C3 and C4 levels in patients with chronic rheumatic heart disease submitted or not to surgery

|                                    | Not submitted to surgery<br>( <i>n</i> = 28) | Submitted to surgery<br>( <i>n</i> = 72) | <i>P</i> -value |
|------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------|
| Age (years)*                       | $45.5 \pm 10$                                | $45.9 \pm 12$                            |                 |
| Sex                                |                                              |                                          |                 |
| Female                             | 20                                           | 57                                       |                 |
| Male                               | 8                                            | 15                                       |                 |
| Ethnic origin                      |                                              |                                          |                 |
| Caucasian                          | 21                                           | 61                                       |                 |
| Mulatto                            | 6                                            | 6                                        |                 |
| Negro                              | 1                                            | 4                                        |                 |
| Indian                             | 0                                            | 0                                        |                 |
| Oriental                           | 0                                            | 1                                        |                 |
| Mean valve area (cm <sup>2</sup> ) | $1.59 \pm 0.5$                               | $1.93 \pm 0.6$                           | 0.012           |
| MBL (ng/ml)*                       | $3269.3 \pm 298.0$                           | $2944.2 \pm 185.5$                       | 0.66            |
| C3 (mg/dl)*                        | $97.4 \pm 4.2$ ( <i>n</i> = 22)              | $113.6 \pm 4.5$ ( <i>n</i> = 58)         | 0.044           |
| C4 (mg/dl)*                        | $20.7 \pm 0.8$ ( <i>n</i> = 22)              | $23.5 \pm 1.0$ ( <i>n</i> = 58)          | 0.16            |

\*values given as mean  $\pm$  SEM

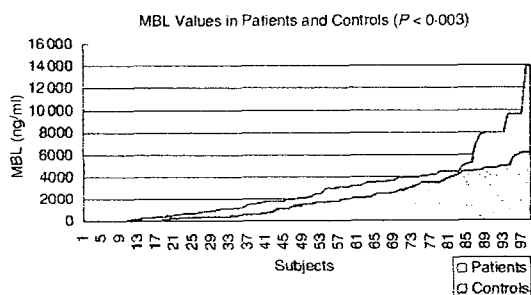


Fig. 1. Distribution of mannose-binding lectin (MBL) levels among patients with rheumatic heart disease (RHD) (□) and healthy controls (■)

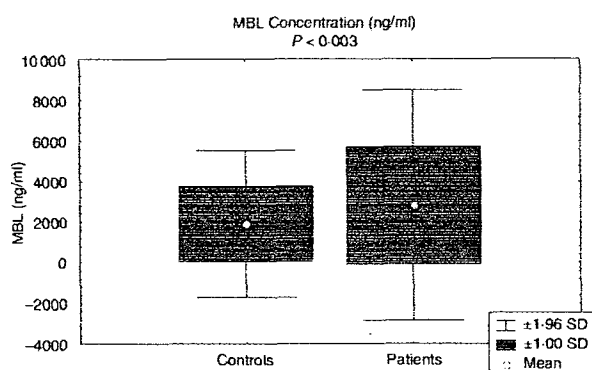


Fig. 2. Circulating levels of mannose-binding lectin (MBL) in patients with rheumatic heart disease and healthy controls

controls ( $P < 0.09$  Fig. 1). Circulating MBL concentrations higher than 1000 ng/ml were observed in 71.0% of the patients and 55.5% of the controls ( $P < 0.035$ , Fig. 3). No significant difference in MBL levels was observed between the patients who did or did not undergo valve surgery (mean  $\pm$  SEM 2944.2  $\pm$  185.5 versus 3269.3  $\pm$  298.0 ng/ml;  $P < 0.66$ , Table 1) or between female and male patients either in the patient or control group ( $P = ns$ ). There was no correlation between valve area and age ( $r = -0.16$ ;  $P < 0.41$ ) or between valve area and MBL levels in the nonoperated patient group ( $r = 0.23$ ;  $P < 0.31$ ).

