

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA**

**MILTON HENRIQUES GUIMARÃES JÚNIOR**

**ESTUDO DAS MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE  
CÉLULAS NA ENDOCARDITE INFECCIOSA**

**BELO HORIZONTE**

**2017**

**MILTON HENRIQUES GUIMARÃES JÚNIOR**

**ESTUDO DAS MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE  
CÉLULAS NA ENDOCARDITE INFECCIOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes

Coorientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

**BELO HORIZONTE**

**2017**

Guimarães Junior, Milton Henrique.  
G963e Estudo das micropartículas derivadas de células de Endocardite  
Infecciosa [manuscrito]. / Milton Henrique Guimarães Junior. - - Belo  
Horizonte: 2017.  
1122f.  
Orientador (a): Maria do Carmo Pereira Nunes.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Medicina.

1. Endocardite. 2. Micropartículas Derivadas de Células. 3.  
Vesículas Extracelulares. 4. Biomarcadores. 5. Dissertações  
Acadêmicas. I. Nunes, Maria do Carmo Pereira. II. Universidade  
Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM: WG 285

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO MILTON HENRIQUES GUIMARÃES JÚNIOR

Realizou-se, no dia 11 de agosto de 2017, às 14:00 horas, sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 323ª defesa de dissertação, intitulada "Estudo das micropartículas derivadas de células de endocardite infecciosa", apresentada por MILTON HENRIQUES GUIMARÃES JÚNIOR, número de registro 2016658619, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Maria do Carmo Pereira Nunes - Orientadora (UFMG), Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari - Coorientadora (UFMG), Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (UFMG), Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

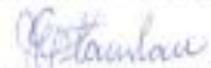
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 11 de agosto de 2017.

  
Profa. Maria do Carmo Pereira Nunes

  
Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

  
Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

  
Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **REITOR**

Prof. Jaime Arturo Ramírez

### **VICE REITORA**

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

### **PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira

### **PRÓ REITOR DE PESQUISA**

Prof. Ado Jório de Vasconcelos

### **FACULDADE DE MEDICINA**

**DIRETOR:** Prof. Tarcizo Afonso Nunes

**VICE-DIRETOR:** Prof. Humberto José Alves

### **CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**COORDENADOR:** Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

**SUBCOORDENADORA:** Prof. Selmo Geber

### **COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:**

#### **INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Eduardo Antonio Ferraz Coelho (Coordenador)

Antônio Luiz Pinho Ribeiro (Subcoordenador)

Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Vandack Alencar Nobre Junior

Denise Utsch Gonçalves

Unai Tupinambás

Beatriz Cristina Silveira Salles (Representante discente)

## **DEDICATÓRIA**

*Às minhas orientadoras, Carminha e Teresa.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo amor que dá sentido à vida.

Aos meus pais, por proporcionaram meu crescimento em ambiente de afeto e valores.

À UFMG e aos Hospital das Clínicas da UFMG, onde com muito orgulho tive minha formação, fiz amigos e conheci os “mestres”. Por me possibilitarem um mundo de oportunidades bem maior que o imaginado.

À minha linda noiva Mariana, sossego e carinho em meio à loucura.

À Profa. Maria do Carmo Pereira Nunes, exemplo de que com competência e dedicação você pode ser tornar referência mundial, mesmo tendo origens simples e trabalhando em locais com recursos limitados.

À Profa. Teresa, referência de técnica e ética, assim como exemplo de comprometimento com o que se faz. Mente brilhante. Obrigado pelo convite e incentivo à pós-graduação.

Á minha irmã Jaqueline, a quem vim assistir, ainda adolescente, uma tal “tese de mestrado”. Exemplo domiciliar de como se cortar raízes e criar asas.

Ao Instituto René Rachou, em especial à doutora Andréa pelo trabalho na obtenção e análise dos resultados, assim como contribuições no decorrer do estudo. À Lorena, pelo auxílio com os experimentos.

À Izabella, pelas contribuições prévias ao grupo. Aos alunos de iniciação científica, Rodrigo, Dayane e Nicole, pela ajuda em diferentes pontos dessa caminhada.

Aos eternos preceptores, referências profissionais e amigos, Graziela Chequer, Marco Paulo, Luiz Guilherme e Diego.

Aos pacientes - exemplos de força em momentos de adversidade - por mostrarem o que realmente importa em meio ao oceano de preocupações cotidianas.

## EPÍGRAFE

“ – *Que gigantes? – Interrogou Sancho.*

– *Aqueles que além vêm de braços desmesurados. Alguns medem quase duas léguas de comprimento...*

– *Atente bem, Vossa Mercê. O que se descortina além fora não são gigantes, mas moinhos de vento. E o que parecem braços não são senão as velas que, sopradas pela aragem, fazem gira-los.”*

**Dom Quixote de la Mancha**

Miguel de Cervantes

## RESUMO

### Estudo das micropartículas derivadas de células na endocardite infecciosa

**INTRODUÇÃO:** Endocardite infecciosa (EI) é uma doença grave com elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Os fatores preditores de evolução da EI são determinados por complexos processos, como interação patógeno-hospedeiro, estabelecimento de um padrão da resposta imune e inflamatória, assim como ativação celular. Recentemente, crescente número de trabalhos científicos demonstraram a participação das micropartículas derivadas de células (MPs) nesses processos. Entretanto, não existem estudos que avaliaram as MPs na EI, tanto ao diagnóstico quanto durante o tratamento, e sua relação com desfechos clínicos. O presente estudo foi desenhado para avaliar os níveis séricos das MPs derivadas de leucócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos T, células endoteliais, eritrócitos e plaquetas em pacientes com EI. O perfil das MPs foi analisado durante o tratamento para se determinar o impacto desses novos marcadores nos desfechos clínicos, definidos como necessidade de cirurgia precoce e morte intrahospitalar, desenvolvimento de insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (AVC). Além disso, a concentração das MPs na EI foi comparada com outras infecções bacterianas.

**MÉTODOS:** Entre agosto 2011 e janeiro 2017, 57 pacientes com EI provável ou definitiva, segundo os critérios de Duke modificados, internados no Hospital das Clínicas da UFMG foram incluídos. Os pacientes foram acompanhados durante a internação com coleta dos dados clínicos, laboratoriais e ecocardiográficos. Amostras plasmáticas foram obtidas em três tempos: à admissão hospitalar (T0), após duas semanas de tratamento (T1) e ao final do tratamento (T2). Os pacientes com EI foram comparados a um grupo controle composto por 22 pacientes com outras infecções bacterianas, caracterizadas por febre e elevação da proteína C reativa (PCR). MPs foram dosadas pela citometria de fluxo, utilizando-se a anexina como um marcador universal e anticorpos marcados direcionados a antígenos celulares específicos CD45 (leucócitos), CD66b (neutrófilos), CD14 (monócitos), CD41a (plaquetas), CD51 (células endoteliais) e CD235a (eritrócitos). Os pacientes foram tratados conforme recomendações dos *guidelines* e a indicação cirúrgica foi baseada em critérios bem estabelecidos pela literatura.

**RESULTADOS:** A mediana da idade dos pacientes foi de 50 anos, com 33 pacientes do sexo masculino (58%). A condição predisponente mais frequente foi cardiopatia reumática, detectada em 30% dos casos. Os microrganismos mais prevalentes foram *staphylococcus* (37%), seguido dos *streptococcus* (12%). Em 17 pacientes (30%), a hemocultura foi negativa. MPs de plaquetas

(pltMPs), leucócitos (leucMPs), neutrófilos (neutMPs) e linfócitos T (linfMPs) foram significativamente elevadas nos pacientes com EI, em comparação aos pacientes com outras infecções bacterianas, apesar de idade, sexo, global de leucócitos e proteína C reativa comparáveis. Avaliando-se o comportamento das MPs com o tratamento, observou-se que os valores de MPs apresentaram um padrão relativamente estável ao longo do tempo, com exceção de um aumento significativo de leucMPs e neutMPs entre T0 e T1. Durante internação hospitalar, 17 pacientes evoluíram para o óbito (30%), 25 necessitam cirurgia cardíaca (44%), 29 desenvolveram insuficiência cardíaca (51%) e 9 tiveram AVC (16%). Em relação aos desfechos, leucMPs, neutMPs, linfMPs e MPs de monócitos (monoMPs), medidas à admissão, foram significativamente elevadas nos pacientes com EI que morreram durante a hospitalização, em comparação aos pacientes sobreviventes. Não houve diferença nos níveis das MPs, comparando-se os pacientes que necessitaram de cirurgia cardíaca com o tratamento clínico, ou entre aqueles que desenvolveram insuficiência cardíaca ou não, e aqueles que tiveram ou não AVC. Em uma análise multivariada, os níveis de neutMPs permaneceram como um fator independente associado à mortalidade (OR 2,2 para cada aumento de 100 contagens/ $\mu$ L, intervalo de confiança de 95% de 1,2 a 4;  $p=0,009$ )

**CONCLUSÕES:** As concentrações plasmáticas das MPs de leucócitos, neutrófilos, linfócitos T e plaquetas foram significativamente elevadas nos pacientes com EI, quando comparados a outras infecções bacterianas. Exceto pela elevação significativa das MPs derivadas dos neutrófilos, os níveis das MPs apresentaram um padrão relativamente estável ao longo dos três tempos avaliados. MPs derivadas dos leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos, e linfócitos, estavam elevadas nos pacientes que faleceram durante a internação. As MPs apresentam um valor potencial na EI, auxiliando no diagnóstico diferencial com outras infecções bacterianas e útil na identificação dos pacientes com maior risco de óbito.

**Palavras chave:** endocardite infecciosa, micropartículas derivadas de células, vesículas extracelulares, marcadores inflamatórios.

## ABSTRACT

### Study of cell-derived microparticles in infective endocarditis

**INTRODUCTION:** Infectious endocarditis (IE) is a serious disease, with high rates of morbidity and mortality. IE evolution are determined by complex processes, such as pathogen-host interaction, establishment of a pattern of immune and inflammatory response, as well as cellular activation. Recently, a growing number of scientific studies have demonstrated the participation of cell-derived microparticles (MPs) in these processes. However, to date, there are no studies evaluating MPs in IE, both at diagnosis and during treatment, and its relation to clinical outcomes. The present study was designed to evaluate the serum levels of MPs derived from leukocytes, neutrophils, monocytes, T lymphocytes, endothelial cells, erythrocytes and platelets in patients with IE. The profile of MPs was analyzed during treatment to determine the impact of these new markers on clinical outcomes, defined as the need for early surgery and in-hospital death, the development of heart failure and stroke. In addition, the concentration of MPs in IE was compared with other bacterial infections.

**METHODS:** Between August 2011 and January 2017, 57 patients with probable or definite IE according to the modified Duke criteria hospitalized at the Hospital das Clínicas of UFMG were included. The patients were followed up during the hospitalization with clinical, laboratory and echocardiographic data collection. Plasma samples were obtained at three times: at hospital admission (T0), after two weeks of treatment (T1) and at the end of treatment (T2). Patients with IE were compared to a control group composed of 22 patients with other bacterial infections, characterized by fever and elevated C-reactive protein (CRP). MPs were measured by flow cytometry, using annexin as a universal marker and labeled antibodies directed to specific cell antigens: CD45 (leukocytes), CD66b (neutrophils), CD14 (monocytes), CD41a (platelets), CD51 (endothelial cells) and CD235a (erythrocytes). The patients were treated according to the recommendations of the guidelines and the surgical indication was based on criteria well established in the literature.

**RESULTS:** The median age of the patients was 50 years, with 33 male patients (58%). The most frequent predisposing condition was rheumatic heart disease, detected in 30% of the cases. The most prevalent microorganisms were staphylococcus (37%), followed by streptococcus (12%). In 17 patients (30%), blood culture was negative. Platelet MPs (pltMPs), leukocytes (leukMPs),

neutrophils (neutMPs), and T lymphocytes (lympMPs) were significantly elevated in patients with IE compared to patients with other bacterial infections despite age, sex, global leukocyte and protein C reactive. By evaluating the MPs kinetics during the treatment, we observed that the MPs values had a relatively stable pattern over time, except for a significant increase of leukMPS and neutMPs between T0 and T1. During hospital stay, 17 patients died (30%), 25 needed heart surgery (44%), 29 had heart failure (51%) and 9 had a stroke (16%). Regarding the outcomes, leukMPs, neutMPs, lymphMPs and MPs of monocytes (monoMPs), measured at admission, were significantly elevated in patients with IE who died during hospitalization compared to patients who survived. There was no difference in MP levels, comparing patients who required cardiac surgery with the ones on clinical treatment, or those who developed heart failure or not, or that complicated or not with stroke. In a multivariate analysis, neutMPs levels remained an independent factor associated with mortality (OR 2.2 for each increase of 100 counts/ $\mu$ L, 95% confidence interval 1.2 to 4,  $p = 0.009$ )

**CONCLUSIONS:** Plasma concentrations of MPs of leukocytes, neutrophils, T lymphocytes and platelets were significantly elevated in patients with IE when compared to other bacterial infections. Except for the significant elevation of MPs derived from neutrophils, MP levels presented a relatively stable pattern throughout the three evaluated times. MPs derived from leukocytes, including neutrophils, monocytes, and lymphocytes, were elevated in patients who died during hospitalization. The MPs present a potential value in IE, aiding in the differential diagnosis with other bacterial infections and useful in the identification of patients with higher risk of death.

**Keywords:** infectious endocarditis, cell-derived microparticles, extracellular vesicles, inflammatory biomarkers.

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Classificação dos casos de endocardite infecciosa quanto ao local de aquisição.....	23
Quadro 2: Classificação dos casos de endocardite infecciosa em definitivos, possíveis ou rejeitados, de acordo com os critérios de Duke modificados.....	32
Quadro 3: Definições dos critérios maiores e menores utilizados nos critérios de Duke modificados.....	33
Quadro 4: Biomarcadores estudados na endocardite infecciosa.....	39
Quadro 5: Funções atribuídas as micropartículas e os marcadores utilizados.....	62

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Comparação do número absoluto de micropartículas, de acordo com tipo celular, encontrado no grupo de controle saudável em diferentes estudos.....	54
Tabela 2: Comparação do número absoluto de micropartículas, de acordo com o tipo celular, encontrado em sepse grave e outras patologias, em diferentes estudos.....	63

## **ARTIGO**

Table 1: Baseline characteristics of the study population.....	96
Table 2: Demographical and laboratorial features of the patients with IE compared with the patients with other bacterial infections .....	97

## **ARTIGO**

### **LISTA DE FIGURAS:**

Figure 1: MVs levels from different phenotypes, at T0 (admission), T1 (two weeks of treatment) and T2 (end of treatment) in IE patients.....	98
--	----

Figure 2: Comparison between levels of microvesicles (MVs) at T0 (admission), in infective endocarditis patients who survival (white bars) or died (grey bars) during hospitalization.....99

Figure 3A: Radar graphics showing MVs levels according to the cell origin at different times (T0, T1, T2) in survivals and non-survival patients .....100

Figure 3B: Kinetics of circulating microvesicles (MVs) from endocarditis patients, according to non-fatal and fatal cases at different times (T0, T1, T2). T0 = admission; T1 = 2 weeks of treatment; T2 = end of treatment.....101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC.....	Área sobre a curva ROC
AVC.....	Acidente vascular cerebral
BNP.....	Peptídeo natriurético cerebral
CEPs .....	Células endoteliais progenitoras
CD.....	do inglês, cluster of differentiation
CTAD.....	do inglês, Citrate-Theophyllin-Adenosine-Dipyridamole
Da.....	Dalton
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
DPOC.....	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EI.....	Endocardite Infecciosa
ELISA.....	do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ETNB.....	Endocardite Trombótica não Bacteriana
EDTA.....	do inglês, Ethylenediamine tetraacetic acid
GBD.....	do inglês, Global Burden of diseases Injuries, and Risk Factors
HC/UFGM.....	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
ICAM-1 .....	do inglês, Intercellular Adhesion Molecule 1
IL.....	Interleucina
LBP .....	Proteína ligadora de lipopolissacarídeo
LES.....	Lúpus eritematoso sistêmico
MiRNA.....	Micro RNA

MPs..... Micropartículas

MVs.....Microvesículas

MHC..... do inglês, Major Histocompatibility Complex

MRSA..... do inglês, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

MeSH.....do inglês, Medical Subject Headings

NF-Kb..... Fator nuclear kappa beta

PCR..... Proteína C Reativa

RNA..... ácido ribonucléico

RNA<sub>m</sub>..... RNA mensageiro

RM.....Ressonância magnética

TC.....Tomografia computadorizada

TCLE..... Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF-beta1.....do inglês, transforming growth factor-beta1

TNF- $\alpha$  ..... do inglês, tumor necrosis factor alpha

TnI..... Troponina I

TnT..... Troponina T

VCAM-1.....do inglês, vascular cell adhesion molecule 1

VHS.....Velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	19
2 INTRODUÇÃO.....	21
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1 ENDOCARDITE INFECCIOSA.....	23
3.1.1 Definição e contextualização.....	23
3.1.2 Epidemiologia.....	23
3.1.3 Classificação.....	24
3.1.4 Etiologia .....	25
3.1.5 Patogênese.....	27
3.1.6 Quadro clínico .....	30
3.1.7 Condições predisponentes .....	31
3.1.8 Diagnóstico.....	32
3.1.9 Complicações e mortalidade.....	36
3.1.10 Tratamento.....	37
3.2 BIOMARCADORES NA ENDOCARDITE INFECCIOSA .....	39
3.2.1 Importância e biomarcadores estudados .....	39
3.2.2 Procalcitonina e Proteína C Reativa (PCR) .....	41
3.2.3 BNP, NT-proBNP e troponina.....	41
3.2.4 Cistatina C .....	43
3.2.5 Proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP) .....	43
3.2.6 Proteínas ligadoras de cálcio S100A11 .....	44
3.2.7 Moléculas de adesão.....	44
3.2.8 Citocinas.....	45
3.3 MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE CÉLULAS.....	47
3.3.1 Conceitos .....	47
3.3.2 Origens, caracterização e biodistribuição.....	48
3.3.4 Papel das micropartículas na coagulação e trombose .....	50
3.3.5 Papel das micropartículas na reprogramação e comunicação intercelular .....	52
3.3.6 Papel das micropartículas na reposta imune .....	53
3.3.7 Quantificação das micropartículas em indivíduos saudáveis e em condições mórbidas .....	54
3.3.8 Micropartículas na endocardite infecciosa .....	56
3.3.9 O estudo das micropartículas na sepse .....	57
3.3.10 Micropartículas na cirurgia cardíaca .....	64
3.4 MÉTODOS APLICADOS NO ESTUDO DAS MICROPARTÍCULAS.....	67
3.4.1 Citometria de fluxo e fatores analíticos .....	67
3.4.2 Fatores pré-analíticos.....	69
4 OBJETIVOS .....	74

Objetivo geral .....	74
Objetivos específicos.....	74
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	75
5.1 Participantes .....	75
5.2 Recrutamento .....	75
5.3 Critérios de inclusão e exclusão .....	75
5.3.1 Pacientes com endocardite infecciosa .....	76
5.3.2 Grupo controle.....	76
5.4 Cálculo amostral.....	77
5.5 Obtenção e processamento das amostras .....	77
5.6 Identificação das micropartículas por citometria de fluxo .....	78
5.6.1 Obtenção das micropartículas.....	78
5.6.2 Análise das micropartículas por citometria de fluxo .....	79
5.6.3 Quantificação das micropartículas.....	80
5.7 Valores de referência.....	80
5.8 Análise estatística.....	80
5.9 Aspectos éticos .....	81
5.10 Pesquisa e normatização bibliográfica .....	81
6 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	82
6.1 Artigo Científico .....	82
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	103
8 CONCLUSÕES .....	104
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
10 APÊNDICES .....	111
11 ANEXOS .....	119

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A endocardite infecciosa (EI) segue como uma doença desafiadora. Trata-se de patologia com apresentação clínica diversa, diagnóstico por vezes difícil, alta letalidade, e de tratamento complexo. Como se trata de afecção não comum, o número variado e esporádico de casos dificulta seu estudo sistematizado. Portanto, esforços empregados no estudo da EI são valiosos.

O estudo da EI iniciou-se no Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG) em 2005, pelas professoras Teresa Cristina de Abreu Ferrari e Maria do Carmo Pereira Nunes, com a criação de um Grupo de Pesquisa em Endocardite Infecciosa do HC/UFMG. Desde então, todos os pacientes internados no hospital, após concordância, são acompanhados e incluídos em um protocolo de estudo.

Tal iniciativa levou à obtenção de um rico banco de dados, com a inclusão de 203 pacientes com EI ao longo de 12 anos. A partir do estudo desses casos, foi publicado trabalho que descreveu o perfil clínico e epidemiológico da EI no HC/UFMG (1), assim como relatos de casos com abordagem terapêutica complexa, agente etiológico não comum ou associados a práticas atuais, como uso de *piercing* (2-5).

Além desses trabalhos, o grupo também buscou estudar biomarcadores relacionados aos mecanismos patogênicos da EI. Assim, desde 2010, os pacientes incluídos no projeto têm amostras de sangue coletadas. Tais amostras foram utilizadas em investigações do grupo, de 2014 (6) e 2015 (7), que avaliaram o perfil das interleucinas na EI e sua associação com desfechos clínicos. O presente trabalho é uma continuidade desse estudo de biomarcadores na EI.

O grupo de Pesquisas em EI conta com reuniões semanais, onde são discutidos os casos internados, dúvidas no preenchimento dos protocolos, e elaboração das produções científicas. Desde 2012, o grupo tem parceria com o laboratório Diagnóstico e Monitoramento do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ). Em 2016, o Grupo de Pesquisa em Endocardite Infecciosa do HC/UFMG passou a integrar o Registro Europeu de Endocardite Infecciosa, que constitui um esforço internacional para o estudo da EI (EURO-ENDO).

Meu ingresso no grupo ocorreu em janeiro 2014. Desde então, tive como contribuições: (1) auxiliar no recrutamento dos casos; (2) abordagem dos pacientes sobre possível inclusão no estudo; (3) solicitação e programação da coleta das amostras; (4) acompanhamento dos casos; (5) preenchimento de protocolos e auxílio aos estudantes de iniciação científica nesse processo; (6)

organização do catálogo das amostras. Na etapa final, acompanhei a realização e análise de alguns experimentos no laboratório do René Rachou, assim como participei da organização do banco de dados e análise dos resultados.

Logo, esse trabalho se insere no o grupo de pesquisas em EI, existente há mais de 10 anos no HC/UFGM: fruto da iniciativa das Profas. Teresa Cristina e Maria do Carmo, e desenvolvido pelo esforço conjunto dessas, somados aos de pós-graduandos, alunos, colaboradores e de parcerias externas.

## 2 INTRODUÇÃO

Endocardite Infecciosa é definida como infecção de uma valva cardíaca nativa ou protética, da superfície endocárdica ou de um dispositivo cardíaco (8). Trata-se de doença com apresentação clínica diversa com sinais e sintomas pouco específicos, o que faz com que o diagnóstico muitas vezes ocorra de maneira tardia, em alguns casos até mais de um mês após início dos sintomas.