Regarding the type of surgery, no significant difference was observed in MBL levels between patients submitted to commissurotomy or balloon valvuloplasty (mean  $\pm$  SEM 3321.5  $\pm$  529.4 ng/ml,  $n = 38$ ) and patients submitted to valve exchange (mean  $\pm$  SEM 2451.4  $\pm$  380.0 ng/ml,  $n = 34$ ;  $P < 0.29$ ).

#### Serum C3 and C4 levels

Serum C3 levels were above the normal range in RHD patients with a mean of 109.2  $\pm$  3.6 SEM mg/dl ( $n = 80$ ) and significantly higher in operated ( $n = 58$ ) than in nonoperated patients ( $n = 22$ ) (mean  $\pm$  SEM, 113.6  $\pm$  4.5 versus 97.4  $\pm$  4.2 mg/dl;  $P < 0.04$  Table 1). C4 concentrations in the RHD patients were within the normal range (mean  $\pm$  SEM 22.7  $\pm$  0.8 mg/dl). No significant differences in C4 levels was observed between the operated and the nonoperated patients (mean  $\pm$  SEM 23.5  $\pm$  1.0 versus 20.7  $\pm$  0.85 mg/dl;  $P < 0.16$  Table 1). A positive correlation was observed between C3 and C4 levels ( $r = 0.27$ ;  $P < 0.01$ ), but not between C3 and MBL levels ( $r = -0.17$ ;  $P < 0.23$ ) or between C4 and MBL levels ( $r = -0.008$ ;  $P < 0.16$ ).

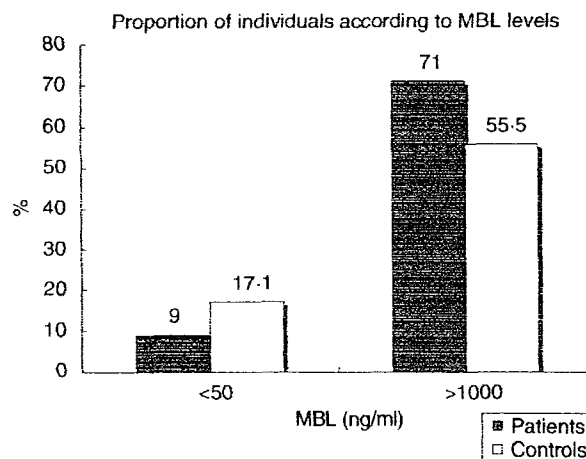


Fig. 3. Proportion of individuals with circulating levels of mannose-binding lectin (MBL) lower than 50 ng/ml and higher than 1000 ng/ml. ■ Patients; □ Control.  $<50$  ng/ml ( $P < 0.09$ )  $>1000$  ng/ml ( $P < 0.035$ )

## DISCUSSION

Whereas MBL deficiency has been associated with different infectious and auto-immune diseases, including rheumatic disorders, high MBL levels associated to disease has only been recently reported [12]. Low levels of the protein have been related to a poor prognosis in rheumatoid arthritis perhaps due to the modulatory action that MBL exerts on the secretion of tumour necrosis factor  $\alpha$ , a central molecule in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [13]. Low MBL levels have also been associated with adult dermatomyositis and are probably related to a reduced clearance of apoptotic keratinocytes [14]. Genotypes related to a lower production of MBL have also been linked to the development of systemic lupus erythematosus [15,16] and increased susceptibility to infection in this disease [11].

In the present study, serum MBL levels were found to be significantly elevated in RHD, but were not correlated with the severity of heart disease as determined by a transthoracic echocardiogram. In addition, a significantly larger number of individuals with MBL levels above 1000 ng/ml were observed in the patient group. On the other hand, MBL deficiency was more prevalent among healthy controls. These results suggest that MBL deficiency may represent an advantage against the development of rheumatic mitral stenosis and that increased MBL levels may be related to the development of the disease. Although the MBL genotype cannot be predicted with precision based on serum concentration, it is known that individuals homozygous for the A allele (A/A) typically show MBL levels above 1500 ng/ml, levels 6–8 times higher than those observed for heterozygous individuals (A/O, where O can be B, C or D) and that the O/O combination is related to undetectable MBL [2].