Sem tratamento, a EI é usualmente uma doença letal. Mesmo com o tratamento, a taxa de mortalidade em um ano chega a 30% – um prognóstico pior do que muitos tipos de neoplasias (1, 8). A isso, soma-se uma alta morbidade, determinada pela necessidade de cirurgia cardíaca em 53% dos pacientes, ocorrência de acidente vascular cerebral em 19% dos doentes, além de um tratamento que exige internação hospitalar prolongada – em média, 39 dias (1).

Diversos processos celulares estão envolvidos na fisiopatologia da EI. O endotélio saudável é resistente aos frequentes episódios de bacteremia que ocorrem nas atividades cotidianas (9). Nos indivíduos com EI, há falha nesse processo. De forma sucinta, dano endotelial leva à formação de trombo estéril, que posteriormente sofre processo de adesão e multiplicação pelo microrganismo infectante. Esse denso agregado, formado por plaquetas, fibrina, microrganismos e leucócitos constitui a apresentação cardinal da EI – a vegetação (10). Logo, a elaboração da resposta imune e inflamatória (e toda a comunicação intercelular complexa que rege esses processos), coagulação, ativação celular e dano tecidual vão determinar a apresentação clínica da EI e influenciar seus desfechos. Nas últimas décadas, estudos demonstraram a participação das micropartículas liberadas por células em cada um desses processos.

Micropartículas (MPs) são vesículas micrométricas (diâmetro de 0,1 a 1 micrômetro) liberadas da membrana de células que sofreram ativação, injúria ou apoptose (11). MPs são liberadas por praticamente todas as células eucarióticas, sendo também demonstrados em procariotas (12-14). Essas partículas foram durante algumas décadas consideradas um subproduto celular sem atividade biológica – uma “poeira celular”. Porém, pesquisas recentes ressaltaram o seu papel como efetoras em múltiplos processos celulares, dentre eles: comunicação intercelular, inflamação, imunidade, apoptose celular, coagulação sanguínea, metástases e angiogênese.

Investigações demonstraram liberação de MPs em indivíduos saudáveis (15), assim como sua participação em várias doenças que envolvem ativação e/ou dano endotelial. Na sepse, MPs foram associadas a disfunção microvascular e orgânica (16, 17) e distúrbios da coagulação (18).

Em pacientes com câncer, MPs foram relacionadas a eventos tromboembólicos venosos (19). Na doença arterial coronariana, seus níveis foram aumentados em pacientes com síndrome coronariana aguda, quando comparados à doença coronariana estável (20). Na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), MPs derivadas de endotélio foram relacionadas ao grau de lesão pulmonar e exacerbação da doença (21). MPs também foram estudadas como biomarcadores no diabetes mellitus (22) e relacionadas à complicações vasculares da gravidez (23).

Logo, é de se esperar que as MPs tenham participação nos processos patogênicos centrais da EI. Porém, realizando-se busca abrangente nas bases MEDLINE e LILACS, em 5 de maio de 2017, não foram encontrados trabalhos nos quais se avaliou o perfil sérico das MPs nos pacientes com EI. Dessa maneira, o estudo das MPs na EI, seu uso como biomarcadores e sua possível relação com desfechos clínicos não são descritos.

O presente trabalho se presta ao esforço de tentar preencher essa lacuna no conhecimento. Partimos das seguintes perguntas:

1. Qual o perfil sérico das MPs nos pacientes com EI, tendo como base a identificação de MPs liberadas por leucócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos T, células endoteliais, eritrócitos, e plaquetas?
2. Qual o perfil dessas MPs no decorrer do tratamento?
3. Há correlação entre os níveis de MPs liberadas por essas células e desfechos clínicos?
4. O perfil das MPs liberadas em pacientes com EI é diferente daquele encontrado em outras infecções bacterianas ?

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ENDOCARDITE INFECCIOSA

##### 3.1.1 Definição e contextualização

Endocardite Infecciosa é definida como infecção de uma valva cardíaca nativa ou protética, da superfície endocárdica ou de um dispositivo cardíaco (8). A doença teve sua primeira descrição sistemática feita por *Sir* William Osler, em 1885 (24).

A prevalência dos agentes etiológicos, a epidemiologia, os fatores predisponentes e as características dos pacientes mudaram nas últimas décadas. Os pacientes agora são mais velhos e têm mais comorbidades. A idade média de acometimento, que era de 45 anos na década de 80, passou para mais de 70 anos na década atual. A mudança das características epidemiológicas da EI está relacionada ao aumento das infecções associadas ao cuidado da saúde e ao uso cada vez mais comum de dispositivos cardíacos como marcapassos, desfibriladores cardíacos implantáveis e ressincronizadores cardíacos (8).

Os pacientes com EI podem apresentar um amplo espectro de complicações cardíacas, neurológicas, reumatológicas e infecciosas. Logo, a abordagem da EI necessita de equipe altamente especializada, composta por profissionais de diversas áreas: cardiologistas, cirurgiões cardíacos, infectologistas, fisioterapeutas, entre outros. Essa demanda multiprofissional, juntamente de uma estrutura que possibilite cirurgia cardíaca, é um desafio - em especial para os países em desenvolvimento.

Estudos comprovaram que uma abordagem do paciente com EI por uma equipe especializada tem impacto nos desfechos. Estudo francês (25) demonstrou que abordagem sistematizada da EI levou a redução da mortalidade em um ano de 18,5% para 8,2%.

##### 3.1.2 Epidemiologia

Em revisão sistemática feita pelo estudo GBD (Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors) (26) nos anos de 1990 e 2010, a incidência global da EI variou de 1,5 a 11,6 casos a cada 100.000 pessoas. Tais estimativas foram provenientes de 10 países, predominantemente industrializados. Essa incidência aumenta com a idade, chegando a 14,5 episódios a cada 100.000

pessoas/ano numa população em 70-80 anos (27). Em relação ao sexo, a doença acomete mais homens - 68% dos casos (28).

Avaliando um possível aumento no número de casos, Duval et al (29) analisaram a incidência anual de EI, de forma prospectiva, com base em população de 11 milhões habitantes acima de 20 anos, na França, nos anos de 1991, 1999 e 2008 (este último ano, após mudanças que tornaram mais restritas as indicações de profilaxia da EI). A incidência se manteve estável, respectivamente 3,5; 3,3 e 3,2 casos a cada 100.000 habitantes. Nesse estudo, foi evidenciada uma mudança na prevalência dos agentes etiológicos ao longo dos anos. Observou-se aumento da proporção da EI causada por *Staphylococcus*: 20%, 27%, e 36% dos casos, respectivamente em 1991, 1999 e 2008. A proporção de EI causada por *Streptococcus* orais se manteve estável (23, 18 e 20%, respectivamente). Também houve aumento da proporção de EI relacionada a dispositivos cardíacos – 3,1%, 6,3% e 15% dos casos, respectivamente.

### 3.1.3 Classificação

EI não é uma doença única, existindo vários tipos, com diferentes apresentações clínicas e prognósticos. A definição de EI de acordo com tempo de apresentação clínica está em desuso, por colaborar pouco na abordagem do paciente. Classificação moderna engloba a descrição da válvula acometida, se nativa ou protética, se envolve dispositivo cardíaco implantável (marcapasso, ressinronizador e/ou desfibrilador) e o local de aquisição (27).

Com relação ao local de aquisição, a EI pode ser classificada conforme mostrado no quadro abaixo:

Quadro 1:

<b>Classificação dos casos de endocardite infecciosa quanto ao local de aquisição</b>	
<b>Adquirida na comunidade</b>	Diagnosticada à admissão ou em até 48h, em um paciente que não preenche critérios para EI associada aos cuidados à saúde.
<b>Associada aos cuidados à saúde</b>	EI diagnosticada , em até 48h da admissão, em paciente que requer cuidados de saúde, definidos por: (1) recebimento de terapia endovenosa, cuidados com ferida ou cuidados especializados de enfermagem em nível domiciliar até 30 dias antes do início dos sintomas, (2) foram submetidos a hemodiálise ou quimioterapia em até 30 dias antes do início dos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Não nosocomial</b></li> </ul>	

sintomas (3) estiveram hospitalizados por mais de dois dias nos últimos 90 dias.

- **Nosocomial** Definida como aquela que se desenvolveu em paciente que esteve internado por mais de 48h antes do início dos sinais e sintomas consistentes com EI

---

Fonte: Murdoch et al Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis–Prospective Cohort Study. Archives of internal medicine. 2009;169(5):463-73.

Em estudo com quase três mil pacientes (28), EI adquirida na comunidade correspondeu a 71,5% dos casos, seguida pela EI nosocomial (13,7%) e EI relacionada aos cuidados à saúde não nosocomial (9,3%). A América do Norte demonstrou a mais alta taxa de EI relacionada aos cuidados com saúde (38%), sendo esse número próximo dos 20% na América do Sul (28).

A EI pode ser adicionalmente classificada como a que ocorre em usuários de drogas intravenosas. O agente etiológico também contribui na classificação de cada caso. Por exemplo, EI de valva mitral nativa, adquirida na comunidade, causada por *S. aureus*.

### 3.1.4 Etiologia

*Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp são os principais agentes etiológicos, sendo a predominância de um ou outro relacionada ao tipo de válvula acometida (nativa ou protética), fonte da infecção, comorbidades e idade do paciente. *Staphylococcus* superaram o *Streptococcus* como principal agente etiológico nos países desenvolvidos, acompanhando o aumento das EI relacionadas ao cuidado com a saúde (29-32).

Murdoch et al (28) analisaram o perfil clínico e etiológico de 2.756 pacientes com EI. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do grupo viridans foram os agentes mais isolados - respondendo por 31% e 17% dos casos, respectivamente. Foram seguidos pelos *Staphylococcus* coagulase negativos, isolados em 11% dos casos. Aqui vale um adendo. *Streptococcus* do grupo viridans (do latim, *viridis*, que significa verde) têm esse nome derivado da descoloração característica provocada na placa de ágar. Inclui espécies que são comensais orais, do trato gastrointestinal e urogenital, a saber: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*. Nesse grupo não estão

inclusos os *Streptococcus* do grupo D (*Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus bovis*) que são conhecidos por sua associação de EI com tumor colônico.

No estudo de Murdoch et al (28) observou-se uma diferença regional no perfil etiológico da EI, sendo que apenas na América do Sul os *Streptococcus* do grupo viridans são mais prevalentes que o *Staphylococcus aureus* (26% vs 17%). Estudo brasileiro de Siciliano et al (33) incluiu 221 pacientes com EI adquirida na comunidade. O agente causador foi identificado em 76% dos casos, sendo os mais comuns: *Streptococcus* do grupo viridans (47%), *Streptococcus bovis* (10%), *Staphylococcus aureus* (8,2%), *Enterococcus fecalis* (7,6%).

Revisão de Vogkou et al (34) analisou a etiologia de 33.214 casos, em 105 estudos de 36 países, no período de 2003 a 2013. *Staphylococcus aureus* foi o agente etiológico mais comum em 57% dos estudos, seguido pelo *Streptococcus* do grupo viridans, que foi o agente etiológico mais isolado em 21,9% dos estudos. Incluindo os resultados estratificados por continente, os microrganismos mais isolados, em ordem de frequência, considerando-se 452 pacientes da América do Sul foram: *S. aureus*, *Enterococcus* spp. *Staphylococcus* coagulase negativo e grupo HACEK (*Haemophilus* spp, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*).

Essa revisão (34) também avaliou o agente etiológico em populações especiais. Nos 994 pacientes com prótese valvar, *Staphylococcus* coagulase negativo foi o agente mais comum, seguido do *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* do grupo viridans e do *Enterococcus* spp. Nos 505 com dispositivos cardíacos implantáveis, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo foram isolados em igual frequência.

Os casos de EI nos quais o microrganismo causador não é identificado após cultura de amostra sanguínea, do tecido valvar (nos casos de pacientes submetidos a cirurgia cardíaca), ou de eletrodo de um dispositivo cardíaco infectado (no caso de marcapassos, desfibriladores e/ou resincronizadores), usando os métodos de laboratório usuais, são classificados como EI com cultura negativa. Eles representam uma proporção muito variável do total dos casos de EI, variando de 2,5% a 60% (35, 36). Em revisão já citada (34), com 33 mil casos, essa porcentagem foi de 26%. Essa variabilidade é explicada por vários fatores: prevalência de microrganismos de crescimento lento ou que requerem meio de cultura especializado, uso de antibiótico antes da coleta da hemocultura, diferenças no processamentos das amostras, e prevalência da endocardite de etiologia não infecciosa (35).

Fournier et al (35) estudaram 759 casos de EI com cultura negativa. Aplicando uma estratégia diagnóstica que contou com técnicas sorológicas, moleculares e histopatológicas avançadas, o agente causador foi identificado em 62,7% dos casos, e uma etiologia não infecciosa em 2,5%. Entre os agentes identificados, chamou a atenção a elevada prevalência de infecção por microorganismos intracelulares: *Coxiella burnetii* (causadora da febre Q) e bactérias do gênero *Bartonella*, identificados respectivamente em 57% e 19,2% dos casos. Outras bactérias de crescimento fastidioso também foram identificadas: *Tropheryma whipplei* (4%), *Legionella* spp (0,4%) e *Mycobacterium* spp (0,4%). Fungos foram identificados em 1,7% dos casos.

No estudo brasileiro de Siciliano et al (33), EI com cultura negativa foi responsável por 23% dos casos. Esses casos foram submetidos a pesquisa de *Bartonella* spp e *Coxiella burnetii* por meio de imunofluorescência, sorologia, técnicas moleculares e histopatológicas. Dos 51 casos de EI com cultura negativa, a prevalência de *Bartonella* spp foi de 19,6% e *C. burnetii* 7,8%.

### 3.1.5 Patogênese

O endotélio cardíaco saudável é naturalmente resistente aos frequentes episódios de bacteremia que ocorrem em atividades cotidianas. Isso foi demonstrado em trabalho de Lockhart et al (9) que randomizou 290 pacientes para (1) escovação dentária, (2) extração dentária com profilaxia com amoxicilina, (3) extração dentária sem uso de profilaxia (placebo). Hemoculturas foram coletadas antes, durante e após o procedimento, totalizando seis amostras. Foram identificadas 32 espécies de bactérias sabidamente causadoras de EI, sendo as mais frequentes do gênero *Streptococcus* (49%). A incidência cumulativa de bacteremia por bactérias relacionadas a EI em qualquer uma das seis amostras foi de 23%, 33% e 60%, respectivamente, nos grupos 1, 2 e 3 ( $p < 0,0001$ ). Apesar da diminuição significativa da ocorrência de bacteremia no grupo de extração dentária que usou amoxicilina, a ocorrência frequente de bacteremia em atividades diárias corriqueiras, como a escovação dentária, faz com que esta tenha uma maior carga de risco cumulativa. Tal fato levanta questionamento sobre o benefício do uso de antibioticoprofilaxia em situações isoladas. A pequena incidência de endocardite, apesar da ocorrência frequente de bacteremia em atividades cotidianas, também demonstra como o endotélio intacto é resistente a infecção.

Na patogênese da EI, o modelo tradicional postula que a infecção resulta da formação de um trombo estéril (em local de endotélio valvar danificado) e sua posterior colonização por microrganismos circulantes.

Deposição espontânea de agregados ricos em plaquetas e fibrina ocorre em áreas de endotélio lesado ou inflamado, levando à formação da chamada endocardite trombótica não bacteriana (ETNB). Esse dano ao endotélio pode resultar de: (1) fluxos turbulentos, gerados por lesões valvares; (2) inflamação crônica, como nos casos de doença cardíaca reumática ou nas lesões valvares degenerativas; (3) injeção repetida de partículas sólidas (como ocorre nos usuários de droga intravenosas) (4) provocadas por eletrodos e cateteres; (5) atividade bacteriana direta (particularmente para *S. aureus*). (10, 37)

A ETNB é encontrada em 1,3% de indivíduos em estudos de necropsia (38). De maneira característica, se localiza na face atrial das válvulas mitral ou tricúspide, ou nas superfícies ventriculares das válvulas aórtica e pulmonar – os mesmos locais onde são encontradas as vegetações da EI. A formação da ETNB requer, além de uma área de endotélio lesado, um estado de hipercoagulabilidade. Envelhecimento, malignidade, coagulação vascular disseminada, uremia, lúpus eritematoso sistêmico (LES) são condições predisponentes a formação de ETNB.

No processo de inicial de colonização bacteriana, a aderência tem um papel central, constituindo-se em um requisito para a invasão celular do hospedeiro. Os dois maiores gêneros bacterianos responsáveis pela ocorrência de EI - *Staphylococcus* e *Streptococcus* - diferem quanto à sua capacidade de adesão. *Streptococcus* podem se aderir a válvulas com lesão endotelial prévia. Em contraste, *S. aureus* podem colonizar o endotélio intacto.

*S. aureus* e outras poucas bactérias relacionadas a EI carregam adesinas em sua superfície. Adesinas são proteínas de superfície com função adesiva, como as proteínas ligantes de fibronectina. Células endoteliais respondem à inflamação local por meio da expressão de várias moléculas, incluindo-se as integrinas da família  $\beta 1$ . Integrinas da família  $\beta 1$  irão mediar a adesão bacteriana por intermédio das proteínas ligadoras de fibronectina (10)

Superfícies não biológicas presentes em acessos venosos, cabos dos marcapassos, desfibriladores ou dispositivos de assistência cardíaca são mais susceptíveis à colonização por microrganismos do que superfícies biológicas. Na colonização de superfícies abióticas, a formação do biofilme é considerada fator de virulência essencial.

O biofilme é um agregado bacteriano envolto em uma matriz de polissacarídeos e proteínas produzidas pela bactéria e pelo hospedeiro. O ambiente gerado no biofilme garante a aderência bacteriana, nutrição, e proteção contra o sistema imune e contra tratamento antimicrobiano (10). Bactérias contidas nesse biofilme são extremamente difíceis de tratar, tendo uma resistência bacteriana 500 vezes superior àquela encontrada nas formas de vida “livre”. Esse aumento da resistência resulta da matriz de exopolissacarídeo que envolve as bactérias, criando uma barreira que dificulta a penetração dos antimicrobianos. A diminuição do metabolismo bacteriano e crescimento lento das bactérias no biofilme também contribuem para a resistência às drogas que atuam predominantemente no metabolismo e proliferação celulares (39).

Outro mecanismo que explica a refratariedade ao tratamento ou recorrência da infecção após completado o tratamento antimicrobiano em alguns casos de EI causada por *S. aureus* são as “*small colony variants*”. Elas são definidas como pequenas colônias, de crescimento lento, que ocorrem nas placas de ágar, com pigmentação diminuída ou ausente, que expressam diferentes padrões de virulência e de resistência antimicrobiana. Essas colônias ocorrem naturalmente, no curso de uma infecção e têm a habilidade de conversão para colônias de virulência e crescimento habitual.

As cepas que compõem essas colônias possuem fenótipos de pouca virulência (representada pela menor expressão toxinas e proteases) e são particularmente adaptadas a persistência no meio intracelular. Além disso, devido ao seu menor metabolismo e taxa de crescimento, liberam menos produtos de *turnover* celular, como DNA e componentes da parede bacteriana – que são capazes de ativar o sistema imune via receptores *toll-like*. Dessa maneira, localizadas intracelularmente e sem causar apoptose da célula hospedeira, as bactérias ficam protegidas do sistema imune e podem persistir de maneira assintomática por longos períodos (40).

Outro mecanismo de persistência e escape do sistema imune é a localização intracelular facultativa. Algumas bactérias, incluindo o *S. aureus*, já demonstraram tal propriedade. A localização intracelular proporciona proteção contra a resposta imune do hospedeiro e também das drogas antimicrobianas. Além disso, localizada intracelularmente, a bactéria pode induzir efeitos proinflamatórios e citotóxicos que levarão à destruição tissular, funcionando com uma porta de entrada que vai permitir que a bactéria alcance estruturas mais profundas.

Considerando-se o aumento da incidência da EI no idoso, merece atenção também o estudo do imunosenescência. Essa é definida como o declínio que ocorre no sistema imune associado ao

envelhecimento. Tal declínio ocorre tanto na função imune celular quanto na humoral (41, 42). Nesse sentido, foi demonstrado um estado pró-inflamatório crônico que ocorre com envelhecimento, representado pelo aumento da expressão de interleucina (IL) 6, IL-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), além da diminuição na função dos neutrófilos e macrófagos. Também ocorre um aumento da relação CD4/CD8 com a idade, devido a decréscimo do número de linfócitos T CD8.

De maneira interessante, e particularmente relacionada a um dos principais agentes etiológicos da EI, Wenisch et al (43) mediram a capacidade de fagocitose dos neutrófilos, assim como a produção de espécies reativas de oxigênio em três grupos etários: 21 a 36, 38 a 56 e 62 a 83 anos. Demonstraram redução significativa, com a progressão da idade, na capacidade de fagocitose de *S. aureus*, além de menor produção de espécies reativas de oxigênio após estimulação por *S. aureus*.

### 3.1.6 Quadro clínico

A atual apresentação clínica da EI foi bem delineada no estudo de Murdoch et al (28), que acompanhou uma coorte de 2781 pacientes com EI, admitidos em 58 hospitais de 25 países, de 2000 a 2005 (incluindo oito centros do Brasil, Argentina e Chile, que constituíram 9,1% do total de pacientes). Nesse estudo, a idade média dos pacientes foi de 57 anos, sendo que 68% da população incluída era composta de homens. A maioria (72%) das EI ocorreram válvulas nativas, 21% em válvulas protéticas e 7% envolveram um dispositivo cardíaco. *S. aureus* foi o agente mais comum, sendo isolado em 31% dos casos. O acometimento valvar mais comum foi o da mitral (41%) seguido da valva aórtica (37,6%). As comorbidades mais comuns foram diabetes mellitus (16%), doença renal crônica dialítica (8%), câncer (8%) e HIV/AIDS (2%).

Com relação à apresentação clínica relatada nesse estudo (28), febre ocorreu em 80% dos casos, novo sopro cardíaco em 48% e piora de um sopro existente em 20% dos casos. Outras alterações menos comuns incluíram: hematúria em 26% dos casos, esplenomegalia em 11%, hemorragias ungueais em 8%, lesão de Janeway em 5%, manchas de Roth em 5% e hemorragias conjuntivais em 5%.

Com relação às alterações laboratoriais, elevação da proteína C reativa (PCR) ocorreu em 62% dos casos, elevação da velocidade de hemossedimentação (VHS) em 61%, e fator reumatoide elevado em 5% dos casos.

A combinação de ecocardiograma transtorácico e transesofágico demonstrou vegetação em 90% dos casos, regurgitações valvares em 60% e abscessos paravalvares em 20% dos casos.

### 3.1.7 Condições predisponentes

Doença reumática continua como uma condição predisponente central nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. Estudo de 2005 sobre impacto global da febre reumática (44) estimou que 63% das EI em países subdesenvolvidos são causadas doença valvar reumática. Entretanto, no estudo de Murdoch et al (28), com aproximadamente três mil pacientes, a condição predisponente mais comum foi doença valvar degenerativa, com pequena contribuição da cardiopatia reumática (3,3%), refletindo a baixa prevalência desta nos países desenvolvidos.

Outra condição predisponente, que reflete o envelhecimento populacional e aumento dos cuidados em saúde, foi o uso mais frequente de acessos venosos e procedimentos invasivos. Consequentemente, houve aumento das taxas de bacteremia por *Staphylococcus* - e logo da EI provocada por esse agente. Evidência desse aumento da incidência de bacteremias por Gram positivos vem do trabalho de Martin (45), que avaliou a epidemiologia da sepse em mais de 10 milhões de casos, nos Estados Unidos, num período de 22 anos (de 1979 a 2000). A taxa de sepse por Gram positivo aumentou 26% ao ano, ultrapassando o número de casos de sepse por Gram negativo a partir de 1987.

A isso, soma-se aumento do número de trocas valvares e uso de dispositivos cardíacos como marcapassos, cardiodesfibriladores implantáveis, e ressincronizadores cardíacos – outros fatores ligados a aumento da ocorrência de EI por *Staphylococcus*.

Fowler et al (46), a partir de dados de uma colaboração internacional para estudo da endocardite, publicaram artigo intitulado “Endocardite infecciosa por *Staphylococcus aureus*: uma consequência do progresso médico”. Nesse trabalho, foram avaliados 1779 casos de EI definida, sendo que destes, 558 (31%) foram causadas por *S. aureus*. Os pacientes com EI causada por *S. aureus*, quando comparados com EI por outros agentes, haviam sido submetidos a maior número de procedimentos invasivos previamente (23% vs. 16%), requeriam diálise com mais frequência

(14% vs 6%), tinham mais diabetes (19% vs 14%) ou tinham cateter intravascular como provável foco da EI de maneira mais frequente (28% vs 9%). Outro dado interessante foi a alta prevalência (27,4%) de pacientes com EI por *S. aureus* meticilina resistente (MRSA). Nesse estudo (Fowler et al), a proporção de MRSA entre os 24 casos provenientes do Brasil foi ainda maior: 37,5%.

### 3.1.8 Diagnóstico

O diagnóstico da EI é feito a partir da análise conjunta de fatores clínicos, laboratoriais e ecocardiográficos. Em 1994, com base no acompanhamento de 353 paciente, Durack e colaboradores da Universidade de Duke propuseram critérios diagnósticos para classificar os pacientes com suspeita de EI em 3 grupos: definitiva, possível e rejeitada (47). A classificação em cada um desses grupos se baseou na presença de dois critérios maiores e seis critérios menores. Os critérios maiores foram achados típicos ao ecocardiograma e/ou hemocultura e os menores foram: condição predisponente, febre, fenômenos vasculares, fenômenos imunológicos e achados sugestivos ao ecocardiograma e a hemocultura.

O diagnóstico de EI definitiva pode se dar pelo critério patológico ou clínico. O critério patológico é definido como a demonstração do microrganismo por cultura ou análise histopatológica da vegetação (valvar ou após embolização sistêmica) ou abscesso cardíaco. O critério clínico vai envolver a caracterização dos critérios maiores e menores, mencionados anteriormente.

Vários estudos posteriores validaram tais critérios, e também demonstraram uma boa concordância entre examinadores (72 a 90%) (48). Como exemplo de trabalho que estudou o desempenho dos Critérios de Duke, Habib et al (49) avaliaram 93 casos de EI comprovada por avaliação histopatológica. Considerando os casos classificados como definitivos, encontrou uma sensibilidade de 76% (49). Outro estudo com 143 pacientes, encontrou alta especificidade para os critérios de Duke (88 a 97%) (50).

Entretanto, com o melhor entendimento da doença, mudanças epidemiológicas e prática na aplicação desses critérios, alguns problemas foram demonstrados. Como exemplo, na publicação original, as bacteremias por *S aureus* e *Enterococcus* só eram consideradas critérios maiores se fossem adquiridas na comunidade. Outra mudança foi melhor definição dos critérios sorológicos, que são importantes nos casos de isolamento de germes com crescimento lento em

hemoculturas habituais (*Brucella spp*) ou que requerem meios especiais (*Bartonella spp*, *Legionella spp*, *Tropheryma whipplei* e *Coxiella burnetti*, agente da febre Q). No critério original, sorologia positiva para Febre Q era considerada um critério menor, o que classificava muitos casos confirmados em análise histopatológica como EI possível (e não definitiva) (48).

Partindo da análise dos dados da própria Universidade de Duke (mais de 800 casos de EI definitiva ou possível desde 1984), da experiência clínica na aplicação do critério original, Li e colaboradores propuseram em 2000 os critérios de Duke modificados (51). Esses são apresentados nos quadros 2 e 3.

#### Quadro 2:

---

### **Classificação dos casos de endocardite infecciosa em definitivos, possíveis ou rejeitados, de acordo com os critérios de Duke modificados**

---

#### ENDOCARDITE INFECCIOSA DEFINITIVA:

##### **Critérios patológico**

- (1) Microrganismo demonstrado por cultura ou análise histológica da vegetação valvar, de uma vegetação que foi embolizada, ou de um abscesso intracardíaco
- (2) Lesões patológicas: análise histológica uma de uma vegetação ou abscesso intracardíaco que demonstra endocardite ativa

##### **Critério clínico**

- (1) 2 critérios maiores, ou
- (2) 1 critério maior e 3 critérios menores, ou
- (3) 5 critérios menores

#### ENDOCARDITE INFECCIOSA POSSÍVEL

- (1) 1 critério maior e 1 critério menor, ou
- (2) 3 critérios menores

#### ENDOCARDITE INFECCIOSA REJEITADA

- (1) Diagnóstico alternativo claro
- (2) Resolução dos sinais e sintomas sugestivos de endocardite com tempo de antibioticoterapia menor ou igual a 4 dias
- (3) Ausência de evidência patológica de endocardite infecciosa em peça cirúrgica ou autópsia, com tempo de antibiótico menor ou igual a 4 dias
- (4) Não preenche os critérios para endocardite possível, como acima expostos

---

Adaptado de Li, J.S., et al., *Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis*. Clinical Infectious Diseases, 2000.

## Quadro 3:

---

**Definições dos critérios maiores e menores utilizados nos critérios de Duke modificados**

---

## CRITÉRIOS MAIORES:

- Hemocultura positiva para endocardite infecciosa
  - Microrganismos típicos consistentes com EI, em duas hemoculturas:  
*Streptococcus* do grupo viridans, *Streptococcus bovis*, *Staphylococcus aureus*, grupo HACEK (*Haemophilus* spp, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*), ou *Enterococcus* spp adquirido na comunidade, na ausência de um foco primário
  - Outros microrganismos consistentes com EI, isolados em hemoculturas persistentemente positivas, definidas como:
    - (1) Pelo menos duas hemoculturas positivas, de amostras coletadas com pelo menos 12 horas de diferença, ou
    - (2) Positividade em todas de 3 ou na maioria de 4, com o intervalo entre a primeira e a última coleta maior que 1 hora, ou
    - (3) Hemocultura única para *Coxiella burnetii* ou título de anticorpos IgG antifase I > 1: 800
- Evidência de envolvimento cardíaco
  - Massa intracardíaca oscilante aderida a válvula ou suas estruturas de suporte, assim como em material implantado
  - Abscesso
  - Nova deiscência de uma válvula protética
  - Nova regurgitação valvar (piora ou mudança de um sopro prévio não é suficiente)

## CRITÉRIOS MENORES:

- Condição cardíaca predisponente ou usuário de drogas injetáveis
  - Febre (temperatura acima de 38°)
  - Fenômeno vascular
    - Fenômenos embólicos arteriais maiores, infartos pulmonares sépticos, aneurisma micótico, hemorragia intracraniana, hemorragias conjuntivais, lesões de Janeway
  - Fenômeno imunológico
    - Glomerulonefrite, nódulos de Osler, manchas de Roth, fator reumatóide positivo
  - Evidência microbiológica: hemocultura positiva, porém não preenche um critério maior (não considera hemocultura única para *Staphylococcus* coagulase negativo ou microrganismos que não causam endocardite)
-

---

Adaptado de Li, J.S., et al., *Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis*. Clinical Infectious Diseases, 2000.

As principais atualizações dos critérios de Duke modificados, em comparação ao original, foram: (1) incorporação de título de anticorpo IgG antifase I > 1: 800 ou uma hemocultura única para *Coxiella burnetti* como critério maior (2) a categoria EI possível, antes definida como casos que não eram classificados como EI definitiva ou rejeitada, agora são definidos como aqueles que apresentam pelo menos 1 critério maior e 1 critério menor ou 3 critérios menores (3) o critério menor “achados ecocardiográficos consistentes com EI, mas que não preenchem critério maior” foi eliminado (4) Bacteremia por *S aureus* foi considerada como critério maior, independente da fonte da bacteremia.

A sensibilidade dos critérios de Duke varia de acordo com a população avaliada. Estudo da Romênia, com 241 pacientes com suspeita de EI, encontrou-se uma sensibilidade de 63%. Essa menor sensibilidade (em comparação com 80% encontrada em outros estudos) foi atribuída a grande proporção de EI com culturas negativas – que nesse estudo representaram 60% dos casos (36).

Propostas para futuras mudanças nos Diagnósticos de Duke Modificados incluem testes sorológicos para outros organismos de difícil isolamento em hemocultura, como *Bartonella* spp e *Chlamydia* spp (que no momento são limitados pelo grande número de reações cruzadas) e testes baseados em amplificação do DNA, como reação em cadeia da polimerase (do em inglês Polymerase Chain Reaction). Esses últimos têm sensibilidade limitada, a menos que o material examinado seja tecido valvar cardíaco. Outros achados significativos na prática clínica e ainda não incorporados aos critérios menores incluem: PCR (proteína C reativa), esplenomegalia, hematúria microscópica e velocidade de hemossedimentação (VHS) e baqueteamento digital de início recente. Em um estudo de 100 casos com EI de válvula nativa confirmada por exame anatomopatológico, a inclusão desses parâmetros levou a uma reclassificação para EI definitiva em 10% dos casos, sem perda da especificidade (48).

Reforçando a ideia que critérios diagnósticos estão sempre em evolução, a Diretriz de 2015 da Sociedade Europeia de Cardiologia no Manejo da Endocardite Infeciosa (52) propôs as seguintes modificações (1) considera a identificação de lesões paravalvares pela tomografia cardíaca como um critério maior (2) eventos isquêmicos assintomáticos (cerebrais ou esplênicos),

identificados por exames de imagem, ou aneurismas infecciosos, podem ser considerados um critério menor (3) Na suspeita de EI de prótese cardíaca de difícil diagnóstico, após avaliação convencional, atividade inflamatória anormal no local de implantação valvar (mais de 3 meses após cirurgia de implante) detectadas por tomografia de emissão de fóton único (do inglês, single-photon emission CT – SPECT/CT) ou pelo PET/CT (tomografia por emissão de pósitron) podem ser consideradas um diagnóstico maior.

Concluindo, como a EI é uma doença heterogênea, com alta variabilidade de apresentação clínica, o uso de critérios nunca será totalmente satisfatório. Logo, o julgamento clínico deve ser sempre considerado.

### 3.1.9 Complicações e mortalidade

Complicações cerebrovasculares estão entre as mais frequentes e devastadoras complicações da EI. Incluem, entre outros, o acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico e hemorrágico. Revisão sistemática feita pelo GBD (Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors) study (26) encontrou uma incidência global de AVC de 14,5% nos pacientes hospitalizados, sendo que a taxa mais alta foi reportada na América do Sul (19%).

Estudo de Champey et al (53) comparou o uso de tomografia computadorizada (TC) de crânio com a ressonância magnética (RM) em 62 pacientes com EI, submetidos a imagem cerebral em até três semanas do diagnóstico. Vinte (32%) tinham sintomas neurológicos. A TC demonstrou sinais patológicos em 49% dos pacientes, enquanto 74% das ressonâncias magnéticas (RM) cerebrais demonstraram anormalidades. As anormalidades mais comumente encontradas na RM foram: isquemia (48%), pequenos sangramentos (34%), hemorragias (16%), abscesso (9%) e aneurisma micótico (4%).

Sonneville et al (54) estudaram 198 pacientes internados em terapia intensiva com EI com acometimento das valvas cardíacas esquerdas. Destes, 55% desenvolveram evento neurológico, incluindo AVC isquêmico (39%), AVC hemorrágico (26%), meningite ou reação meníngea (20%), abscesso cerebral (7%), e aneurisma micótico (5%). Tais eventos contribuíram para uma morbidade significativa, com menos de 1/3 dos pacientes retornando à independência funcional.

Mesmo com os avanços nos métodos diagnósticos e na abordagem terapêutica da EI, a mortalidade em um ano não se alterou – aproximadamente um em cada quatro pacientes com EI

não sobreviverá. A mortalidade varia de acordo com o subgrupo de pacientes estudados, variando de 10% nos pacientes com EI com acometimento das valvas cardíacas direitas a 40% naqueles com EI em prótese causada por *Staphylococcus aureus*.

Essa alta mortalidade é encontrada em nosso meio. Estudo conduzido no Hospital das Clínicas da UFMG revelou mortalidade intra-hospitalar de 31% (1). No estudo do GBD, mortalidade global encontrada foi de 20% (26).

### 3.1.10 Tratamento

As evidências para o tratamento da EI ainda são derivadas predominantemente de estudos observacionais prospectivos, e não de ensaios clínicos randomizados. Para receberem tratamento adequado, os pacientes com EI requerem abordagem rápida, coordenada e multidisciplinar. Entre os especialistas se incluem: o cardiologista, cirurgião cardíaco, infectologista, neurologista, além de outras especialidades e áreas do cuidado. Como já mencionado (25), o estabelecimento de uma equipe multidisciplinar bem estruturada, capaz de oferecer cuidado coordenado e baseado nas melhores evidências levou a uma diminuição importante da mortalidade por EI em um ano, de 18,5 para 8,2%.

A erradicação do agente causador é fundamental para o tratamento, o que requer uso prolongado de antibióticos. Esse tempo varia de duas semanas para EI causada por *Streptococcus* susceptível a penicilina, tratado com uma combinação de betalactâmico e aminoglicosídeo a seis semanas para a EI causada por *Enterococcus spp.* A maioria dos casos de EI causados por *Staphylococcus* recebe quatro semanas de antibioticoterapia. Maior detalhamento do esquema antimicrobiano indicado de acordo com cada situação, assim como seu tempo de uso, estão apresentados nas diretrizes da Sociedade Americana de Cardiologia, de 2015 (55), assim como na diretriz da Sociedade Europeia de Cardiologia, também de 2015 (52).

A cirurgia cardíaca é necessária em grande parte dos casos, seja como adjunta na remoção do material infectado nos casos de EI sem resposta ao tratamento clínico, ou no controle de foco no caso de uma EI complicada com um abscesso. Outras indicações incluem as disfunções valvares agudas que geram repercussão hemodinâmica e provocam insuficiência cardíaca e a profilaxia de eventos embólicos.

A proporção de pacientes que requerem tratamento cirúrgico também foi estudada revisão sistemática feita pelo estudo do GBD (26). A proporção global de pacientes que requerem cirurgia foi de 32%, com uma ampla variação regional: variando de 12% no sul da Ásia, 31% na América do Norte a 75% no leste europeu. Na América Latina, essa proporção foi de 41%.

## 3.2 BIOMARCADORES NA ENDOCARDITE INFECCIOSA

### 3.2.1 Importância e biomarcadores estudados

Biomarcadores podem ser muito úteis no manejo da EI. Como exemplo, eles podem auxiliar nos casos de EI com diagnóstico difícil – o que não se constitui situação rara na prática clínica. Como mencionado em sessão dedicada, nos critérios de Duke modificados (51), o estabelecimento de EI definida vai depender principalmente da presença de critérios maiores – digam-se, achados típicos na hemocultura ou ao ecocardiograma.

Como mostrado, as hemoculturas podem ser negativas em grande parte dos casos (chegando a 60%), o que pode tornar o diagnóstico de EI desafiador. Em outros casos, pacientes com bacteremia podem não ter achados típicos ao ecocardiograma. A ausência de achados característicos ao ecocardiograma transesofágico tem um importante impacto no diagnóstico da EI. Esse exame tem um alto valor preditivo negativo, variando de 86 a 97% (56). Porém, fatores como tamanho da vegetação, presença de doença valvar de base (degeneração mixomatosa e calcificações), presença de prótese valvar e fase evolutiva da doença podem limitar a acurácia do ecocardiograma. Em um estudo, cinco de 65 pacientes (7,6%) que tiveram ecocardiograma transesofágico inicialmente negativo foram posteriormente diagnosticados com EI. Em três destes, repetição do ecocardiograma transesofágico após uma semana demonstrou presença de vegetação.

Assim, a presença de um biomarcador que possa auxiliar no diagnóstico – especialmente nos casos com resultados negativos ao ecocardiograma e hemocultura - teriam grande valor na tomada de conduta apropriada, com impacto no prognóstico do paciente. Outra função dos biomarcadores seria a identificação precoce dos casos com alta probabilidade de desfecho desfavorável – necessidade de cirurgia, insuficiência cardíaca e morte.

Antes de explorar o estudo das micropartículas derivadas de células como biomarcadores na EI, vale uma pequena menção sobre outros biomarcadores já estudados nessa condição. Em uma revisão sistemática, Snipsøyr et al (57) encontraram 256 trabalhos que avaliaram biomarcadores na EI. Selecionando os estudos com delineamento e grupo controle adequados, chegaram a 18 trabalhos, com os seguintes biomarcadores: PCR, procalcitonina, peptídeo natriurético cerebral (BNP), troponina, cistatina C, proteína ligadora de lipopolissacarídeo, proteínas ligadoras de cálcio S100A11, moléculas de adesão e citocinas.

Os achados associados a cada um desses biomarcadores são resumidos no quadro 3. Os estudos serão melhor detalhados no texto.

Quadro 4 : Biomarcadores estudados na Endocardite Infecciosa

Biomarcador	Característica	Referência
	Não foi capaz de distinguir EI de outras infecções bacterianas	
<b>Procalcitonina</b>	Não pode ser usada como ferramenta <i>rule in</i> ou <i>rule out</i> no diagnóstico de EI	Yu et al., 2013
	Valores aumentados na EI por <i>S aureus</i> , quando comparada a EI por <i>S viridans</i> ou <i>Staphylococcus coagulase</i> negativo	
<b>BNP</b>	Valores elevados associados a maior ocorrência de desfecho combinado (mortalidade hospitalar, abscesso perivalvar e ocorrência de evento neurológico)	Shiue et al., 2010
<b>NT-proBNP</b>	Níveis elevados relacionados a cirurgia precoce ou mortalidade hospitalar	Purcell et al., 2008
	Elevação associada a maior ocorrência de morte, abscesso perivalvar e eventos do sistema nervoso central	Purcell et al., 2008
<b>Troponina</b>	Nível em 15 dias relacionado a mortalidade	Bjurman et al., 2012
<b>Análise conjunta do NT-proBNP e troponina</b>	NT-proBNP (<1500 pg/mL) e troponina I <0,03 ng/ml – indicador de bom prognóstico (não evolução para óbito ou necessidade cirúrgica)	Kahveci et al., 2007
<b>Cistatina C</b>	Nível com duas semanas de tratamento associada com mortalidade em 90 dias e 5 anos	Bjurman et al., 2012
<b>Proteína ligadora de lipopolissacarídeo</b>	Sensibilidade de 96,7% e especificidade de 87,5% para o diagnóstico de EI, desempenho semelhante ao da PCR (ambos comparados a um controle saudável)	Vollmer et al., 2009
<b>Proteínas ligadoras de cálcio S100A11</b>	Expressão significativamente aumentada em pacientes com EI, quando comparados aos pacientes com EI descartada e controles saudáveis	Thuny et al., 2012
<b>Moléculas de adesão</b>	E-selectina e VCAM-1 foram significativamente elevadas na EI por <i>S aureus</i> , se comparada a bacteremia por <i>S aureus</i>	Söderquist et al., 1999
<b>Citocinas</b>	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-12 significativamente elevados nos pacientes com EI, quando comparados a outras infecções que não EI	Araújo et al., 2015

<p>EI causada por <i>Staphylococcus</i> spp tiveram níveis significativamente mais elevados de TNF-<math>\alpha</math> e IL-12, quando comparados a causada por outros agentes bacterianos</p> <p>IL-8 mais elevada nos pacientes que faleceram</p> <p>IL-12 relacionada ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca</p>	
<p>IL-6 significativamente elevada nos pacientes com EI, quando comparadas a outras infecções bacterianas</p> <p>Queda de IL-6 no decorrer do tratamento</p>	<p>Rawczynska-Englert et al., 2000</p>
<p>Nível IL-6 em 15 dias relacionado a mortalidade</p>	<p>Bjurman et al., 2012</p>

---

### 3.2.2 Procalcitonina e Proteína C Reativa (PCR)

Procalcitonina é o precursor da calcitonina que é secretada em condições normais pelas células C da tireóide e células K do pulmão. Em indivíduos saudáveis, procalcitonina é normalmente indetectável (<0,01 ng/ml). Quando estimulada por endotoxina, pode ser produzida em vários outros tecidos, sem resposta apreciável ao estímulo por uma inflamação estéril ou infecção viral (58).

Poderia um determinado valor de procalcitonina diferenciar EI de pacientes com sepse de outra origem? Metanálise de 2013 (58) demonstrou que não existe um valor de procalcitonina capaz de diferenciar, de maneira segura, pacientes com EI daqueles com outras infecções bacterianas. Procalcitonina negativa também não é capaz de excluir EI em um paciente. Nesse sentido, a procalcitonina teve um desempenho igual ou inferior ao da proteína C reativa, respectivamente: área sob a curva ROC (AUC) 0,71 vs. 0,80; sensibilidade 0,64 vs. 0,75; especificidade 0,73 vs. 0,73. Logo, as evidências atuais não dão suporte ao clínico no uso da PCR ou da procalcitonina como uma ferramenta *rule in* ou *rule out* no diagnóstico da EI.

### 3.2.3 BNP, NT-proBNP e troponina

O pró-peptídeo natriurético cerebral (proBNP) pode ser clivado em duas porções terminais N e C, originando NT-proBNP e BNP, respectivamente. Níveis elevados de NT-proBNP e BNP

estão relacionados a aumento da sobrecarga cardíaca e distensão ventricular. O NT-proBNP parece ter valor prognóstico na EI. Em trabalho (59) com 45 pacientes com EI definitiva, os valores médios de NT-proBNP encontrados à admissão (4133 pg/ml) foram mais elevados do que aqueles encontrados em outros trabalhos que estudaram sepse grave (1677 pg/ml), insuficiência cardíaca grave (1767 pg/ml) ou síndrome coronariana aguda (669 pg/ml). Pacientes que necessitaram de cirurgia precoce ou que morreram durante internação tiveram níveis significativamente mais altos de NT-proBNP, quando comparados àqueles que não tiveram tais desfechos.