In this study, C3 levels were increased in the patients with RHD and significantly higher in the operated patients when compared to the nonoperated patients. These findings suggest the presence of ongoing inflammation in these patients with probable complement activation due to the presence of more severe mitral stenosis or of an artificial valve. However, MBL levels did not differ between the latter two groups. C3 is an acute-phase protein whose levels significantly increase in response to infections or to an inflammatory reaction, while MBL levels only show a

moderate increase in these circumstances [3]. In addition, there was no correlation between C3 and MBL levels, indicating that elevated MBL concentration might be an independent event.

Involvement of complement system in RF/RHD has been shown in different studies [17–19]. Antibodies found in the serum of patients with RF that show molecular mimicry between streptococcal and human antigens were able to cause human fibroblasts lyses *in vitro* in the presence of complement [20]. Serum levels of C3d and immune complexes were shown to be increased in both the patients with acute RF and chronic RHD when compared to normal controls [18]. Also, complement deposition in heart tissue was observed in autopsy samples of patients with RHD [20]. In addition, the high frequency of the rare C4A\*6 allele in patients with RHD, suggests an immunogenetic role for complement in the disease [19]. The most severe sequela of acute RF is chronic RHD. In adults mitral stenosis almost always results from post-rheumatic inflammation and degenerative disease [1]. Evidence of a continuous inflammatory reaction in chronic RHD has been demonstrated by several authors. Increased serum levels of adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) [21], apolipoprotein B [22], high sensitivity C-reactive protein [23] and advanced oxidation protein products (unpublished data) have been observed in patients with chronic RHD when compared to normal controls.

Elevated serum levels of MBL have been implicated in the pathogenesis of renal manifestations of Henoch-Schönlein purpura [24], in IgA nephropathy [25], in other forms of human glomerulonephritis [26], and in vascular complications of diabetes mellitus type I [12]. Although MBL is an acute-phase protein produced by the liver [27], its levels only show a moderate increase in inflammatory diseases and are determined genetically. The elevated MBL levels observed in patients with chronic RHD might corroborate the chronic inflammatory activity present in these individuals and contribute to valve injury through complement activation. In addition, MBL may act as an immunomodulatory molecule, inducing a higher secretion of cytokines by macrophages [3].

Under normal conditions, MBL does not bind to the organism's own tissues, but in situations of cellular hypoxia, glycosylation of cell surfaces may occur, leading to the deposition of MBL, followed by complement activation [28]. In an experimental study, the blockade of MBL, with monoclonal antibodies reduced neutrophil infiltration and the amplitude of the inflammatory response in myocardial tissue reperfused after a period of hypoxia [8]. The significantly elevated levels of MBL observed in chronic RHD suggest that MBL may represent a pathogenic factor in the complex physiopathology of the disease, whereas MBL deficient individuals might be less susceptible to develop chronic RHD.