Shiue et al (60) examinaram os níveis de BNP em 45 pacientes com EI. O desfecho primário foi composto por mortalidade hospitalar, abscesso perivalvar e ocorrência de evento neurológico. Valores de BNP superiores a 400 pg/ml foram considerados alterados, o que ocorreu em 71% dos pacientes. No grupo com BNP alterado, a ocorrência do desfecho primário foi quatro vezes maior (63% vs 15%,  $p < 0,01$ ). O valor médio do BNP foi de 2.150 pg/ml naqueles que morreram durante internação, sendo de 628 pg/ml nos sobreviventes ( $p = 0,04$ ).

Troponinas são biomarcadores liberadas pelo miócito em situações de dano miocárdico. A troponina I (TnI) também demonstrou valor prognóstico na EI. Purcell et al (61) mensuraram troponina I em 51 pacientes com EI, sendo que valores superiores a 0,1 mg/dl foram considerados alterados – o que ocorreu em 65% dos pacientes. Pacientes com troponina I alterada tiveram maior ocorrência de morte, abscesso perivalvar e eventos do sistema nervoso central, quando comparados aos pacientes sem elevação da troponina. No trabalho de Kahveci et al (59), 27 pacientes (71%) tiveram níveis de TnI detectáveis (considerando-se o valor de corte de 0.03 ng/ml). O desfecho primário (composto por mortalidade hospitalar e necessidade de cirurgia) ocorreu em 81% dos pacientes com troponina positiva vs. 45% dos pacientes com troponina negativa ( $p = 0,004$ ).

Trabalhos também avaliaram a dosagem conjunta da troponina e do BNP ou NT-proBNP – o que demonstrou um ganho na capacidade prognóstica. No trabalho de Kahveci et al (59), pacientes com NT-proBNP ( $<1500$  pg/mL) e com troponina I  $<0,03$  ng/mL não registraram ocorrência mortalidade hospitalar ou necessidade de cirurgia. De maneira semelhante, no trabalho de Shiue et al (60) pacientes com elevação de ambos os marcadores (BNP e troponina I) tiveram maior proporção do desfecho primário (mortalidade hospitalar, abscesso perivalvar e ocorrência de evento neurológico) - 69% - em comparação àqueles com elevação de apenas um dos marcados (29%) ou nenhum dos marcadores (0%).

### 3.2.4 Cistatina C

Cistatina C é uma proteína com massa molecular de 13.359 Da, composta por 120 aminoácidos, que atua como um potente inibidor de proteases cisteínicas. É produzida num ritmo constante por todas as células nucleadas e livremente filtrada pelos glomérulos (em virtude de seu baixo peso molecular em combinação com uma carga elétrica positiva). Sua concentração sérica independe da idade, sexo, dieta, massa muscular e peso corporal. Por isso, é considerada um marcador de função renal mais acurado que a creatinina.

Alterações da cistatina C e sua relação prognóstica foram estudadas em trabalho (62) que coletou amostrou amostras de 125 pacientes com EI definida, à admissão e duas semanas após. O nível de cistatina C à admissão foi associada com mortalidade em 90 dias (OR 5,7 IC95% 2,2-14,7,  $p < 0,0001$ ) e em cinco anos (OR 7,1, IC 95% 2,6-19,5,  $p < 0,0001$ ).

De maneira interessante, o estudo mencionado acima analisou outros biomarcadores, como PCR, NT-proBNP, troponina T (TnT) e IL-6, além de variáveis clínicas (idade, hipertensão arterial) e achados ecocardiográficos (a presença de regurgitação mitral em qualquer grau). Encontraram que os níveis de PCR, IL-6 e TnT com duas semanas de tratamento – mas não os valores da admissão – foram relacionados a mortalidade em cinco anos. Logo, os autores concluem que a resposta ao tratamento (analisada em 15 dias) é de maior importância prognóstica do que as alterações à admissão.

### 3.2.5 Proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP)

Proteína ligadora de lipopolissacarídeo (do inglês lipopolysaccharide-binding protein – LBP) é uma proteína glicada produzida predominantemente pelos hepatócitos. Ela é liberada na corrente sanguínea como um reagente de fase aguda, tendo uma alta afinidade pelo lipopolissacarídeo e outros componentes da superfície bacteriana, sendo estudada como um novo marcador para infecção bacteriana.

Vollmer et al (63) avaliaram os valores de LBP e PCR em 57 pacientes com EI definida, e os comparou com 40 pacientes com doenças cardíacas valvares e 55 sujeitos saudáveis. Os valores médios da LBP encontrados nos pacientes com EI (33,41 mg/L) foram significativamente aumentados em relação aos pacientes com doenças valvares (6,67mg/L) e indivíduos saudáveis

(5,61 mg/L). A LBP teve sensibilidade de 96,7% (95% IC 92,2%-100%) e especificidade de 87,5% (IC 95%, 77,3%–97,7%) para o diagnóstico de EI, considerando a população estudada. Tal resultado foi semelhante àquele encontrada para PCR – 95% (95% IC 89,5%-100%) e 87,5% (95% IC 77,3%-97,7%). O uso de LBP e PCR – separados ou em combinação – não alterou a performance diagnóstica.

### 3.2.6 Proteínas ligadoras de cálcio S100A11

Proteínas ligadoras de cálcio S100 A11 são membros da família das proteínas S100, que são localizadas no citoplasma ou no núcleo de uma grande variedade de células. Tais proteínas estão envolvidas na endocitose, exocitose, regulação enzimática, crescimento celular, apoptose e inflamação.

Thuny et al (64) avaliaram o perfil da transcrição gênica em 39 pacientes com EI, comparando-os com aquele de 10 pacientes com doença valvar cardíaca com suspeita inicial de EI (por febre ou novas anormalidades detectadas ao ecocardiograma) posteriormente excluída e de 10 pacientes saudáveis. O método utilizado foi a reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os pacientes com EI tiveram expressão significativamente aumentada do gene S100A11, quando comparados aos pacientes com EI descartada ( $p < 0,05$ ) e controles saudáveis ( $p < 0,001$ ). Essa transcrição aumentada se refletiu também na mensuração sérica da proteína, medida por ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Níveis de S100A11 foram significativamente maiores nos pacientes com EI, comparando-se aos dos pacientes com suspeita de EI (5,0 ng/ml vs. 2,1 ng/ml,  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, foi demonstrado que a transcrição gênica da S100A11 foi significativamente maior na EI por *S. aureus* quando comparada à EI causada por *Streptococcus* spp.

### 3.2.7 Moléculas de adesão

A ativação endotelial que ocorre nos diversos processos infecciosos, incluindo na EI, pode ser avaliada por meio das moléculas de adesão, entre elas a E-selectina, ICAM-1 (do inglês, Intercellular Adhesion Molecule 1) e VCAM-1 (do inglês, vascular cell adhesion molecule 1). Em um contexto de ativação endotelial, tais moléculas têm sua expressão aumentada e são liberadas na circulação (65).

Söderquist et al (65) avaliaram se pacientes com EI causada por *S. aureus* tinham perfil de ativação endotelial diferente daquele de pacientes com bacteremia por *S. aureus* (porém sem critérios para EI). Para isso, analisaram moléculas de adesão em 50 pacientes com bacteremia por *S. aureus*, e em 15 pacientes com EI causada por *S. aureus*. Controle foi composto por 80 indivíduos saudáveis. Pacientes com EI, quando comparados àqueles com bacteremia, tiveram níveis significativamente aumentados de E-selectina (156 ng/ml vs. 80 ng/ml,  $p = 0,01$ ) e de VCAM-1 (1.745 ng/ml vs. 1.172 ng/ml,  $p = 0,003$ ). Não houve diferença significativa para o ICAM-1. Tais marcadores não demonstram significado prognóstico, considerando-se mortalidade.

### 3.2.8 Citocinas

O termo citocinas define um grande grupo de peptídeos não enzimáticos que atuam como efetores da resposta imune e inflamatória. Trabalho do grupo de estudo em Endocardite Infecciosa do Hospital das Clínicas da UFMG (7) avaliou o perfil das citocinas na EI. Para isso, foram avaliados 81 pacientes com EI, que foram comparados a dois grupos controle: 30 pacientes com outras infecções que não EI e 34 indivíduos saudáveis. Foram analisados os seguintes biomarcadores: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ .

Os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 foram significativamente elevados nos pacientes com EI, quando comparado ao grupo controle de paciente com infecção que não EI.

Também foram observadas variações de acordo com o agente etiológico. Pacientes com EI causada por *Staphylococcus* spp tiveram níveis significativamente mais elevados de TNF- $\alpha$  e IL-12 quando comparados àqueles de indivíduos com EI causada por outros agentes bacterianos. Com relação a possíveis valores prognósticos das interleucinas, níveis de IL-8 foram significativamente mais elevados ( $p = 0,032$ ) nos pacientes que faleceram. Níveis de IL-12 foram mais elevados nos pacientes que desenvolveram insuficiência cardíaca ( $p = 0,003$ ).

Rawczynska-Englert et al (66) também avaliaram o perfil das citocinas na EI. Neste estudo, níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  foram avaliados em 40 pacientes com EI. Os grupos controle foram: 15 pacientes com doença valvar reumática sem infecção subjacente e 15 pacientes com doença valvar reumática e com infecção do trato urinário. No grupo com EI, níveis de IL-6 foram significativamente elevados em todos os tempos medidos, quando comparados a ambos controles, com queda gradual significativa observada no decorrer do tratamento. Os autores concluíram que

níveis séricos elevados de IL-6 podem sugerir EI e que seus valores podem ser usados de forma complementar no diagnóstico e monitorização do tratamento.

### 3.3 MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE CÉLULAS

#### 3.3.1 Conceitos

Micropartículas (MPs) devem ser primeiramente compreendidas como um subgrupo dentro de um conjunto maior – as vesículas extracelulares. Vesículas extracelulares são vesículas compostas de membrana celular liberadas por células de diferentes organismos: dos procariotas, até eucariotas e células vegetais (14).

Corpos apoptóticos, exossomos e MPs compõem o grupo das vesículas extracelulares (67). Corpos apoptóticos são produzidos nos estágios mais tardios da apoptose celular. Têm um diâmetro maior que as MPs (1 a 3  $\mu\text{m}$ ), apesar de algumas poderem ser menores (0.5  $\mu\text{m}$ ). Do mesmo modo que as MPs, estes também expressam fosfatidilserina na sua superfície, porém, de forma clássica, carregam DNA e histonas.

Exossomos são vesículas de 30 a 100nm - logo possuem uma dimensão inferior à das MPs (habitualmente conceituados como entre 100 e 1000nm). Contudo, não existe um consenso dos pontos de corte usados na diferenciação entre exossomos e MPs, ocorrendo uma sobreposição de valores. Exossomos são compostos por uma membrana fosfolipídica contendo altos níveis de colesterol, esfingomiélin, sendo que as proteínas de membrana conservam a orientação da membrana celular. Usualmente, seu isolamento requer ultracentrifugação (100,000 a 200,000 x g) – em velocidades maiores que a utilizadas no isolamento das MPs.

MPs e exossomos também se diferenciam pela via de formação: enquanto MPs se originam (“brotam”) da membrana celular, a principal forma de liberação dos exossomos é como um produto final da via de reciclagem endocítica. A pesquisa em vesículas extracelulares ainda não se desenvolveu ao ponto de isolar marcadores específicos que possam diferenciar entre os subtipos de vesículas extracelulares de acordo com seu modo de formação, diferenciando vesículas originadas diretamente da membrana daquelas advindas de compartimentos de endossomos (68).

Pesquisadores empregaram diferentes conceitos para definir e classificar as vesículas extracelulares. Por exemplo, o termo microvesícula é usado com sinônimo de micropartícula, ou de maneira diferente, utilizado de maneira a englobar exossomos e MPs (16).

Em 2012, ocorreu o primeiro encontro internacional da Sociedade de Vesículas Extracelulares, no qual houve uma sessão dedicada a nomenclatura e definições. Não houve a

elaboração de um consenso internacional quanto a definição das vesículas extracelulares. O motivo para essa ausência de consenso foram o grande número de definições empregadas e o desejo de preservar a liberdade de produção científica. Os membros dessa sessão escreveram posteriormente um editorial (69), com as seguintes recomendações: (1) os autores de trabalhos científicos devem escolher suas definições de maneira clara, com argumentos lógicos, e aplica-las de maneira consistente no decorrer do trabalho (2) autores devem descrever seus métodos de obtenção e processamentos das amostras para obtenção das vesículas extracelulares (3) revisores e editores devem respeitar a escolha da nomenclatura utilizada, desde que empregada de maneira adequada (4) o termo vesícula extracelular deve ser utilizado como um termo genérico para as vesículas secretadas, e deve ser listar entre as palavras-chave. (69)

### 3.3.2 Origens, caracterização e biodistribuição.

MPs foram primeiramente descritas por Chargaff and Westem, em 1946, como um fator capaz de promover o processo de coagulação (70). Em 1967, Wolf descreveu uma “poeira celular” derivada de plaquetas, da ordem de 0.1 a 0.3  $\mu\text{m}$ , observada a microscopia eletrônica, também citando propriedades procoagulantes (71). Em 2006, o interesse no estudo das MPs foi renovado com a demonstração de que essas são capazes de carrear ácido ribonucléico (RNA), atuando como um novo mecanismo de comunicação e reprogramação celular (72).

O número de publicações sobre MPs cresce de maneira expressiva. O triênio 2005-2007 contou com menos de 10 trabalhos (considerando o termo MeSH “cell-derived microparticles” na base MEDLINE). Em 2010, esse número saltou para cerca de 157 trabalhos, sendo que em 2016 foram 252 publicações.

MPs estão presentes no sangue de pessoas sadias ou doentes. O conjunto das MPs circulantes serão uma mistura de vesículas liberadas de células sanguíneas e aquelas alojadas nos vasos sanguíneos. Elas também podem ser originadas de tumores e de células progenitoras sadias na medula óssea. MPs são formadas a partir da membrana plasmática da sua célula de origem. Essa membrana protege o conteúdo das MPs da ação de enzimas presentes no meio extracelular, servindo como uma carreadora de informação fisiológica ou patológica (14).

Durante sua liberação, a distribuição assimétrica dos fosfolipídios entre as faces interna e externa da membrana é perdida, resultando na exposição de fosfolipídios. De maneira típica, MPs

expõem na sua membrana externa o fosfolípido fosfatidilserina e carregam antígenos de membrana que refletem sua célula de origem (73, 74).

Assim, as moléculas presentes na membrana das MPs vão servir como epítomos, que podem ser identificados de acordo com os *cluster of differentiation* (CD). Por exemplo, MPs positivas para CD41a seriam originadas de plaquetas, as derivadas de células endoteliais seriam identificadas pelo CD31a+ CD41a- e aquelas originadas das hemácias pelo CD235a+ (75).

A liberação das MPs em resposta a diversos estímulos é um processo bem regulado. Trata-se de resposta primitiva e compartilhada pelas células eucarióticas. Estímulos específicos para formação e liberação das MPs incluem: ativação por endotoxinas e/ou citocinas, lise completa ou parcial pelo complemento, estresse oxidativo ou aumento das forças de cisalhamento (76, 77)

A liberação das MPs aos estímulos envolve aumento do cálcio intracelular, ativação de proteínas conhecidas como floppase e flippase (responsáveis pela distribuição de proteínas na face interna ou externa da membrana celular) e calpaínas. As calpaínas representam uma família de proteases ativadas pelo cálcio. Elas têm papel central na formação das MPs por meio da degradação de proteínas do citoesqueleto (como talina e vinculina), permitindo a formação e liberação das MPs na superfície celular. Além disso, as calpaínas tem importante papel na resposta inflamatória por intermédio da ativação do fator nuclear kappa B (NF-Kb). Este fator nuclear, por sua vez, leva à expressão de IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$ . As calpaínas têm inibidores específicos, as calpastatinas (17).

Análises proteômicas demonstram que o espectro de proteínas encontradas nas MPs é influenciado pelo tipo de estímulo que causou a vesiculação celular (78). Logo, é importante ter em mente que o conteúdo, o tamanho e a composição das vesículas extracelulares são altamente heterogêneos e dinâmicos, dependendo da célula de origem, seu estado e das condições ambientais (72)

Todo líquido corporal que contenha células, tem o potencial de conter MPs. Assim, elas já foram descritas em vários fluidos corporais: líquido pleural, ascite, líquido amniótico, saliva, liquor, líquido sinovial, urina, lavado bronco alveolar, leite materno. Já existem estudos que utilizam o RNA presente nas MPs como biomarcadores em tumores urogenitais e tumores cerebrais (78).

O nível das MPs circulantes vai refletir o balanço entre sua liberação e depuração. Por sua vez, a depuração vai depender da célula de origem e da capacidade de diferentes tipos celulares de capturarem as MPs (14). Os poucos estudos realizados mostraram que a meia-vida das MPs é muito

curta. Rank et al (79), avaliaram a depuração das MPs derivadas de plaquetas em humanos e encontraram uma meia-vida de 5.8 horas. Willekens et al (80) demonstraram que exossomos marcados derivados de eritrócitos administrados em ratos tiveram captação hepática (45%), óssea (22%), pele (10%) músculo (6%) e baço (4%), sendo que 90% foram eliminados da circulação após 30min. Vesículas marcadas foram internalizadas principalmente pelas células de Kupffer no fígado, e em grau menor por macrófagos do sistema mononuclear fagocitário (80). Takahashi et al estudaram (81), em modelo animal, a distribuição dos exossomos marcados derivados de células de melanoma. Demonstraram uma meia vida curta – 2 minutos – com maioria da captação das MPs sendo realizada no pulmão e baço (81). Mais estudos são necessários para uma melhor compreensão da biodistribuição das MPs.

De maneira a justificar a importância do estudo das MPs e sua aplicabilidade no estudo da EI, é necessária breve discussão sobre o papel das MPs na coagulação e trombose, na comunicação intercelular, na resposta imune, em indivíduos saudáveis e em condições patológicas.

### 3.3.4 Papel das micropartículas na coagulação e trombose

Entre as diversas funções biológicas já demonstradas nas MPs, pode se dizer que a mais estudada é sua capacidade pró-coagulante. Suas primeiras descrições foram como fatores coagulantes presentes no plasma, tanto em condições saudáveis quanto em patológicas. Exemplo disso é o estudo das MPs na síndrome de Scott – doença com tendência hemorrágica devido a um menor efeito pró-coagulante das plaquetas. A fisiopatologia dessa síndrome foi relacionada a uma menor de liberação de MPs e menor exposição de fosfatidilserina (14).

O papel pró-coagulante das MPs pode ser explicado pelos seguintes fatores (1) proporcionam uma superfície de membrana para a montagem de componentes da cascata de coagulação (2) presença de fosfolipídios aniônicos, em especial a fosfatidilserina (3) presença de fator tecidual, que é o maior ativador celular da cascata de coagulação (82)

Sinauridze et al (83) demonstraram que a superfície externa de uma MP derivada de plaqueta tem atividade pró-coagulante 50 a 100 maior que uma mesma área na superfície de uma plaqueta ativada. Essa diferença foi atribuída à maior concentração de fosfatidilserina, fator tecidual e receptores dos complexos pró-coagulantes. Esse maior potencial pró-coagulante faz com que a

atividade pró-coagulante de uma plaqueta isolada seja quase idêntica à de uma única micropartícula.

De forma interessante, foi demonstrado que MPs ricas em fosfatidilserina são produzidas em quantidades apreciáveis no interior da placa aterosclerótica, sendo determinantes na atividade do fator tecidual presente no núcleo lipídico da placa. Logo, a trombogenicidade de uma placa aterosclerótica na doença arterial coronariana já foi relacionada à quantidade de MPs (84).

Ziad Mallat et al (20) quantificaram o nível de MPs circulantes de indivíduos com doença coronariana estável, síndrome coronariana aguda e de pacientes controles admitidos por doença cardíaca não coronariana. MPs foram marcadas para anexina V (que se liga a fosfatidilserina) e tiveram sua atividade pró-coagulante determinada através de ensaios de protrombinase. De forma muito interessante, foi demonstrado que o nível das MPs em 12 pacientes com doença coronariana estável não foi diferente de outros 12 pacientes admitidos por doenças cardíacas não coronarianas. Porém, o nível de MPs estava significativamente mais alto naqueles 27 pacientes internados por síndrome coronariana aguda, quando comparados aos dos pacientes com doença coronariana estável ou sem doença coronariana.

A doença tromboembólica é uma clara complicação do câncer – pacientes com câncer têm uma taxa de eventos tromboembólicos 4 a 7 vezes maiores que a população geral (85). As bases moleculares responsáveis por tal relação continuam mal estabelecidas -e as MPs podem ter importante papel nesse processo. Zwicker et al (19) avaliaram a presença de MP contendo fator tecidual em 96 pacientes com câncer de diferentes histologias. Destes, 30 pacientes tinham histórico de neoplasia complicada com evento tromboembólico venoso e 60 pacientes tinham câncer não complicados com evento tromboembólico. Os grupos foram semelhantes quanto à idade, sexo e estadio da doença. Níveis elevados de MPs contendo fator tecidual foram associados à ocorrência de evento tromboembólico. Numa análise retrospectiva, pacientes com MPs contendo fator tecidual tiveram, em um ano, taxa cumulativa de 34,8% de eventos tromboembólicos contra 0% naqueles em que as MPs contendo fator tecidual não foram detectadas. O número médio de MPs contendo fator tecidual no grupo com evento tromboembólico foi significativamente aumentado em comparação ao grupo de câncer sem evento ( $p = 0,03$ ).

Como já relatado, a composição e a função das MPs vão ser determinadas pelo tipo celular e seu estado no momento da liberação. Nesse sentido, uma subpopulação de MPs pode ter um papel anticoagulante. Explorando essa possibilidade, Aharon et al (23) avaliaram MPs presentes em 4

grupos: (1) gestantes saudáveis (2) gestantes com complicações vasculares sem uso de heparina (3) gestantes com complicações vasculares usando heparina de baixo peso molecular (4) não gestantes. MPs marcadas para o Inibidor do Fator Tecidual foram significativamente diminuídas em todos os grupos de gestantes, se comparadas as não gestantes. Logo, os autores postularam que essa menor circulação de MPs contendo um fator anticoagulante pode estar relacionada ao estado pró-trombótico observado na gravidez. Também foi demonstrado aumento significativo das MPs contendo o inibidor do fator tecidual no grupo de gestantes tratadas com heparina, quando comparado ao grupo de gestantes com complicações vasculares sem uso de heparina, demonstrando uma influência do tratamento sobre o perfil das MPs.

Um efeito final anticoagulante também foi encontrado na trabalho de Berckmans et al (15). Foram analisados 15 indivíduos saudáveis. Primeiramente se demonstrou que o plasma livre de MPs (submetido a centrifugação em alta velocidade) perdeu a capacidade de formação de trombina *in vitro* - o que foi revertido com a reintrodução das MPs. Em seguida, demonstrou-se de maneira intrigante que a capacidade de formação de trombina teve uma relação inversa com o número total de MPs. A explicação dos autores foi a de que, nos indivíduos saudáveis, pequenas quantidades de trombina geradas pelas MPs teriam um efeito final anticoagulante devido a sua propriedade de ativação da proteína C (que por sua vez vai levar a inativação do fator Va).