## REFERENCES

- Feldman T. Rheumatic mitral stenosis. *Postgrad Med* 1993; **93**:99–104.
- Gibofsky A, Kerwar S, Zabriskie JB. Rheumatic fever. The relationships between host, microbe, and genetics. *Rheum Dis Clin North Am* 1998; **24**:237–59.
- Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003; **40**:423–9.
- van de Wetering JK, van Golde LM, Batenburg JJ. Collectins. *Mol Immunol* 2003; **40**:423–9.
- Steffensen R, Thiel S, Varming K, Jersild C, Jensenius JC. Detection of gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *J Immunol Meth* 2000; **241**:33–42.
- Summerfield JA, Sumiya M, Levin M, Turner MW. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *Br Med J* 1997; **314**:1229–31.
- Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, Thursz M, Gorchein A, Monteil MA, Turner MW. Mannose-binding protein gene mutations associated with unusual severe infections in adults. *Lancet* 1995; **345**:886–9.
- Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation* 2003; **104**:1413–8.
- Takahashi K, Gordon J, Liu H *et al*. Lack of mannose-binding lectin-A enhances survival in a mouse model of acute septic peritonitis. *Microbes Infection* 2002; **4**:773–84.
- Garred P, Madsen HO, Baslev U, Folmann B, Pedersen C, Gerstoff J, Svejgaard A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose binding lectin. *Lancet* 1997; **349**:236–40.
- Garred P, Madsen HO, Halberg P, Petersen J, Kronborg G, Svejgaard A, Andersen V, Jacobsen S. Mannose-binding lectin polymorphism and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; **42**:2145–52.
- Hansen TK, Thiel S, Knudsen ST, Gravholt CH, Christiansen JS, Mogensen CE, Poulsen PL. Elevated levels of mannan-binding lectin in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**:4857–61.
- Graudal NA, Madsen HO, Tarp U, Svejgaard A, Jurik G, Graudal HK, Garred P. The association of variant mannose-binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; **43**:515–21.
- Werth VP, Berlin JA, Callen JP, Mick R, Sullivan KE. Mannose binding lectin (MBL) polymorphisms associated with low MBL production in patients with dermatomyositis. *J Invest Dermatol* 2002; **119**:1594–9.
- Villarreal J, Crosdale D, Ollier W *et al*. Mannose binding lectin and FeγRIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology* 2001; **40**:1009–12.
- Davies EJ, Snowden N, Hillarby MC, Carthy D, Grennan DM, Thomson W, Ollier WE. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995; **38**:110–4.
- van de Rijn J, Füllit H, Brandeis WE, Reid H, Poon-King T, McCarthy M, Day NK, Zabriskie JB. Serial studies on circulating immune complexes in post-streptococcal sequelae. *Clin Exp Immunol* 1978; **34**:518–25.
- Reddy KS, Narula J, Bhatia R *et al*. Immunologic and immunogenetic studies in rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Indian J Pediatr* 1990; **57**:693–700.
- de Messias IJT, Cavalcanti E, Radominski S. Increased frequency of the C4A\*6 rare allele in Rheumatic Heart Disease. *Scand J Rheumatol* 1995; **4**:164–80.
- Prehm S, Herrington C, Nickel V, Volker W, Briko NI, Blinnikova, Schmiedel A, Prehm P. Antibodies against proteins of streptococcal hyaluronate synthase bind to human fibroblasts and are present in patients with rheumatic fever. *J Anat* 1995; **187**:271–7.
- Yetkin E, Erbay AR, Ilci M, Turhan H, Balci M, Cehreli S, Yetkin G, Demirkan D. Levels of circulating adhesion molecules in rheumatic mitral stenosis. *Am J Cardiol* 2001; **88**:1209–124.
- Stakisaitis D, Maksyutis A, Salcius K, Benetis R. Blood serum apolipoproteins B and A-I in females suffering from rheumatic heart valve disease. *Medicina (Kaunas)* 2004; **40**:33–7.
- Golbasi Z, Ucar O, Keles T, Sahin A, Cagli K, Camsari A, Diker E, Aydogdu S. Increased levels of high sensitive C-reactive protein in patients with chronic rheumatic valve disease: evidence of ongoing inflammation. *Eur J Heart Fail* 2002; **4**:593–5.
- Endo M, Ohi H, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M. Complement activation through the lectin pathway in patients with Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Am J Kidney Dis* 2000; **35**:401–719.

- 25 Endo M, Ohi H, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M, Fujita T. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1998; **13**:1984–90.
- 26 Lhotta K, Wurzner R, König P. Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transpl* 1999; **87**:374–5.
- 27 Giabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; **340**:448–54.
- 28 Collard CD, Vakeva A, Morrissey MA *et al*. Complement activation after oxidative stress: role of the lectin complement pathway. *Am J Pathol* 2000; **156**:1549–56.