### 3.3.5 Papel das micropartículas na reprogramação e comunicação intercelular

Os mecanismos pelos quais as MPs efetuam comunicação e reprogramação celular são variados. Receptores e ligantes expostos na membrana celular das MPs podem interagir com células próximas, iniciando cascatas de sinalização intracelular. Pode ocorrer a transferência de receptores das MP para as células, mudando o fenótipo celular. Também já foi demonstrado que MPs podem transferir o receptor CCR5 para células, tornando essas susceptíveis a infecção pelo HIV (86). A internalização das MPs pode ocorrer por fagocitose ou fusão das membranas celulares (passo esse limitado pelo pH) (14).

Mecanismo intrigante de comunicação e reprogramação celular se dá pela transferência de RNA via MPs. RNA extracelular existe em diferentes formas. Ele pode ser encontrado em complexos proteicos, de forma livre circulante ou transportado (e “protegido” do meio extracelular) através de vesículas extracelulares (incluindo as MPs). Esse RNA inclui micro RNA (miRNA) e

RNA mensageiro (RNAm). Enquanto o RNAm celular varia de 400 a 12.000 nucleotídeos, RNA isolado em vesículas extracelulares têm predominantemente < 700 nucleotídeos (14). Juntamente com outras moléculas contidas nas MPs, esse RNA pode participar em processos de reprogramação celular e servirem como “assinaturas moleculares de doenças” (87).

Em contraste ao RNA, o estudo do DNA nas vesículas extracelulares é menos explorado. Já foi demonstrado que células tumorais liberam MPs contêm DNA, que refletem o status genético do tumor, incluindo amplificação de oncogenes. Isso demonstra o potencial dessas vesículas como biomarcadores, porém seu significado fisiológico ainda é pouco estudado (14).

### 3.3.6 Papel das micropartículas na reposta imune

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa dos vertebrados contra infecção. MPs têm sido demonstradas como mensageiras parácrinas nesse processo. Em sua maioria, os trabalhos atribuem às MPs propriedades de mediadores pró-inflamatórios (14). MPs derivadas de macrófagos ativados são capazes de transportar interleucinas (incluindo IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ) e ligantes endógenos pró-inflamatórios. Sarkar et al (88) demonstraram que MPs liberadas por monócitos ativados por endotoxina, contendo caspase-1, foram capazes de induzir apoptose em células musculares lisas. Também foi demonstrado que MPs liberadas por macrófagos foram capazes de induzir a diferenciação de monócitos através da transferência de RNA (89).

Walters et al (90) demonstram que macrófagos expostos a MPs derivadas de macrófagos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* secretaram citocinas pró-inflamatórias que levaram ao recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. A resposta evocada foi capaz de levar a perda da integridade da camada celular epitelial respiratória – o que também envolve as MPs no processo de dano tecidual.

Neutrófilos polimorfonucleares são o tipo celular mais abundante envolvido na reposta imune inata. Timár et al (91) avaliaram MPs liberadas por neutrófilos em indivíduos saudáveis e em indivíduos com bacteremia por *S aureus*, demonstrando (1) a existência de MPs derivadas de neutrófilos em indivíduos saudáveis (2) aumento de aproximadamente 7 vezes do número de MPs derivadas de neutrófilos em indivíduos com bacteremia por *S aureus*, quando comparados à aqueles saudáveis (3) diferentes composições e propriedades biológicas das MPs liberadas por neutrófilos,

de acordo com tipo de estímulo ao qual a célula foi submetida. De forma inédita, demonstraram que neutrófilos estimulados foram capazes de liberar MPs com propriedades bacteriostáticas.

Gasser et al (92) estudaram a influência das MPs derivadas de neutrófilos no balanço entre atividade pró e anti-inflamatória que compõem a resposta imune. Demonstraram que MPs liberadas por neutrófilos foram capazes de liberar TGF $\beta$ 1 (citocina anti-inflamatória) de uma maneira dose-dependente em macrófagos, assim como levaram a uma menor produção das citocinas inflamatórias IL-8, IL-6, e TNF- $\alpha$ .

Células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, desempenham função fundamental na imunidade adquirida. Já foi demonstrado papel das vesículas extracelulares nesse processo. MPs liberadas por um grupo celular podem conter antígenos do microrganismo infectante. Essas MPs, por sua vez, irão entrar em contato com células apresentadoras de antígenos (14).

MPs englobadas por células apresentadoras de antígenos podem ter efeito inibitório ou de estimulação. Já foi demonstrado que vesículas extracelulares liberadas por células dendríticas infectadas por *Toxoplasma gondii*, quando injetadas em animais não expostos, foram transportadas até o baço, sendo capazes de gerar resposta Th1 protetora (93). Participação das MPs no escape imune do *Trypanosoma cruzi* também foi demonstrado em estudo de Cestari et al (94). Esse trabalho demonstrou que (1) MPs liberadas por linfócitos e monócitos contêm TGF- $\beta$ , citocina implicada na facilitação da invasão de células epiteliais e cardíacas pelo *T cruzi* (2) MPs liberadas por células sanguíneas contribuíram para inibição da lise mediada pelo sistema do complemento, logo contribuindo para sobrevivência do parasita.

Pelo mesmo princípio, MPs liberadas por células tumorais podem tanto potencializar uma resposta imune anti-tumoral ou inibirem essa resposta, através da modulação da ativação das células T e das células apresentadoras de antígenos. Além de capturarem e serem moduladas pelas vesículas extracelulares, as células apresentadoras de antígenos também podem liberar as mesmas. Essa liberação de vesículas extracelulares contendo MHC (do inglês, major histocompatibility complex) classes I e II (além de moléculas estimulatórias) se constituem em uma maneira de se amplificar a apresentação de antígenos (14).

### 3.3.7 Quantificação das micropartículas em indivíduos saudáveis e em condições mórbidas

Berckmans et al (15) quantificaram e estudaram a origem das MPs em 15 pacientes saudáveis, chegando aos seguintes achados: MPs derivadas de plaquetas 237 contagens/ $\mu\text{L}$  (mediana; limites 116-565), hemácias 28 contagens/ $\mu\text{L}$ (13-46), granulócitos 46 contagens / $\mu\text{L}$  (16-94) e células endoteliais 64 contagens/ $\mu\text{L}$  (16-136). Tal estudo demonstrou que mesmo indivíduos saudáveis tem níveis significativos de MPs detectáveis, sendo a maior parte delas de origem plaquetária.

Não existem valores de referência quanto ao número de MPs e sua origem no plasma de indivíduos saudáveis. A comparação do número absoluto das mesmas em diferentes estudos mostra valores que variam até 10.000 vezes (tabela 1). Por exemplo, o número de MPs liberadas por plaquetas nos controles saudáveis varia de 41 contagens por  $\mu\text{L}$  a até 420.000 contagens por  $\mu\text{L}$ . Os motivos que explicam tamanha variação serão abordados em tópico dedicado, mas se explicam por diferentes fatores pré-analíticos (protocolos de centrifugação e processamento das amostras) e analíticos (configurações e capacidade de detecção do citômetro).

**Tabela 1:** Comparação do número absoluto de micropartículas, de acordo com tipo celular, encontrado no grupo de controle saudável em diferentes estudos.

Estudo	Nº saudáveis	Janela detecção ( $\mu$ )	Plaquetas (n/ $\mu\text{L}$ )	Endotélio (n/ $\mu\text{L}$ )	Eritrócito (n/ $\mu\text{L}$ )	Neutrófilo (n/ $\mu\text{L}$ )	Linfócito (n/ $\mu\text{L}$ )	Monócito (n/ $\mu\text{L}$ )
Soriano et al	45	NI	4638	234	NA	NA	NA	NA
Souza et al	15	0,7 a 0,9	NI	10	NA	NA	NA	NA
Zhang et al	10	NI	1528	219	87	260	43	NA
Berckmans et al	15	NI	237	64	28	46	ND	NA
Giannopoulos et al	50	0,5 a 0,9	14.372	NA	18.198	NA	NA	NA
Kim et al	29	NI	420x10 <sup>3</sup>	NA	NA	NA	NA	NA
Marques et al	29	0,70 a 0,9	60	8	3	3	0,7	NA
Matsumoto et al	23	0,1 a 2	NA	NA	NA	NA	NA	5
Nieuwland et al	5	NI	41	18	NA	1.3	NA	7
Forest et al	26	0,1 a 1	179	374	290	NA	NA	NA

NA: não avaliado; NI: não informado; ND não detectadas; Valores em mediana. n/ $\mu\text{L}$  = contagens por microlitro

Além de sua já estudada relação com eventos tromboembólicos, a quantificação das MPs já foi estudada em diferentes neoplasias, mostrando relação com o grau de estadiamento da doença e sendo um marcador de doença metastática. Como exemplo, em pacientes com câncer gástrico, MPs derivadas de plaquetas foram significativamente aumentadas no estágio IV ( $7.160 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; mediana) quando comparadas ao estágio I ( $760 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) ou ao estágios II/III ( $870 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) (95).

Nesse mesmo trabalho, um valor de corte das MPs derivadas de plaquetas de  $2700 \times 10^3/\mu\text{L}$  teve uma sensibilidade de 93% e especificidade de 91% para doença metastática no câncer gástrico.

O número e origem das MPs também foram estudadas na malária por *Plasmodium vivax* (96). Nesse trabalho com 37 doentes, demonstrou-se as plaquetas, eritrócitos e leucócitos foram as principais fontes das MPs circulantes nos indivíduos infectados. Todas essas foram significativamente aumentadas, quando comparadas à indivíduos saudáveis. Houve associação significativa entre maior número de MPs derivadas de plaquetas com febre e com sintomas prolongados.

### 3.3.8 Micropartículas na endocardite infecciosa

Complexos processos participam da patogênese da EI: formação de um trombo estéril em uma área de endotélio lesado, adesão e multiplicação do microrganismo infectante, aumento do coágulo infectado, interação patógeno-hospedeiro. A partir desses ocorrerá a determinação da expressão fenotípica da doença e também de seus desfechos clínicos mais graves: infecção não controlada, insuficiência cardíaca refratária, AVC, sepse com disfunção múltipla de órgãos e morte.

Nos processos e desfechos acima retomados, estão envolvidos a montagem de uma resposta imune e inflamatória (e toda comunicação intercelular complexa que regem esses processos), coagulação, ativação celular e reparação tecidual. Como abordado anteriormente, trabalhos demonstraram a participação das MPs nesses processos. Logo, é de esperar que as MPs tenham participação na fisiopatologia da EI.

Entretanto, realizando-se pesquisa abrangente nas principais bases da literatura científica, conclui-se que o estudo das MPs na EI é um tema minimamente estudado. Busca na base MEDLINE, utilizando-se como descritores os termos “endocarditis”, “endocarditis, bacterial”, associados as palavras chaves “infectious endocarditis”, “bacterial endocarditis”, “bacterial endocarditides” ou “endocarditis” encontrou 35.595 artigos, considerando-se busca realizada em 03/05/2017. Tal número demonstra a extensão da literatura no universo da EI.

Utilizando-se dessa mesma base, a pesquisa pelos descritores “extracellular vesicles” e “cell-derived microparticles” associados as palavras chaves “extracellular vesicles”, “cell-derived microparticles”, “microparticle”, “cell derived microparticles” ou “microparticles”, chegou a um total de 17.035 trabalhos.

Realizando-se um cruzamento desses dois resultados, ou seja, a busca da interseção no universo da literatura da EI e das MPs, o resultado é mínimo: limitou-se a dois artigos (considerando data acima citada). Resultado semelhante foi encontrado utilizando-se tal busca na base LILACS (busca resultou em 1 artigo, já incluído nos resultados da base MEDLINE).

O primeiro artigo, de 2003 (97), contém os termos “endocarditis” e “cell-derived microparticles” em seu resumo, e por isso é encontrado na busca. Porém tal trabalho trata do papel do fator tecidual na patogênese de doenças infecciosas, incluindo a EI. Trata-se de uma revisão, sem qualquer quantificação das MPs ou sua descrição no contexto da EI.

O segundo artigo, de 2013 (98), estudou a liberação de leucotrieno B4, TGF-beta1 (do inglês, transforming growth factor-beta1) e MPs na valvopatia aórtica. Cento e cinco pacientes com doença valvar aórtica que necessitaram de troca valvar tiveram suas valvas incubadas por 24h em meio de cultura, com posterior análise do sobrenadante. Neste sobrenadante, foram analisadas os biomarcadores já mencionados, incluindo as MPs. Buscou-se comparar as concentrações desses marcadores de acordo com diferentes condições que motivaram a cirurgia: valva aórtica bicúspide, valvopatia reumática, regurgitação aórtica e entre esses alguns casos de cirurgia por endocardite. Encontrou-se que, na análise do meio cultura valvar, não houve diferença no número de MPs liberadas de acordo com a condição valvar que motivou cirurgia.

Conclui-se então, pelo melhor do nosso conhecimento, que até a data de 03/05/2017, nenhum trabalho publicado nas bases MEDLINE e LILACS estudou a quantificação sérica das MPs na EI, sua evolução no decorrer do tratamento e sua relação com desfechos clínicos. Dessa maneira, demonstra-se a originalidade do trabalho e a lacuna no conhecimento atualmente existente, considerando-se o estudo das MPs no contexto da EI.

### 3.3.9 O estudo das micropartículas na sepse

Pacientes com EI podem evoluir com sepse e suas complicações. A progressão da sepse para o choque séptico e disfunção múltipla de órgãos é uma das principais causas de morte nos pacientes com EI. Logo, aqui vale uma breve menção ao estudo das MPs na sepse.

O estudo das MPs na sepse é desafiador, e ainda repleto de lacunas. Primeiramente, porque a sepse é uma desordem que envolve complexas interações entre células endoteliais, plaquetas, leucócitos, sistema de coagulação e múltiplos mediadores inflamatórios. Na sepse, a resposta

inflamatória tem papel crítico na gênese da disfunção orgânica, mas também é um componente essencial da defesa do hospedeiro contra o microrganismo invasor. A teoria, até recentemente dominante, de que a mortalidade na sepse é decorrente de uma resposta inflamatória exagerada e não controlada tem sido questionada. Isso porque uma diminuição da resposta inflamatória tem sido implicada em maior mortalidade (99).

Apesar de a maior parte dos trabalhos sobre o papel das MPs na sepse sugerirem um efeito deletério, MPs também estão implicadas em respostas protetoras. Tal fato pode ser atribuído à enorme diversidade constitucional das MPs, que vai depender da célula geradora e de seu estado basal.

Em modelos de camundongos para sepse, a maioria das MPs encontrada (85%) são derivadas de plaquetas, com uma minoria se originando de células endoteliais e monócitos. Um pequeno número contém marcadores para eritrócitos (17). Mortaza et al (100) avaliaram, em modelo de sepse animal, o perfil e a influência da MPs sobre variáveis hemodinâmicas. Para isso, animais saudáveis foram submetidos a inoculação de MPs derivadas de animais submetidos a ligadura cecal (modelo de sepse) e controles. Não encontrou diferença na concentração sérica total das MPs nos animais sépticos, porém nesses o perfil da liberação das MPs foi diferente: houve grande aumento das MPs derivadas de leucócitos. Apenas as MPs derivadas de animais sépticos foram capazes de diminuir a pressão arterial média ( $p < 0,05$ ). Animais inoculados com MPs derivadas de animais sépticos apresentaram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, NF-Kb e aumento da produção de óxido nítrico via NO sintase.

Também por meio de modelo animal, Zafrani et al (17) pesquisaram os níveis, e os fatores determinantes da liberação das MPs na sepse, assim como sua relação com mortalidade. No estudo, camundongos transgênicos com alta expressão de calpastatinas e camundongos selvagens foram submetidos a ligadura cecal (modelo animal para estudo da sepse). A alta expressão de calpastatinas nos animais transgênicos levou à inibição das calpaínas, e logo, diminuição da liberação de MPs. Como esperado, houve significativa redução das MPs circulantes nos animais transgênicos, quando comparados aos animais selvagens ( $1 \times 10^3$  vs.  $3 \times 10^3$  contagens/ $\mu$ l). Essa restrição dos níveis de MPs se traduziu numa menor geração de trombina, maiores valores de plaquetas, menor consumo de fatores de coagulação (II, VIII, VIII, IX) e menores valores de RNI e PTTa nos camundongos transgênicos. De maneira interessante a análise histológica demonstrou maior ocorrência de trombo e deposição de fibrina nos animais selvagens, o que se traduziu por

maior ocorrência de disfunção múltipla de órgãos nos animais que tiveram a liberação de MPs preservadas. Lâminas histológicas comparativas demonstram de maneira clara a maior ocorrência de lesão pulmonar aguda, hepática e renal nesses animais (quando comparados aos animais transgênicos, que tiveram seu mecanismo de liberação das MPs afetado).

Somados, esses dados corroboram menor ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CIVD) nos animais que tiveram menor liberação de MPs. Tais achados se refletiram em menor taxa de mortalidade: a sobrevivência no sétimo dia para os animais transgênicos foi significativamente mais alta, quando comparada àquela dos animais selvagens – 50% vs 16%. Essa diferença de mortalidade não foi observada quando camundongos transgênicos foram submetidos a injeção de MPs derivadas de camundongos selvagens.

Estudo de Densmore et al (101) avaliaram o papel das MPs na lesão pulmonar aguda induzida pela sepse. Esse estudo avaliou o papel das MPs derivadas de endotélio, através de seus efeitos sobre culturas de células endoteliais humanas e análise de pulmão de camundongos que foram submetidos a injeção dessas MPs. Foi demonstrado que as MPs derivadas do endotélio levaram a diminuição da vasodilatação pulmonar (através da menor produção de óxido nítrico), aumento da permeabilidade capilar pulmonar e aumento da resposta inflamatória pulmonar.

Somados, esses estudos em modelos animais demonstram o papel das MPs nos principais mecanismos fisiopatológicos na sepse: vasodilatação, trombose e CIVD, produção de espécies reativas de oxigênio, lesão pulmonar, hepática e renal aguda. Tais fatos levaram ao estudo das MPs em pacientes com sepse e choque séptico.

Soriano et al (102) avaliaram 35 pacientes com sepse grave, 10 internados em unidade de terapia intensiva. Foram mensuradas MPs originadas de plaquetas e endotélio. Níveis de MPs derivadas do endotélio foram significativamente elevadas nos pacientes sobreviventes, comparados àqueles que faleceram por sepse. Os níveis de MPs de origem plaquetária tiveram forte correlação negativa com disfunção orgânica, medida pelo score SOFA, ou seja – menores níveis indicando maior morbidade ( $p=0,002$ ).

Em seu trabalho, Mostefai et al (103) tiveram como objetivo isolar e caracterizar as MPs circulantes em pacientes com choque séptico, assim como avaliar seu efeito na reatividade vascular e na produção de óxido nítrico (NO). Para isso, eles estudaram 36 pacientes com choque séptico e 18 pacientes sem infecção e hemodinamicamente estáveis internados em UTI. Foi demonstrado que pacientes com choque séptico apresentaram aumento das MPs circulantes, especialmente

daquelas originadas de plaquetas e células endoteliais, quando comparados ao grupo controle. MPs derivadas de leucócitos estavam diminuídas em pacientes com choque séptico.

Zhang et al (75) estudaram o perfil das MPs de 15 pacientes com sepse admitidos também em UTI, tendo como controle 10 pacientes saudáveis. Comparados com os controles saudáveis, os pacientes sépticos apresentaram aumento das MPs derivadas de plaquetas em unidades por  $\mu\text{L}$  ( $2.273 \pm 421,7$  vs.  $1.528 \pm 225,4$ ), células endoteliais ( $336 \pm 72,4$  vs.  $219 \pm 45,6$ ), hemácias ( $255 \pm 62,9$  vs.  $87 \pm 14,8$ ), neutrófilos ( $530 \pm 124,5$  vs.  $266 \pm 72,3$ ), linfócitos T ( $102 \pm 12,3$  vs.  $56 \pm 7,8$ ), linfócitos B ( $87 \pm 8,1$  vs.  $43 \pm 7,3$ ). De modo interessante, todas as MPs contendo fosfatidilserina também foram quantificadas. Estas se mostraram significativamente aumentadas nos pacientes com sepse ( $4.830 \pm 653,8$  vs.  $2.861,3 \pm 236,9$ ,  $p < 0,001$ ). Além desse aumento numérico, o estudo também comprovou a importância fisiológica desse aumento da expressão de fosfatidilserina. Foi demonstrado que as MPs de pacientes sépticos atuaram como uma superfície biológica para atividade dos fatores de coagulação, muito provavelmente por meio da exposição da fosfatidilserina. Assim, o aumento da exposição de fosfatidilserina pelas MPs pode propagar fenômenos trombóticos e causar obstrução microvascular, fenômenos patológicos centrais na sepse.

Delabranche et al (18) avaliaram 92 pacientes internados com choque séptico e estudou nestes, a ocorrência da CIVD e o perfil das MPs. MPs foram medidas à admissão (D1) e em D2, D3 e D6. Foram incluídos 40 pacientes com CIVD e 52 pacientes com choque séptico, porém sem critérios para CIVD. MPs foram mensuradas por ensaio de coagulação (resultados expressos por equivalente nanomolar de fosfatidilserina – nM eq. Fosf). Não houve uma diferença na quantificação total das MPs, comparando-se os pacientes com choque séptico que preenchiam ou não critérios para CIVD. Porém, comparados aos pacientes sem CIVD, aqueles com CIVD tiveram um diferente padrão de liberação das MPs: à admissão, MPs derivadas de leucócitos foram significativamente aumentadas nos pacientes com CIVD ( $9,2 \pm 8,7$  vs.  $4,5 \pm 2,8$  nM eq. Fosf  $p = 0,02$ ), apesar de o número total dos leucócitos ser semelhantes nos dois grupos. MPs derivadas do endotélio (positivas para CD105) também foram significativamente aumentadas nos pacientes com CIVD ( $p < 0,001$ ).

Matsumoto et al (104) estudaram o papel das MPs liberadas por monócitos em 24 pacientes com trauma e 25 pacientes com sepse grave. O controle foi composto por 23 controles saudáveis. Foi demonstrado que o número de MPs liberadas por monócitos foi significativamente aumentada

no grupo de trauma ou sepse, quando comparado ao controle saudável. Houve correlação entre liberação aumentada de MPs derivadas de monócitos e maior gravidade na sepse e trauma, além da relação dos níveis dessas MPs com IL-6.

Tóké-Füzesi et al (105) avaliaram MPs liberadas por plaquetas e monócitos em 37 pacientes com sepse grave. Encontrou número significativamente aumentado das MPs derivadas de plaquetas em relação aos controles doentes. Não houve correlação entre o número total de MPs e a presença de disfunção orgânica, porém uma correlação negativa entre os níveis de MPs derivadas de plaquetas e valores de uréia e creatinina.

Estudo de Forest et al (106) avaliou a presença de MPs em pacientes idoso e saudáveis, comparando seu número e origem em pacientes saudáveis e com sepse. No grupo de jovens (média 36 anos) foram incluídos 26 controles saudáveis e 27 com sepse. No grupo de idosos (média 88 anos), foram incluídos 31 saudáveis e 27 pacientes com sepse. Comparando-se idosos e jovens sem infecção, houve uma diminuição significativa do número de MPs derivadas do endotélio, sem diferença significativa observada para as MPs liberadas por plaquetas e eritrócitos. Comparando-se jovens com e sem sepse, houve uma diminuição significativa no número de MPs liberadas pelo endotélio nesse último grupo. No grupo de idosos, não houve uma diferença significativa nos números de MPs liberadas pelos eritrócitos, plaquetas ou endotélio, comparando-se idosos admitidos em um hospital com ou sem infecção. Comparando-se níveis de MP e mortalidade, no grupo de idosos, houve correlação entre maior número de MPs derivadas de endotélio e mortalidade ( $p = 0,04$ ).

Na sepse, um terço dos óbitos ocorrem na primeira semana do desenvolvimento da doença – durante a fase de maior resposta inflamatória. Logo, a maioria das mortes ocorre em um momento posterior, onde se postula que uma fase de imunossupressão, que dura semanas, pode levar a um estado de maior susceptibilidade a infecções secundárias. (16) MPs podem estar implicadas nesse estado de imunossupressão. Sadallah et al (107) demonstraram que MPs derivadas de concentrados de plaquetas humanos reduziram a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-10 por macrófagos ativados por LPS. Além disso, MPs atenuaram a diferenciação de monócitos em células dendríticas imaturas, e foram capazes de diminuir a capacidade fagocítica dessas últimas.

Estudo de Dalli et al (108) demonstrou que MPs derivadas de polimorfonucleares são ricas em anexina I, uma proteína com propriedade anti-inflamatórias. Nesse trabalho, demonstrou-se

que a anexina I presente nas MPs liberadas pelos leucócitos são capazes de inibir a adesão celular dos polimornucleares, diminuindo sua migração e logo alterado seu recrutamento.

Esse efeito de imunomodulação também foi relacionado a maior ocorrência de eventos adversos em pacientes submetidos a transfusão de concentrado de hemácias. Metanálise (109) de estudos que envolveram 8735 pacientes, encontrou que pacientes submetidos a uma estratégia mais restrita de transfusão de concentrado de hemácias, quando comparada a uma estratégia mais liberal, tiveram menor risco de complicações infecciosas sérias (definidas como pneumonia, sepse, infecção de ferida e mediastinite). Uma possível explicação para tal achado pode ser o efeito imunossupressor de MPs presentes nos concentrados de hemácias, uma associação que merece melhor investigação (16)

A despeito desses efeitos deletérios, as MPs também têm sido implicadas em respostas protetoras. Células endoteliais progenitoras (CEPs), são precursores liberados pela medula óssea em condições adversas, estando envolvidas na regeneração tecidual. Seus efeitos benéficos foram estudados em isquemia de membros, infarto do miocárdio e doença glomerular (110). Esse mecanismo de proteção é realizado por efeito parácrino, dos quais participam as MPs. Deregibus et al (111) demonstraram que MPs liberadas pelas CEPs foram incorporadas por células endoteliais (através da interação com integrinas expressas na membrana celular das MPs). *In vitro*, as MPs promoveram a sobrevivência de células endoteliais, assim como sua proliferação e organização em capilares, efeito também demonstrado em modelo animal. Esse efeito angiogênico foi perdido quando as MPs foram tratadas com enzima que degradou RNA (RNAase). Logo, os autores concluíram de as MPs participaram desse processo de angiogênese através da transferência de RNA mensageiro (RMAm) das CEPs para as células endoteliais.

Explorando esse papel das MPs na comunicação intercelular, Cantaluppi et al (110) estudaram, em modelo animal, potencial efeito protetor das MPs derivadas de CEPs na injúria renal aguda. Demonstrou-se que o conteúdo de RNAm dessa MPs era rico em microRNA (miRNAs) que modulavam proliferação, angiogênese e apoptose. Após sua injeção em animais submetidos a injúria renal por isquemia e reperfusão, as MPs foram demonstradas no interior das células endoteliais de grandes vasos e dos capilares peritubulares, assim como de células tubulares. De maneira interessante, a hipóxia aumentou de maneira significativa a internalização das MPs. Quando tratados com MPs derivados de CEPs, os camundongos demonstraram uma redução significativa nas lesões tubulares, em paralelo com uma diminuição da creatinina e da uréia,

observadas no segundo dia. Tal efeito não foi observado quando as MPs inoculadas foram de fibroblastos ou quando as MPs derivadas de CEPs foram incubadas com RNAase (demonstrando o papel da transferência de RNA específicos nesse processo).

Concluindo, o papel das MPs na sepse é diverso, refletindo o tipo celular estudado e a condição do paciente. As funções atribuídas as MPs de diferentes tipos celulares são várias, e estão resumidas no quadro 3. Assim como ocorre na comparação entre grupos de controles saudáveis, uma comparação direta entre os valores de MPs observados nos estudos de sepse grave ou em outras condições mostram número muito discrepantes (Tabela 2). Como exemplo, o número de MPs liberadas por plaquetas varia de 95 contagens/ $\mu\text{L}$  a 5273 contagens/ $\mu\text{L}$ . Tamaña variação é explicada por fatores pré-analíticos e analíticos, como diferentes protocolos de processamento das amostras e diferentes parâmetros utilizados nos citômetros. Esses fatores serão abordados com mais detalhes em sessão dedicada.

Quadro 5: Funções atribuídas as micropartículas e os marcadores utilizados

<b>Célula de origem da micropartícula</b>	<b>Função</b>	<b>Marcadores de membrana utilizados</b>
<b>Plaquetas</b>	Aumento da agregação plaquetária Entrega de ácido araquidônico a células endoteliais (levando a formação de tromboxano A2) Atração quimiotática de monócitos Aumento da agregação de neutrófilos Aumento da atividade fagocítica de neutrófilos Formação de Trombina Promoção de interação celular de monócitos e células endoteliais Transporte de PAF (Fator ativação plaquetária)	CD31, CD41, CD41a, CD42a, CD42b, CD61, CD62P
<b>Células Endoteliais</b>	Ativação de neutrófilos Transporte de moléculas de adesão como ICAM-1, E-selectina e moléculas de adesão de plaquetas-endotélio Atração quimiotática de neutrófilos Agregação plaquetária via expressão de fator de von Willebrand Formação de trombina Estimulação da proliferação de células endoteliais e indução de angiogênese Transporte de proteína C ativada Transporte de metaloproteínas que participam da neoformação vascular	CD31, CD34, CD54, CD62E, CD51, CD105, CD106, CD144, CD146
<b>Neutrófilos Polimorfonucleares</b>	Ativação de células endoteliais in vitro, levando a liberação de IL-6 e IL-8 Atração quimiotática de neutrófilos Aumento da expressão de moléculas de adesão leucócitos-células endoteliais Liberação de mediadores anti-inflamatórios, como TFG- $\beta$ 1 e inibição de IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$	CD45
<b>Linfócitos</b>	Participação das vias de formação de NO e prostaciclina, levando a um decréscimo na expressão endotelial de NO sintase 3 (constitutiva).	CD4, CD8, CD20, CD3

	Hiporeatividade vascular através da produção de NO e prostaciclina Aumento da expressão de NO sintase 2 (induzível) e de COX-2 Aumento do estresse oxidativo em células endoteliais	
<b>Monócitos</b>	Ativação plaquetária Transferência de receptores entre células (ex. CCR5) Aumento de fatores inflamatórios (IL-8) e de ICAM-1 em células epiteliais respiratórias Aumento da produção de radicais livres de oxigênio, citocinas e ativação de NFκβ em monócitos	CD14
<b>Eritrócitos</b>	Promoção de adesão entre monócitos e células endoteliais	CD235a

Adaptado de Reid VL, Webster NR. Role of microparticles in sepsis. BJA: British Journal of Anaesthesia. 2012;109(4):503-13.

**Tabela 2:** Comparação do número absoluto de micropartículas, de acordo com o tipo celular, encontrado em sepse grave e outras condições, em diferentes estudos.

Estudo	Patologia	Nº doentes	Plaqueta (n/μL)	Endotélio (n/μL)	Eritrócito (n/μL)	Neutrófilo (n/μL)	Linfócito (n/μL)	Monócito (n/μL)
Soriano et al	Sepse grave	35	5273	724	NA	NA	NA	NA
Souza	Malária	37	34	36	NA	NA	NA	NA
Zhang et al	Sepse grave	15	2273	336	255	530	87	NA
Marques et al	Pré-eclampsia severa	28	30	36	12	9	1	NA
Matsumoto et al	Sepse grave	25	NA	NA	NA	NA	NA	10
Nieuwland et al	Sepse por meningococo	7	597	61	NA	234	NA	15
M. Tőkés-Füzesi et al	Sepse Grave	37	4500	NA	NA	NA	NA	NA
Forest et al	Jovens com sepse grave	27	95	222	349	NA	NA	NA
Nieuwland et al	Cirurgia cardíaca	6	1600	NA	NA	NA	NA	NA

NA: não avaliado; valores em medianas; n/μL = contagens por microlitro

### 3.3.10 Micropartículas na cirurgia cardíaca

Na América Latina, a proporção de pacientes com EI que são submetidos a cirurgia cardíaca é de 41% (26). Cirurgia cardíaca com by-pass cardiopulmonar é sabidamente reconhecida por sua capacidade de alterar estado fisiológico, através da indução de uma reposta inflamatória - via liberação de interleucinas e reagentes de fase aguda. Logo, é de se supor que a cirurgia cardíaca altere o perfil das MPs. Pelo melhor de nosso conhecimento, não existem estudos que avaliaram a quantificação e caracterização sérica das MPs em pacientes com EI que foram submetidos a

cirurgia cardíaca. Logo, as melhores evidências da influência da cirurgia cardíaca nas MPs virão de trabalhos que estudaram essas vesículas em outras indicações cirúrgicas.

Antes da avaliação dos estudos das MPs na cirurgia cardíaca, é importante ter em mente sua cinética de depuração e o momento em que foi realizada a análise – se durante ou após o procedimento. Como já abordado em sessão prévia, os poucos trabalhos disponíveis demonstraram uma rápida eliminação das MPs - com meia-vida variando de minutos a 6 horas. Logo, é provável que as alterações agudas decorrentes do by-pass cardiopulmonar não sejam percebidas em avaliações tardias (mais de 24h).

Entre os fatores que podem influenciar o perfil das MPs durante a cirurgia cardíaca, estão: (1) grau do dano tecidual provocado pelo procedimento cirúrgico (2) by-pass cardiopulmonar e sua duração (3) diminuição da contagem plaquetária (4) hemodiluição (5) tipo de tratamento dado ao sangue contido no saco pericárdico e sua reintrodução na circulação sistêmica (6) grau hipotermia induzida pela cirurgia (7) drogas utilizadas no pré, intra e no pós-operatório (112).

Andersen et al (113), estudaram 34 pacientes que se submeterem a cirurgia de revascularização miocárdica. Demonstram que, durante o *by-pass* cardiopulmonar, houve um incremento de 40% no valor das MPs em 30 minutos. Tal resultado contrasta com o encontrado por Jeanette et al, que avaliaram 71 pacientes também submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica. Nesse estudo, houve uma diminuição da contagem das MPs derivadas de plaquetas em 30 minutos após início do *by-pass* cardiopulmonar. A comparação direta desses trabalhos é limitada por diferentes metodologias, e pela não reintrodução na circulação do sangue aspirado do saco pericárdico nesse último estudo (como será descrito abaixo, um fluido rico em MPs).

Nieuwland et al (114) estudaram seis pacientes que foram submetidos a revascularização miocárdica cirúrgica. Foram coletadas amostras sanguíneas derivadas de punção venosa (circulação sistêmica) e sangue presente no saco pericárdico durante o procedimento cirúrgico. A quantificação das MPs derivadas de plaquetas foi de  $14.800/\mu\text{L}$  (mediana, intervalo 9,7 a  $27,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) nas amostras derivadas de pericárdio e de  $1.600/\mu\text{L}$  (mediana, intervalo 400 a  $8900/\mu\text{L}$ ) nas amostras derivadas de punção sistêmica. Em contraste com as MPs presentes nas amostras da circulação sistêmica – que eram quase exclusivamente derivadas de plaquetas –, as amostras de sangue recolhido do pericárdio também tinham origem de eritrócitos, monócitos e de granulócitos. Plasma preparado de amostras de origem pericárdica, e em menor grau, de origem sistêmica estimularam a formação de trombina *in vitro*. Tal capacidade foi perdida após a remoção das MPs por

centrifugação. Tal estudo demonstrou não somente a capacidade procoagulante das MPs geradas nos pacientes submetidos a cirurgia cardíaca, mas também demonstrou ocorrência de intenso estímulo a liberação de MPs no sangue que fica em contato com pericárdico, durante o procedimento.

Comumente, há significativa diminuição, de 20 a 40%, do número de plaquetas após cirurgia cardíaca (112). Logo, é provável que a queda na contagem plaquetária leve a alteração do perfil de MPs circulantes. Straub et al (115) demonstram que, temperaturas abaixo de 31 graus, induzidas durante cirurgia cardíaca foram associadas a uma diminuição da função plaquetária e menor formação de MPs derivadas de plaquetas, levando a uma maior tendência de sangramento.

A infusão de cristaloides durante e após cirurgia cardíaca leva a hemodiluição. Hemodiluição reduz a viscosidade sanguínea, potencialmente permitindo um fluxo sanguíneo mais rápido, e logo uma maior força de cisalhamento. Não há estudos sobre a influência da hemodiluição na liberação das MPs. Do mesmo modo, não há estudos sobre a influência da heparina usada durante a circulação extracorpórea sobre a liberação das MPs, assim como de outras drogas habitualmente usadas no intra e no pós-operatório.

Finalmente, Fu et al (116) quantificaram as MPs no pré o pós-operatório de 42 pacientes com doença valvar cardíaca que seriam submetidos a cirurgia cardíaca. Também avaliaram o efeito dessas MPs sobre a vasodilatação. Demonstraram que, antes da cirurgia, a contagem de MPs total foi significativamente maior nos pacientes com doença valvar, quando comparados ao grupo de controle saudável (com mesma idade e sexo). Não houve diferença significativa na contagem total das MPs, comparando-se os valores pré-cirurgia com os de 12 ou 72 horas após procedimento. MPs derivadas dos pacientes com doença valvar cardíaca provocaram uma acentuada diminuição da vasodilatação endotélio-dependente mediada por acetilcolina – com efeito ainda maior quando se comparou as MPs pós-cirurgia com aquelas anteriores ao procedimento. Tal efeito foi mediado por uma menor produção de NO e maior liberação de espécies reativas de oxigênio.

### 3.4 MÉTODOS APLICADOS NO ESTUDO DAS MICROPARTÍCULAS

Várias técnicas foram empregadas na caracterização e quantificação das MPs. Seu tamanho na ordem dos micrômetros torna essa quantificação um desafio. Idealmente, o nível de MP mais próximo do real deve ser mensurado, sendo que nesta tarefa MPs devem ser distinguidas de (1) pequenas plaquetas (há uma sobreposição de tamanho entre essas e as maiores MPs) (2) complexos e agregados de proteínas extracelulares (incluindo aqueles formados por anticorpos marcados com imunofluorescência) (3) lipoproteínas (4) e artefatos de mensuração do aparelho (“electronic noise”) (87, 117, 118).

Citometria de fluxo é o método mais empregado na mensuração das MPs, sendo empregado em 75% dos estudos, segundo levantamento realizado pela Sociedade Internacional de Trombose e Homeostase (119). Outros métodos incluem: ensaios de coagulação, microscopia eletrônica e microscopia de força atômica, e análise de rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis). Tais métodos são detalhados em revisão dedicada (119). Microscopia eletrônica e microscopia de força atômica podem ser utilizadas para determinar o tamanho e forma das MPs, mas não fornecem informações sobre suas propriedades biológicas. Western blotting pode ser usado para demonstrar a presença de proteínas em preparações de MPs, porém não pode ser aplicado na quantificação das MPs, nem é possível afirmar que as proteínas isoladas são provenientes das MPs (87). Nos ensaios que avaliam a atividade pró-coagulante, podem ser medidas (1) capacidade de geração de trombina (2) tempo de coagulação.

Como afirmado em documento da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares, de 2013, não há consenso em um método que seja “padrão ouro” na mensuração das MPs. Métodos mais ou menos indicados vão depender do objetivo da pesquisa, sendo que os pesquisadores são encorajados a descreverem em detalhes sua metodologia de obtenção e análise das amostras, de modo a permitirem comparações (68).

#### 3.4.1 Citometria de fluxo e fatores analíticos

De maneira breve, a mensuração das MPs através da citometria de fluxo utiliza os seguintes parâmetros (1) seleção do tamanho das partículas, determinada pelo *gate* de leitura (por exemplo,

0,1 a 1  $\mu\text{m}$ ) (2) identificação de um marcador “universal” das MPs (3) identificação de um marcador específico de acordo com origem celular (118).

Esses três parâmetros são fatores analíticos que irão influenciar os resultados, explicando em parte a grande variabilidade na contagem absoluta das MPs, comparando-se diferentes trabalhos. O *gate* de leitura vai variar de acordo com o poder de detecção do aparelho. Nos citômetros convencionais, o limiar mínimo de detecção do está entre 0,4 a 0,5  $\mu\text{m}$ . Logo, as menores MPs estarão abaixo dessa medida e não serão quantificadas. Novos equipamentos são capazes de realizar a discriminação de partículas na ordem dos 0,2 a 0,1  $\mu\text{m}$  (87). Segundo revisão sobre tema, mais de 60% dos pesquisadores ainda utilizam citômetros convencionais, sendo que somente 7% dos citômetros utilizados nos trabalhos eram capazes de detectar partículas da ordem de 0,3  $\mu\text{m}$  (119).

A citometria de fluxo apresenta como vantagens sua ampla disponibilidade e relativa facilidade para análise de um grande número de amostras, se comparado aos outros métodos. A concordância entre a análise por citometria de fluxo e microscopia eletrônica é pobre, sendo que alguns trabalhos com microscopia eletrônica relatam que mais de 75% das MPs são menores que 0,5 $\mu\text{m}$  – logo, grande parcela das MPs estará abaixo do nível de detecção dos citômetros convencionais (119).

Devido aos diferentes tipos celulares que podem liberar MPs e sua diferente composição, não existe consenso quanto ao uso de um marcador universal na detecção das MPs. A exposição de fosfatidilserina na membrana é considerada uma propriedade clássica das MPs, porém utilização da anexina V para marcação da fosfatidilserina não é unânime. Alguns grupos definem MPs apenas pelo tamanho e pelo antígeno específico, sem testar para anexina V. Isso porque foi descrita a ocorrência de MPs negativas para anexina V, e além disso a exposição de fosfatidilserina é aumentada pelo processo de centrifugação e descongelamento. Trabalho também já demonstrou que a quantidade de MPs sem marcação pela anexina V é 30 vezes maior do que aquela detectada pela marcação (76). Contudo, argumenta-se que tal discrepância deve-se ao aumento da contagem de debris celulares ou precipitados, assim como de aumento de artefatos (“background noise”). Logo, Dey-Hazra et al (118) recomendam que a marcação de anexina V seja aplicada na contagem das MPs, possibilitando melhor distinção dos eventos verdadeiros daqueles fatores de confusão – tendo-se em mente que uma parcela das MPs pode não ser detectada.

A identificação fenotípica da MP vai ocorrer através da identificação de epítomos classicamente relacionados a sua célula de origem. Por exemplo, MPs derivadas de plaquetas irão ser identificadas pela presença de CD41a. Como mostrado no quadro 3, para um mesmo tipo celular podem ser utilizados diferentes epítomos.

### 3.4.2 Fatores pré-analíticos

Além dos fatores analíticos abordados brevemente na sessão anterior, fatores pré-analíticos também irão influenciar os resultados. Entre os fatores pré-analíticos já avaliados de forma objetiva em estudos estão:

- Tipo de anticoagulante usado

Lacroix et al (120), utilizando a citometria de fluxo na mensuração das MPs, compararam o citrato a outros coagulantes, como CTAD (do inglês, Citrate-Theophyllin-Adenosine-Dipyridamole), EDTA (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid) e heparina. Foi encontrada que a contagem do número total de MPs foi significativamente maior nos tubos de EDTA e heparina (respectivamente, 15 e 4 vezes), não ocorrendo diferença significativa para os valores encontrados empregando-se o CTAD.

- Uso de torniquete e tipo de agulha:

Nesse mesmo trabalho (120), não houve diferença na mensuração das MPs comparando-se um torniquete leve (20mmHg) com um torniquete “mais apertado” (80mmHg). De maneira semelhante, não houve diferença comparando-se a punção com escalpe à flebotomia com agulha reta.

- Condições de transporte:

Lacroix et al (120) compararam a ausência de agitação das amostras antes da centrifugação com agitação leve (inversão simples do tubo antes da centrifugação) e agitação importante (2h de rotação contínua na bandeja de laboratório). A contagem de MPs foi significativamente aumentada ( $+250 \pm 240\%$ ,  $P = 0,006$ ) nas amostras submetidas a uma agitação importante. Para mimetizar melhor as condições reais, o número de MPs em amostras transportadas sem suporte foi comparado ao de amostras fixas a suportes de transporte (esses, ainda subdivididos em suportes verticais e horizontais). Amostras transportadas sem suporte tiveram um aumento de 180% ( $\pm 90\%$ ,  $P = 0,002$ ), do número de MPs. De maneira interessante, a influência da agitação dos resultados foi neutralizada quando as amostras foram transportadas em suportes fixos verticais, mas não nos horizontais.

- Tempo entre coleta e centrifugação:

Foi medida a influência de diferentes intervalos de tempo (de 5min a 4h) da coleta a primeira centrifugação (120). Uma hora após coleta, houve um aumento significativo da contagem total de MPs ( $40 \pm 35\%$ ,  $P = 0,02$ ). Após 4h, esse aumento de 80% ( $\pm 55\%$ ,  $P = 0,006$ ). Analisando diferentes grupos de MPs, atraso até centrifugação levou ao aumento de MPs derivadas de plaquetas, mas não daquelas derivadas de hemácias.

- Protocolo de centrifugação:

Diferentes protocolos podem ser empregados - e esses sabidamente influenciarão os resultados. A maioria dos estudos utiliza um protocolo de centrifugação em duas etapas. A primeira etapa se refere a obtenção do plasma pobre em plaquetas. Esse é obtido após uma a duas centrifugações iniciais, a depender do protocolo. Submetendo esse plasma pobre em plaquetas a uma segunda centrifugação, em alta velocidade, se obtém o plasma livre de plaquetas.

Não existe consenso quanto à obtenção do plasma pobre em plaquetas. Por outro lado, a obtenção de um plasma realmente livre de plaquetas é difícil. A

centrifugação exigida para remover todas as plaquetas pode eliminar conjuntamente as maiores MPs.

Dey-Hazra et al (118) encontraram um aumento de 10 a 15 vezes do número total de MPs derivadas de plaquetas, comparando-se um protocolo com centrifugação inicial de 1.500 x g por 15min a outros dois protocolos com velocidades iniciais de 5.000 x g. Não houve diferença significativa quando MPs derivadas do endotélio ou leucócitos foram avaliadas. Tais achados foram reproduzidos em outros trabalhos (120). O aumento do número de MPs, em estudos que utilizaram menores forças de centrifugação, é atribuído ao maior número de plaquetas e residuais, com maior potencial de geração *ex vivo* de MPs.

Artigo de posicionamento da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (87) não define por um protocolo único. Endossa a influência dos fatores de processamento nos resultados, que pesquisas com diferentes objetivos podem aceitar uma maior ou menor contaminação pelas plaquetas residuais, e que o mesmo protocolo deve ser utilizado durante todo trabalho. O documento também reforça importância de se especificar todas as variáveis de centrifugação, de modo a possibilitar reprodução e comparação de estudos.

- Condições e tempo de armazenamento:

Muito controversos são os estudos sobre os efeitos do congelamento na mensuração das amostras por citometria de fluxo. Os resultados encontrados variam, sendo reportados (1) diminuição da contagem das MPs (2) efeito nulo (3) ou aumento da contagem dessas vesículas extracelulares.

No trabalho de Lacroix et al (120) não foi encontrada diferença no número total de MPs, comparando-se amostras armazenadas a – 80°C por uma semana com aquelas armazenadas por um ano.

No estudo de Vila-Liante et al (117), partindo de um mesmo protocolo de centrifugação, comparou-se a mensuração de MP de plasma fresco com o de plasma congelado. Encontrou-se um aumento de seis vezes na contagem de MPs nas amostras congeladas. Os achados desse estudo são concordantes com o de outros

estudos que demonstraram que o processo de congelamento-resfriamento das amostras foi associado ao maior número de MPs circulantes (121, 122).

Esses resultados contrastam com o de estudos que encontram uma menor contagem de MPs após o congelamento da amostra. No estudo de Dey-Hazra et al (118) comparou-se a mensuração das MPs em amostras recém coletadas com aquelas armazenadas a  $-80^{\circ}$  por diferentes períodos de tempo (24 horas a 56 dias). Encontrou-se um aumento inicial no número MPs, com pico no 14<sup>o</sup> dia, seguido de uma queda a partir do 28<sup>o</sup> dia. Não houve queda adicional significativa a partir do 56<sup>o</sup> dia. Também no estudo de Shan et al (123) o número total de MPs foi menor após congelamento, de forma independente do tempo de armazenamento (comparando-se 1 a 4 semanas a  $-80^{\circ}$ ).

O posicionamento da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares, em 2013 (87), foi o de reconhecer a não existência de um consenso sobre o tema da influência da temperatura de armazenamento sobre a mensuração das MPs. Pontuam que estudos bem controlados para avaliar o impacto de diferentes temperaturas de armazenamento ( $4^{\circ}$ ,  $-20^{\circ}$ ,  $-80^{\circ}$  ou  $-160^{\circ}$ ) sobre o processamento das amostras são necessários. Reforçam também a o fato que o tipo de amostra analisada (fresca ou congelada) deve ser informada, e que amostras frescas devem ser comparadas com amostras frescas, e congeladas com congeladas.

- Descongelamento

Estudando diferentes protocolos para descongelamento, e seu impacto na mensuração das MPs. Trummer et al (124) comparou descongelamento em temperatura ambiente, com aquele realizado no gelo e a uma temperatura de  $37^{\circ}$ . A contagem de MPs foi significativamente reduzida quando as amostras foram descongeladas em gelo ( $p = 0,001$ ) quando comparadas aquelas descongeladas em temperatura ambiente ou a  $37^{\circ}$ . Autores concluíram que o descongelamento pode ser realizado a temperatura ambiente ou a  $37^{\circ}$ , mas não em gelo.

Em seu posicionamento, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares escreve que há evidências na literatura de que as vesículas extracelulares (incluindo

as MPs) são resistentes a ciclos de congelamento e descongelamento. Mesmo assim, é boa prática informar quantos ciclos de congelamento e descongelamento as amostras foram submetidas.

## 4 OBJETIVOS

### Objetivo geral

Quantificar MPs derivadas de leucócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos T, células endoteliais, eritrócitos, e plaquetas em pacientes com EI

### Objetivos específicos

1. Avaliar possível mudança no perfil das MPs no decorrer do tratamento antimicrobiano.
2. Avaliar possível correlação das MPs com desfechos clínicos: mortalidade hospitalar, necessidade cirúrgica, desenvolvimento de insuficiência cardíaca e AVC.
3. Comparar o perfil das MPs de pacientes com EI com o de pacientes com outras infecções bacterianas.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Participantes

Como já mencionado, o presente estudo se insere no Grupo de Pesquisas em EI do HC/UFMG, existente desde 2005. Todos os pacientes internados no HC/UFMG com EI suspeita ou confirmada foram avaliados para inclusão no estudo. A busca dos pacientes foi feita de forma ativa e por meio da comunicação dos casos suspeitos pelo médico assistente. Para diminuir possibilidade de diagnósticos tardios ou pacientes não avaliados para inclusão, avisos foram afixados nos principais setores envolvidos nos cuidados dos pacientes com suspeita de EI: sala de ecocardiografia, unidade de cuidados intensivos e enfermaria.

### 5.2 Recrutamento

O período de inclusão foi de 2011 a 2017. Os pacientes foram convidados a participar do estudo de forma voluntária. Ao concordarem, os pacientes receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), (Apêndice A). O termo foi redigido em linguagem clara, para facilitar compreensão de pacientes com diferentes graus de instrução.

Em linhas gerais, os pacientes autorizaram a utilização de seus dados clínicos e laboratoriais, além da coleta de 20ml de sangue para análise de marcadores imunológicos. Não houve qualquer tipo de alteração no tratamento em virtude do presente estudo.

Os pacientes incluídos tiveram suas características clínicas, laboratoriais e do ecocardiograma registradas através de um protocolo detalhado (Apêndice C). O protocolo conta com cerca de 130 descritores. Esses são compostos por fatores predisponentes, manifestações clínicas (incluindo tempo até o diagnóstico, sinais e sintomas, eventos tromboembólicos), exames complementares (ecocardiogramas, culturas, hemograma, PCR, dentre outros) complicações no decorrer do tratamento e necessidade de cirurgia.

### 5.3 Critérios de inclusão e exclusão

### 5.3.1 Pacientes com endocardite infecciosa

O diagnóstico de EI e a subsequente inclusão dos pacientes seguiram os critérios de Duke Modificados (51). Nesse, os casos suspeitos são classificados em 3 categorias:

- Definitivos: se eles preenchem dois critérios maiores, ou um critério maior e três menores, ou cinco critérios menores
- Possíveis: se eles preenchem um critério maior e um critério menor ou três critérios menores
- EI excluída: diagnóstico alternativo claro, ou resolução da síndrome febril com tempo de antibioticoterapia menor ou igual a quadro dias, ou não confirmação patológica em estudo de peça cirúrgica ou autópsia (com tempo de antibioticoterapia inferior a 4 dias), ou o caso não preencher os critérios para EI definitiva ou provável.

As definições dos critérios maiores e menores estão no quadro 3, apresentado na sessão de antecedentes científicos da Endocardite Infecciosa (3.1.8 Diagnóstico).

Os critérios de inclusão foram:

- Pacientes com EI possível ou definitiva, de acordo com os critérios de Duke Modificado.
- Idade maior ou igual a 18 anos
- Consentimento para participar do estudo, com assinatura do TCLE (Apêndice A)

Os critérios de exclusão foram:

- Tempo de antibiótico superior a uma semana, na data de inclusão do estudo.
- Óbito antes da coleta da primeira amostra de sangue.
- Paciente submetido a cirurgia antes da obtenção da primeira amostra de sangue.

### 5.3.2 Grupo controle

Para compor o grupo de controles doentes, foram selecionados pacientes com outras infecções bacterianas, febre e PCR elevado. Foram consideradas: infecção do trato urinário,

pneumonia, infecções da corrente sanguínea, infecção de partes moles, neutropenia febril, sinusite, e enterocolite.

Foram excluídos os pacientes síndrome febril por dengue.

#### 5.4 Cálculo amostral

Ao início do trabalho, não possuíamos estudos prévios que avaliaram o perfil sérico das MPs na EI, em que pudéssemos basear o cálculo amostral. A grande variabilidade na metodologia de análise das MPs também limitaria esse cálculo. Logo, utilizamos nossa amostra de conveniência. O tamanho amostral conseguido é, como mostrado no decorrer da discussão, comparável (ou até maior) a de outros estudos que avaliaram as micropartículas em diferentes contextos.

Na etapa final, durante a análise dos resultados, resultados preliminares de dois pacientes permitiram realização de um cálculo amostral, feito para se detectar diferença dos níveis séricos das MP derivada dos neutrófilos ao diagnóstico da endocardite infecciosa e após duas semanas de tratamento antimicrobiano. Verificou-se uma elevação de 31,5% no primeiro paciente e de 28,1% no segundo paciente entre o tempo zero e após duas semanas de tratamento. A média dos valores das MP dos neutrófilos foi de  $72,2 \pm 45,1$  contagens/ $\mu$ L. Dessa forma, estimou-se um aumento de, pelo menos, 25% nos níveis séricos das MP derivada dos neutrófilos após duas semanas de tratamento. Assim, considerando-se erro alfa de 0,05, beta de 0,20 (poder estatístico de 80%), obteve-se amostra de 54 pacientes. Para os cálculos, utilizou-se *software G Power*, versão 3.1.

#### 5.5 Obtenção e processamento das amostras

Seguida inclusão no estudo, foram coletadas as amostras de sangue. A mesma foi realizada pelo corpo técnico do laboratório do Hospital das Clínicas da UFMG, mediante autorização do setor responsável. Nos pacientes com EI, sempre que possível, as amostras foram coletadas em três momentos:

- *T0*: logo após inclusão no estudo, de preferência antes do início de antimicrobianos ou em até uma semana após início destes.
- *T1*: duas semanas após o início do tratamento antimicrobiano
- *T2*: ao término do tratamento com antimicrobiano

Para o grupo controle, tanto o grupo saudável como o grupo doente, as amostras foram coletadas em um único tempo.

Pacientes do período de 2011 a 2013 tiveram suas amostras analisadas em um primeiro trabalho do grupo, que avaliou o perfil das interleucinas na EI (7). Tais amostras foram mantidas conservadas a -80 graus em freezer do Laboratório René Rachou, e acessadas desta vez para o estudo das MPs. As amostras coletadas no período de 2014 a 2017 se inseriram no projeto de análise das MPs. Todas as amostras seguiram a mesma metodologia de coleta e armazenamento, já que o presente estudo é fruto da continuidade do projeto de pesquisa dos marcadores inflamatórios na endocardite infecciosa.

Foram coletados um tubo de soro 3.5ml (tampa vermelha) e um tubo de citrato 3.2ml (tampa azul). As amostras foram centrifugadas a 3000 x g durante 15min, para obtenção do plasma pobre em plaquetas. Buscou-se um tempo entre a centrifugação e coleta foi de no máximo 60min. O material sobrenadante foi transferido para tubos, com identificação com a data, tipo de material (soro ou plasma) e nome do paciente.

As amostras foram inicialmente armazenadas em freezer do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, a - 20 graus, e depois transferidas para freezer próprio na Faculdade de Medicina da UFMG, onde também foram mantidas a temperatura de - 20 graus. Posteriormente, as caixas com as amostras foram enviadas para freezer do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoramento do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ), onde foram mantidas a - 80°C.

## 5.6 Identificação das micropartículas por citometria de fluxo

### 5.6.1 Obtenção das micropartículas

A análise das MPs foi realizada no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoramento do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ). Amostras colhidas em citrato de sódio foram descongeladas a 37°C, sendo novamente centrifugadas a 13.000 x g por três minutos para obtenção de plasma livre de plaquetas. Em seguida, 100 µL desse plasma foi diluído em

solução de PBS (do inglês *phosphate buffered saline*) contendo citrato de sódio e heparina sódica (1 µg/mL), numa diluição 1:3, e o material novamente centrifugado a 14.000 x g por 90min, a 15°C.

O sedimento rico em MPs foi ressuspensão no tampão de ligação à anexina V, 1x (BD Biosciences, California, US).

### 5.6.2 Análise das micropartículas por citometria de fluxo

O processo de identificação das MPs nas amostras foi realizado de acordo com protocolo de estudos previamente publicados (125, 126). Sua identificação se deu por: (1) seleção pelo tamanho das micropartículas; (2) identificação por marcador universal de MPs, no caso a fosfatidilserina; (3) identificação por um marcador específico da célula de origem.

O citômetro foi calibrado com base na dispersão frontal e lateral de *microbeads* fluorescentes de tamanho definido – 0,7 a 0,9 µm (SPHERO™ *Amino Fluorescent Particles*-Spherotech Inc. Libertyville, Illinois, US). A identificação da presença de fosfatidilserina na membrana das MPs foi feita por meio da sua marcação pela anexina V. Eventos previamente selecionados positivos para anexina V foram marcados para diferentes subpopulações celulares presentes no sangue periférico por meio da utilização de anticorpos monoclonais marcados com ficoeritrina (PE) (BD Biosciences, California, US).

A caracterização fenotípica das MPs e a determinação de sua origem celular se deu com a incubação de 100µL do plasma contendo as MPs com os seguintes anticorpos específicos:

- CD41a-PerCP - plaquetas
- CD51/61-PE - células endoteliais
- CD235a-PECy5 - eritrócitos
- CD45-PE - leucócitos
- CD14-PercCP - monócitos
- CD66b-PE - neutrófilo
- CD3-PE - linfócito T

Como controle, foram utilizados anticorpos IgG de camundongos, marcados com FITC e PE (controle de isotipo). Após a adição dos anticorpos, as amostras foram incubadas por 30 minutos,

protegidas da luz. As MPs foram ressuspensas em 100 µL do tampão de ligação de anexina V (BD Pharmingen) e, finalmente, 5 µL de anexina V foram adicionados. Todos os reagentes e anticorpos utilizados na citometria de fluxo foram da BD Biosciences. Exceções foram apontadas.

### 5.6.3 Quantificação das micropartículas

As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCan (Becton-Dickinson, California, US). Um mínimo de 100.000 eventos foram adquiridos em cada amostra, para alcançar ao menos 5000 eventos dentro da janela das MPs.

Na determinação do número de MPs por microlitro, o citômetro foi configurado para operar em alto fluxo por 60 segundos em cada amostra. O número de MPs/µl foi calculado como descrito no estudo de Faille et al (127), de acordo com a seguinte fórmula:

- $MPs/\mu l = (N \times 500) / (60 \times 100)$ , onde:

N é o número de eventos adquiridos na região das MPs, 500 é o volume utilizado de plasma para obtenção do plasma livre de plaquetas, antes da fenotipagem, 60 é o volume da amostra analisada em um minuto de aquisição e 100 é o volume original da suspensão de MP a serem fenotipadas.

### 5.7 Valores de referência

Como valores de referência para população saudável, utilizamos aqueles obtidos pelo mesmo laboratório (René Rachou), com protocolo comparável, derivados de 30 doadores de sangue saudáveis. Os valores de referência das MP foram: até 75 contagens (n)/µL para MPs de leucócitos; até 75 n/ µL para MPs de neutrófilos; até 75 n/µL para MPs de monócitos; até 45 n/ µL para MPs de linfócitos T; até 45 n/µL para MPs de eritrócitos; até 54 n/µL para MPs de endotélio; até 90 n/µL para MPs de plaquetas.

### 5.8 Análise estatística

Os dados foram organizados em banco de dados e analisados empregando-se o software estatístico IBM SPSS 23 (Chicago, Illinois, US). As variáveis qualitativas foram expressas por meio do uso de frequências e porcentagens. As variáveis quantitativas foram expressas utilizando-

se de medidas de tendência central (média para os dados de distribuição normal e mediana para os de distribuição não normal) e de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartilico). A comparação entre os pacientes com endocardite e os controles doentes foi realizada empregando-se o teste de qui-quadrado para as variáveis categóricas, o teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney para as variáveis contínuas, conforme apropriado.

As alterações das micropartículas nos três tempos foram comparadas por meio do teste de Kruskal Wallis. Para se determinar as variáveis preditoras de morte durante a internação hospitalar, utilizou-se regressão logística. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado como de significância estatística.

## 5.9 Aspectos éticos

Trata-se de estudo observacional, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer nº ETIC 412/06). Como já informado, o TCLE foi assinado pelos pacientes ou seus responsáveis no momento da inclusão do estudo.

## 5.10 Pesquisa e normatização bibliográfica

Considerando-se EI, para a busca na base MEDLINE, utilizou-se como descritores os termos “endocarditis”, “endocarditis, bacterial”, associados as palavras chaves “infectious endocarditis”, “bacterial endocarditis”, “bacterial endocarditides” ou “endocarditis”. Para MPs, utilizou-se o descritor “cell-derived microparticles”, associado as palavras chaves "cell-derived microparticles", “microparticle”, "cell derived microparticles" ou “microparticles”. À exceção dos trabalhos clássicos, os artigos selecionados são do período de 1997 a 2017.

As referências bibliográficas foram normatizadas segundo o estilo Vancouver.

## 6 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 6.1 Artigo Científico

#### ABSTRACT

#### **Cell-derived microvesicles in infective endocarditis: role in diagnosis and potential for risk stratification at hospital admission.**

#### **SUMMARY:**

**Objectives:** To characterize the plasmatic profile of cell-derived microvesicles (MVs) at diagnosis and during the treatment of patients with infective endocarditis (IE).

**Methods:** Blood samples from 57 patients with IE were obtained on 3 consecutive moments: upon admission (T0), at 2 weeks (T1), and at the end of treatment (T2), and were compared with 22 patients with other bacterial infections. MPs were measured by flow cytometry and labeled for specific cell markers of CD45 (leukocytes), CD66b (neutrophils), CD14 (monocytes), CD41a (platelets), CD51 (endothelial cells), CD3 (T lymphocyte) and CD235a (erythrocytes).

**Results:** MVs from platelets (pltMVs), leukocytes (leukMVs), neutrophils (neutMVs), monocytes (monoMVs) and lymphocytes (lymphMVs) were significantly more elevated in the patients with IE, compared to the patients with other bacterial infections, despite comparable age, sex, blood counts and C reactive protein levels. MVs values revealed a relatively stable pattern over time in IE, except for a significant increase in leukMVs and neutMVs in T1. LeukMVs ( $p = 0.011$ ), neutMVs ( $p = 0.010$ ), monoMVs ( $p = 0.016$ ) and lymphMVs ( $p = 0.020$ ), measured at admission, were significantly higher in IE patients that died during hospitalization in comparison with those that survived. In a multivariable analyses, the levels of neutMVs remained as an independent factor associated with mortality (odds ratio 2.203; 95% confidence interval 1.217 - 3.988;  $p = 0.009$ ), adjustment for heart failure during the treatment.

**Conclusions:** Plasma levels of pltMVs, leukMVs, neutMVs, monoMVs and lymphMVs were significantly more elevated in patients with IE than in patients with other bacterial infections at hospital admission. Furthermore, neutMVs at admission have been identified as an independent predictor of mortality in patients with IE. Thus, cell derived MPs may become an important tool in the differential diagnosis and mortality risk assessment early in the course of IE suspected cases.

**Keywords:** infective endocarditis, cell-derived microparticles, mortality, bacterial infections.

**Cell-derived microvesicles in infective endocarditis: role in diagnosis and potential for risk stratification at hospital admission.**

Milton Henriques Guimarães Júnior<sup>1</sup>; Teresa Cristina Abreu Ferrari<sup>1</sup>; Andréa Teixeira de Carvalho<sup>2</sup>; Marcela de Lima Moreira<sup>2</sup>; Lorena Júnia de Souza Santos<sup>2</sup>; Matheus Fernandes Costa-Silva<sup>2</sup>; Rodrigo Matos Pinto Coelho<sup>1</sup>; Pedro Henrique Oliveira Murta Pinto<sup>1</sup>; Tijmen Hermen Ris<sup>3</sup>; Jonathas Teixeira Salles<sup>1</sup>; Livia Silva Araújo Passos<sup>1</sup>; Maria do Carmo Pereira Nunes<sup>1</sup>

**Institutions**

- 1: Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil
- 2: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René-Rachou, Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Belo Horizonte, Brazil
- 3: Erasmus University Rotterdam - Erasmus MC, Netherlands

**Address for correspondence:** Prof. Maria do Carmo P. Nunes

Department of Internal Medicine, School of Medicine of the Universidade Federal de Minas Gerais  
Av. Professor Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, 30130 100- Belo Horizonte, MG, Brazil

Phone: +55 31 34099746 Fax: +55 31 34099437

Email: [mcarmo@waymail.com.br](mailto:mcarmo@waymail.com.br)

Published in Journal of Infection; Volume 79, Issue 2, August 2019, Pages 101-107

Accepted: 10 June 2019.

Available online: 14 June 2019

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.06.005>

## Introduction

Infective endocarditis (IE) is the microorganism infection of the endocardium known for its high morbidity and mortality in spite of treatment(1). The clinical presentation and outcome are largely determined by the immune and inflammatory response influenced by the host-pathogen interaction. The complex pathogenesis of this condition is a challenge, and understanding the immune-inflammatory cell pathways can be a step closer to improve disease management.

In the last decades, studies have demonstrated a role of cell-derived microvesicles (MVs) in the immune-inflammatory response in several diseases. MVs are small vesicles, typically around 100–1,000 nm in size, released from the plasma membrane by activated, injured, or apoptotic cells (2, 3). Although there is no consensual definition of MVs(4), MVs are larger than exosomes, their density is unknown and they are usually isolated at 10,000 to 20,000 x g by centrifugation. MVs are often called microparticles (MPs), although the term “microparticles” has also been used for total populations of vesicles isolated from human plasma at 100,000 x g and such populations will contain exosomes (5).

The release of MVs have been demonstrated in physiological (6) and pathological conditions acting as intercellular messengers(7). The number and constitution of the released MVs depends on the cell type and its state, and on the environmental conditions(8). MVs have been studied in sepsis (9-12), where they were demonstrated to be associated with microvascular dysfunction, organ damage (9) and coagulation abnormalities (13). MVs have also been associated with thromboembolic events in patients with cancer (14), and with plaque instability in coronary artery disease (15). Some studies demonstrated that the total number of MVs, including the MVs derived from platelets, monocytes and endothelium, was significantly higher in patients with type 2 diabetes mellitus than in non-diabetic controls (16, 17). In chronic obstructive lung disease, endothelium derived MVs have been associated with the grade of lung destruction, airflow limitation and disease exacerbation(18).

Taking all together, it is possible that MVs participate in the pathophysiology of IE. However, up to this date, there are no studies evaluating the profile of plasmatic MVs in IE. Therefore, the aim

of our study was to characterize the profile of MVs released by different cells in IE, compare their kinetics during the disease treatment, and evaluate their potential for predicting clinical outcome.

## Methods

Between August 2011 and January 2017, 65 patients with definite IE, according to the Duke's Modified Criteria (19), consecutively admitted to the University Hospital, Federal University of Minas Gerais, Brazil were evaluated for inclusion in the study. Exclusion criteria were IE patients who were taking antibiotics for more than one week prior to the moment of inclusion in the study, and those who died or underwent cardiac surgery before the collection of the first blood sample for MVs measurement. The Institutional Ethics Committee approved the study protocol and written informed consent was obtained from all the participants.

After being included in the study, the patients were followed during hospitalization, and their clinical, laboratorial and echocardiographic data were recorded in the study protocol. Blood samples for MVs measurement were obtained at 3 consecutive times, as follows:

T0	At the diagnosis of infective endocarditis
T1	At the 15 <sup>th</sup> day of antibiotic treatment
T2	Before hospital discharge

Blood sample for MVs quantification was collected before the beginning of the antibiotics or within the first week of treatment, we meant that the T0 sample was collected at the time of diagnosis, preferably before the beginning of the antibiotics. Patients who had already been taking antibiotics at the time of diagnosis had the T0 sample collected only if they had been taking it for less than 7 days, otherwise they were excluded from the study. At the later situation, it was not collected at the same day for every single patient because the time from antibiotic initiation and the definition of the IE diagnosis varied among them. Then, T1 samples were collected at day 15<sup>th</sup> of antibiotic treatment for every single patient, and T2 after completing the treatment, before hospital discharge.

The endpoint analyzed in this study was overall mortality related to any complication of IE during hospitalization.

The data of the patients with IE were compared with those of a control group, consisting of 22 patients with other bacterial infections that presented with fever and elevated C-reactive protein (CRP) serum levels. The other infections comprised pyelonephritis (8 cases), pneumonia (7 cases), catheter-related bloodstream infection (6 cases), and monoarthritis (1 case) without any organ dysfunction and any other sign of severity. Samples from the control group were collected only once, i.e. by the time of their enrollment in the study. As for the IE group, blood sample for MVs quantification was collected before the beginning of the antibiotics or within the first week of the use of these agents.

#### Sample preparation and MVs measurement

Citrated peripheral blood samples (3.2mL) was centrifuged at  $3,000\times g$  for 15 minutes, and then the plasma was cooled at  $-20^{\circ}\text{C}$  before storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Immediately before analyses, the samples were thawed at  $37^{\circ}\text{C}$  and were further centrifuged at  $13,000\times g$  for 3 minutes to obtain platelet-free plasma. The latter was diluted 1:3 in citrated phosphate buffered saline (PBS) containing heparin and centrifuged at  $14,000\times g$  for 90 minutes at  $15^{\circ}\text{C}$ . The resultant MVs pellet was then resuspended in  $1\times$  annexin V binding buffer (BD Biosciences, CA).

MVs were measured by flow cytometry. MVs selection was based on particle size, presence of a common surface marker (phosphatidylserine) and specific surface antigens according to the cell origin as described elsewhere (20-22). In the first step, the MVs isolated from plasma were gated (R1) based on their forward (FSC) and side (SSC) scatter distribution compared to the distribution of synthetic  $0.7\text{-}0.9\mu\text{m}$  SPHERO™ Amino Fluorescent Particles (Spherotech Inc. Libertyville, IL). After that, events present in R1 were accessed for their positive staining for annexin V (BD Bioscience, CA), which binds to phosphatidylserine. To properly place gates, mouse IgG PE conjugated isotype control monoclonal antibodies (mAbs) were used. Finally, annexin V+ events were gated with conjugated mAbs against the cell markers CD45-PE (leukocytes), CD66b-PE (neutrophil), CD14-PercCP (monocytes), CD3-PE (T lymphocyte) CD41a-PercCP (platelets), CD235a-PECy5 (erythrocytes) and CD51/61-PE (endothelial cells).

All reagents and mAbs used in the flow cytometry experiments were from BD Biosciences (Becton-Dickinson, CA), unless otherwise stated. The samples were analysed in a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, CA). Over 100,000 events were acquired on each sample to reach at least 2,000 events within the MVs gate.

The cytometer was set to operate at a high flow rate setting for 60 seconds for each sample. The number of MVs/ $\mu\text{L}$  of plasma was calculated as described elsewhere(23):  $\text{MVs}/\mu\text{L} = (\text{N} \times 400) / (60 \times 100)$ , in which N is the number of events, 400 is the total volume of the tube before analysis, 60 is the sample volume analyzed, and 100 is the original volume of MPs suspension used to perform the phenotyping protocol.

#### Normal reference values

As normal reference values we used the ones obtained in the same research laboratory (Instituto René Rachou, FIOCRUZ Minas), with similar protocol analyses, derived from 30 healthy blood donors. MPs reference values were: until 75 counts/ $\mu\text{L}$  for leukocytes MPs (leukMVs); until 75 counts/ $\mu\text{L}$  for neutrophils MPs (neutMVs); until 75 counts/ $\mu\text{L}$  for monocytes MPs (monoMVs); until 45 counts/ $\mu\text{L}$  for T lymphocytes MPs (lymphMVs); until 90 counts/ $\mu\text{L}$  for platelets MPs (pltMVs); until 45 counts/ $\mu\text{L}$  for erythrocytes MPs (eryMVs); and until 54 counts/ $\mu\text{L}$  for endothelium MPs (endoMVs).

#### Statistical analysis

Categorical variables, expressed as numbers and percentages, were compared using chi-square testing, whereas continuous data, expressed as median and interquartile range (IQR), were compared using the Mann-Whitney U test, as appropriate. Logistic regression model was constructed to test the independent association between MVs concentrations and death, after adjustment for other covariates. The data were analyzed using SPSS 23.0 statistical software (SPSS, Chicago, IL) and Prism GraphPad software, version 5 (San Diego, CA).

## Results

The baseline characteristics of the 57 patients classified as having definitive IE are shown in Table 1. Median age of the IE patients was 50 years (IQR 39-64 years), and 33 (58%) individuals were male. Native valve IE was observed in 32 (56%) cases, followed by prosthetic valve IE in 15 patients (26%) and device-related IE in 10 (17.5%). The most common predisposing condition was rheumatic valve disease (29.8%) and the most common comorbidity was chronic renal disease (22.8%). One patient had HIV infection, none was illicit drug user. The most prevalent agent was coagulase-negative *Staphylococcus*, which was isolated in 15 (26%) of the cases, followed by *Streptococcus* spp (12%) and *S. aureus* (10%). Culture-negative IE represented 29.8% of the cases.

Transesophageal echocardiography was performed in 47 (82%) of the patients and transthoracic echocardiogram in the remaining 10 (17.5%). Vegetations were identified in 49 patients (86%) and 20 (35%) vegetations were described as >10mm.

There was no significant difference between the IE group and the group with other bacterial infections regarding age, CRP levels, hemoglobin concentrations, white blood cell counts, platelets counts and creatinin levels (Table 2).

A high proportion (>84%) of patients in the IE group and in the control group of the other bacterial infections presented levels of all MVs phenotypes above the reference values. The comparison of the MV counts between the group of other bacterial infections and IE patients (at admission) demonstrated significantly higher levels of the leukMVs ( $p=0.032$ ), neutMVs ( $p=0.023$ ), lymphMVs ( $p=0.034$ ) and pltMVs ( $p=0.020$ ) in the IE patients

### **Microvesicles counts during treatment**

During hospital stay, 17 patients died with an overall mortality rate of 30%. Twenty-five patients (44%) were submitted to cardiac surgery, chiefly due to development of heart failure (51%). The median time between the diagnosis and the surgery was 9 days (IQR 3-17 days). Neurologic events occurred in 11 (19.3%) patients and the most prevalent was ischemic stroke, which was observed in 9 (15.8%) individuals.

Figure 1 shows MVs levels during treatment course. LeukMVs, pltMVs and endoMVs presented the highest levels. There were a higher count of leukMVs ( $p=0.049$ ) and neutMVs ( $p=0.033$ ) in T0 compared with T1.

To analyze the potential value of MVs in predicting early mortality, initially we compared MV levels at admission (T0) and at T1 between the patients who died within the first 2 weeks and those who survived at least 2 weeks after diagnosis. We found that the counts of leukMVs ( $p=0.018$ ), neutMVs ( $p=0.009$ ), monoMVs ( $p=0.015$ ) and lymphMVs ( $p=0.019$ ) measured at T0 were significantly higher in the patients who died compared to those who survived (Figure 2). MV levels at different times (T0, T1, T2) are shown in Figure 3 (A and B). Although pltMVs levels at T1 were higher in those who died, this difference was not significant, as there were a wide variation in pltMVs during the disease evolution. Additionally, mean platelet volume (MPV) values, which were  $8.7 \pm 2.6$ fL presented no differences between the patients who died and survived.

There were no significant differences in MV levels at admission concerning the need of surgery, cerebral event, or development of heart failure. In the logistic regression analyses, the levels of neutMVs at admission remained as an independent predictor of death, after adjustment for worsening of heart failure during the course of IE (odds ratio 2.203; 95% CI 1.217 - 3.988;  $p=0.009$ ).

## Discussion

As far as we know, this is the first study describing the plasma concentrations and kinetics of MVs in patients with IE, and also comparing IE MV levels with those observed in other bacterial infections. All MVs phenotypes demonstrated elevated plasma levels during infection (IE and the other bacterial infections groups) when compared with reference values defined in a healthy population. Despite comparable age, sex, white blood cell count and CRP levels, we observed significantly higher baseline levels of leukMVs, neutMVs, lymphMVs and pltMVs in the IE group. This suggests a greater activation of these cells in IE resulting in higher MVs production. MVs levels stratified by mortality showed higher levels of leukMVs, neutMVs, monoMVs and lymphMVs at admission in the patients who died compared with those who survived. After

adjustment for development of heart failure, which is the main complication of IE, neutMVs at baseline remained predictor of death.

Extracellular vesicles (EVs) encompass a broad range of vesicles released from cells (3). EVs can be classified into different subsets according to their size, cellular origin, content or the mechanism leading to their formation. At present, at least 3 main subgroups of EVs have been defined. MVs, also referred to as microparticles, are vesicles typically around 100–1,000 nm in size (3, 24, 25). Exosomes are smaller cell-derived vesicles that are present in all biological fluids. Their diameter is between 30 and 100 nm, the density ranges between 1.13 and 1.19 g/ml and the morphology has been described as cup-shaped. Apoptotic bodies are larger vesicles containing nuclear materials. In our study we have analyzed EVs from 500nm to 900nm, thus our population was constituted of MVs, without overlap with exosomes.

In the IE patients, the highest levels of MVs were derived from leukocytes, followed by those derived from platelets and endothelial cells. Studies that evaluated patients with sepsis (26) and meningococcal disease (27) demonstrated similar findings. The elevation of neutMVs levels found in our patients with IE is also similar to the results of Timár et al. (28) that demonstrated a 6-fold increase in the release of neutMVs, comparing patients with *S. aureus* bacteremia with healthy individuals.

In some studies concerning other diseases in which MVs counts were performed, the authors observed a predominant increase in pltMVs differently from what was observed in the present study, in which leukMV counts were very similar to those of pltMVs in both cases and controls with other infections. As those studies included patients who were critically-ill, including meningococcal infection with septic shock (27), acute *Plasmodium vivax* malaria (20), and sepsis admitted to an intensive care unit (26) and probably presented an acute phase response more exacerbated than that exhibited by our cases. The intensity of the acute phase response and the more acute character of the infection may be possible explanations for the observed difference. However, the possibility of influence by pre-analytical factors cannot be ruled out.

### **Microvesicles kinetics during the treatment**

There are few studies reporting MVs kinetics, determined by flow cytometry, during treatment of infectious diseases; furthermore, most of them are cross-sectional and none of them in IE. We observed increase in the leukMVs and neutMVs serum concentrations from admission (T0) to the end of the second week of treatment in the IE patients (T1). An interesting observation was the course of pltMVs in surviving patients. Overtime, the pltMVs tended to increase which may represent a protective role of pltMVs during IE. This in agreement with a study that found a negative correlation between pltMVs and organ dysfunction in the patients who died due to severe sepsis (29). However, on T1, nonsurviving group had an important increase in pltMVs as well, but the pltMV levels were lowered again at T2.

It can be speculated a possible influence of cardiac surgery on this finding as in our cohort, 44% of the patients underwent surgery, in a median of 9 days after the diagnosis (before obtaining data of T1). However, the half-life of MVs seems to be very short. Rank et al. (30) reported that pltMVs half-life in humans is 5.8 hours(30). A shorter time (90% clearance after 30 minutes) was reported in an animal study of exosomes released by erythrocytes (31). Furthermore, Fu et al. (32) did not find any difference in the total MVs concentrations comparing the MP levels before surgery with those obtained 12 and 72 hours after the procedure. A possible explanation for this finding is the above described short half-life of MVs. Thus, we cannot attribute the enhancement of leukMV and neutMV levels observed in our study to the surgical procedure. Nevertheless, it is known that cardiopulmonary bypass surgery provokes an inflammatory state that is able to induce MVs release(33).

### **Value of microparticles in predicting mortality**

The mechanisms that stimulate MVs release are cell activation and apoptosis, in a process involving cytokine and endotoxin release, complement lysis, oxidative stress and high shear stress (34, 35), which may predict disease severity.

The association between MVs levels and clinical outcomes has been investigated in other diseases. Zafrani et al. (36) demonstrated that preventing the release of MVs was associated with a decrease

in microvasculature dysfunction and higher survival in animal models of sepsis. Delabranche et al. (13) found increased leukMVs levels in patients with sepsis that developed disseminated intravascular coagulation. In agreement with our finding that neutMVs were predictors of mortality during hospitalization, a previous study showed a high mortality rate in septic mice injected with neutMVs(37).

Other authors have explored the mechanisms that could explain the association between leukMVs, neutMVs, monoMVs or lymphMVs and high mortality. When looking for mechanisms, is important to take into account that the role of MVs depends on their composition, which is related to the cell of origin and the target cell. MVs from T lymphocytes are capable of inducing pro-inflammatory peptides, nitric oxide-synthesis and cyclooxygenase-2 expressions, especially in the middle layer of the vessels (38). MonoMVs induce, in a concentration-dependent manner, reactive oxygen species production, cytokine release and nuclear factor kappa B (NF-Kb) activation in monocytes and macrophages (39).

Illustrating the complexity of MVs effects, neutMVs have been reported to be pro or antiinflammatory, depending on the target cell (40). Gasser et al. (41) observed that neutMVs are capable of provoking a dose-dependent release of the anti-inflammatory cytokine transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) on macrophages, as well as a decrease in the release of interleukin (IL)-6, CXCL-8 and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). Johnson et al. (37) demonstrated in animal model that the administration of neutMVs was associated with increase in bacterial load and IL-10 levels, and a decrease in macrophage activation. Otherwise, it was demonstrated that neutMVs caused a pro-inflammatory response on platelets (42) and endothelial cells (43). As an effect of the IE antimicrobial therapy, the ongoing bacteria destruction and clearance cause continuing antigen exposure, increasing the stress and pro-inflammatory factors release, resulting in activation of neutrophils and elevation of neutMV levels during the course of treatment, especially during the initial phase when the destruction of bacteria is more intense. However, further research, comparing the MVs levels with the release of cytokines, endotoxins, complement lysis, oxidative stress and high shear stress could clarify their effects. Irrespective of their role, plasmatic counts of MVs, specifically neutMVs, may be a useful prognostic tool for risk assessment during the hospitalization

of IE patients. The possible mechanisms implicated in this poor outcome, as well as the final MVs effect (by enhancing a pro or an antiinflammatory state) deserves more investigation.

In this context, knowledge about the role of platelets in the development and severity of various conditions, in addition to thrombosis, continues to appear, especially in relation to the areas of inflammation and immune response (44). As elevated mean platelet volume (MPV) indicates increased platelet activation, this index has been studied in several disorders. Some authors observed that the MPV was higher in patients with IE than in health controls and decreased significantly after treatment (45, 46). It has also been demonstrated that IE patients who present embolic events had increased MPV values, compared to those who do not present this complication (47, 48). Furthermore, previous history of IE, *S. aureus* infection, end-stage renal disease, depressed left ventricular ejection fraction, early surgical intervention, vegetation size  $\geq 10$  mm, presence of perivalvular abscess, higher on-admission platelet count, CRP and MPV levels emerged as independent predictors of in-hospital poor outcomes (48). Thus, high MPV values may be a biomarker of unfavorable outcome in IE, especially regarding the increased risk of thromboembolic events. Additionally, it is possible to speculate that platelets may play a role in the mortality of these patients. However, it was demonstrated that several diseases, including local or systemic infections and many drugs may potentially affect MPV levels (48). Thus, further studies taking into account the factors that may affect MPV are necessary to assess the actual associations between MPV and IE.

The lower limit of detection of the cytometer that was used in our investigation ( $0.7\mu\text{m}$ ) did not allow the detection of smaller MVs, which is a limitation of the present study. In addition, our sample size and number of deaths limited the possibility to adjust for more variables in the multivariable analyses.

## **Conclusions**

This study demonstrated that MVs derived from platelets, leukocytes, neutrophils, monocytes and lymphocytes were significantly more elevated in patients with IE than in patients with other bacterial infections. MVs concentration from leukocytes and neutrophils were higher at IE

diagnosis than at 2 weeks of treatment. Moreover, MVs from neutrophils have been identified as an independent predictor of mortality in patients with IE. Therefore, cell derived MVs could become an important tool in the differential diagnosis and mortality risk assessment of patients with suspected IE at admission. However, studies with larger sample size are needed before drawing definitive conclusions.

## References

1. Abdulhak AAB, Baddour LM, Erwin PJ, Hoen B, Chu VH, Mensah GA, et al. Global and regional burden of infective endocarditis, 1990–2010: a systematic review of the literature. *Global heart*. 2014;9(1):131-43.
2. Mooberry MJ, Key NS. Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytometry Part A*. 2016;89(2):111-22.
3. Van der Pol E, Böing A, Gool E, Nieuwland R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14(1):48-56.
4. Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*. 2013;2.
5. Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews*. 2012;64(3):676-705.
6. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing A, Romijn F, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*-. 2001;85(4):639-46.
7. Liu ML, Williams KJ, Werth VP. Microvesicles in Autoimmune Diseases. *Advances in clinical chemistry*. 2016;77:125-75.
8. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006;20(5):847-56.
9. Souza ACP, Yuen PS, Star RA. Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI. *Kidney international*. 2015;87(6):1100.
10. Reid VL, Webster NR. Role of microparticles in sepsis. *BJA: British Journal of Anaesthesia*. 2012;109(4):503-13.
11. Zafrani L, Ince C, Yuen PST. Microparticles during sepsis: target, canary or cure? *Intensive Care Medicine*. 2013;39(10):1854-6.
12. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, et al. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;178(11):1148-55.
13. Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, et al. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive care medicine*. 2013;39(10):1695-703.
14. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(22):6830-40.
15. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet J-M, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000;101(8):841-3.
16. Deng F, Wang S, Zhang L. Endothelial Microparticles Act as Novel Diagnostic and Therapeutic Biomarkers of Diabetes and Its Complications: A Literature Review. *BioMed Research International*. 2016;2016.
17. Li S, Wei J, Zhang C, Li X, Meng W, Mo X, et al. Cell-Derived Microparticles in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;39(6):2439-50.

18. Takahashi T, Kubo H. The role of microparticles in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:303-14.
19. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Ryan T, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clinical infectious diseases*. 2000;30(4):633-8.
20. Campos FM, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Agnaldo Filho L, de Paula SC, Fontes CJ, et al. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malaria journal*. 2010;9(1):327.
21. Combes V, Taylor TE, Juhan-Vague I, Mège J-L, Mwenechanya J, Tembo M, et al. Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe *falciparum* malaria complicated with coma. *Jama*. 2004;291(21):2542-4.
22. Couper KN, Barnes T, Hafalla JC, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog*. 2010;6(1):e1000744.
23. Campos FM, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Filho AL, de Paula SC, Fontes CJ, et al. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malaria journal*. 2010;9:327.
24. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*. 2015;4(1):27066.
25. Zaldivia MT, McFadyen JD, Lim B, Wang X, Peter K. Platelet-derived microvesicles in cardiovascular diseases. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2017;4:74.
26. Zhang Y, Meng H, Ma R, He Z, Wu X, Cao M, et al. Circulating microparticles, blood cells, and endothelium induce procoagulant activity in sepsis through phosphatidylserine exposure. *Shock*. 2016;45(3):299-307.
27. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FPTM, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. 2000;95(3):930-5.
28. Timár CI, Lőrincz AM, Csépanyi-Kömi R, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzás EI, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*. 2013;121(3):510-8.
29. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Critical care medicine*. 2005;33(11):2540-6.
30. Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Grütznér S, Iberer M, Toth B, et al. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets*. 2011;22(2):111-6.
31. Willekens FL, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Döpp YA, van den Bos AG, et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*. 2005;105(5):2141-5.
32. Fu L, Hu X-X, Lin Z-B, Chang F-J, Ou Z-J, Wang Z-P, et al. Circulating microparticles from patients with valvular heart disease and cardiac surgery inhibit endothelium-dependent vasodilation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2015;150(3):666-72.
33. Bronicki RA, Hall M. Cardiopulmonary Bypass-Induced Inflammatory Response: Pathophysiology and Treatment. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2016;17(8\_suppl):S272-S8.
34. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *The Keio journal of medicine*. 2004;53(4):210-30.
35. Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood*. 1996;88(9):3456-64.
36. Zafrani L, Gerotziafas G, Byrnes C, Hu X, Perez J, Lévi C, et al. Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;185(7):744-55.
37. Johnson Iii BL, Midura EF, Prakash PS, Rice TC, Kunz N, Kalies K, et al. Neutrophil derived microparticles increase mortality and the counter-inflammatory response in a murine model of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*.
38. Tesse A, Martínez MC, Hugel B, Chalupsky K, Muller CD, Meziani F, et al. Upregulation of proinflammatory proteins through NF- $\kappa$ B pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(12):2522-7.
39. Bardelli C, Amoroso A, Federici Canova D, Fresu L, Balbo P, Neri T, et al. Autocrine activation of human monocyte/macrophages by monocyte-derived microparticles and modulation by PPAR $\gamma$  ligands. *British journal of pharmacology*. 2012;165(3):716-28.
40. Johnson BL, Kuethe JW, Caldwell CC. Neutrophil Derived Microvesicles: Emerging Role of a Key Mediator to the Immune Response. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2014;14(3):210-7.

41. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*. 2004;104(8):2543-8.
42. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, et al. Expression, activation, and function of integrin  $\alpha$  M  $\beta$  2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood*. 2008;112(6):2327-35.
43. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(33):23111-8.
44. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7(11):1759-66.
45. Icli A, Tayyar S, Varol E, Aksoy F, Arslan A, Ersoy I, et al. Mean platelet volume is increased in infective endocarditis and decreases after treatment. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2013;22(3):270-3.
46. Cho SY, Jeon YL, Kim W, Kim WS, Lee HJ, Lee WI, et al. Mean platelet volume and mean platelet volume/platelet count ratio in infective endocarditis. *Platelets*. 2014;25(8):559-61.
47. Tok D, Canpolat U, Tok D, Turak O, Isleyen A, Oksuz F, et al. Association of mean platelet volume level with in-hospital major adverse events in infective endocarditis. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2015;127(5-6):197-202.
48. Karagoz E, Tanoglu A, Dogan M. Mean platelet volume: An emerging prognostic factor of infective endocarditis? *Platelets*. 2015;26(4):370.

## TABLES

**Table 1- Baseline characteristics of the study population**

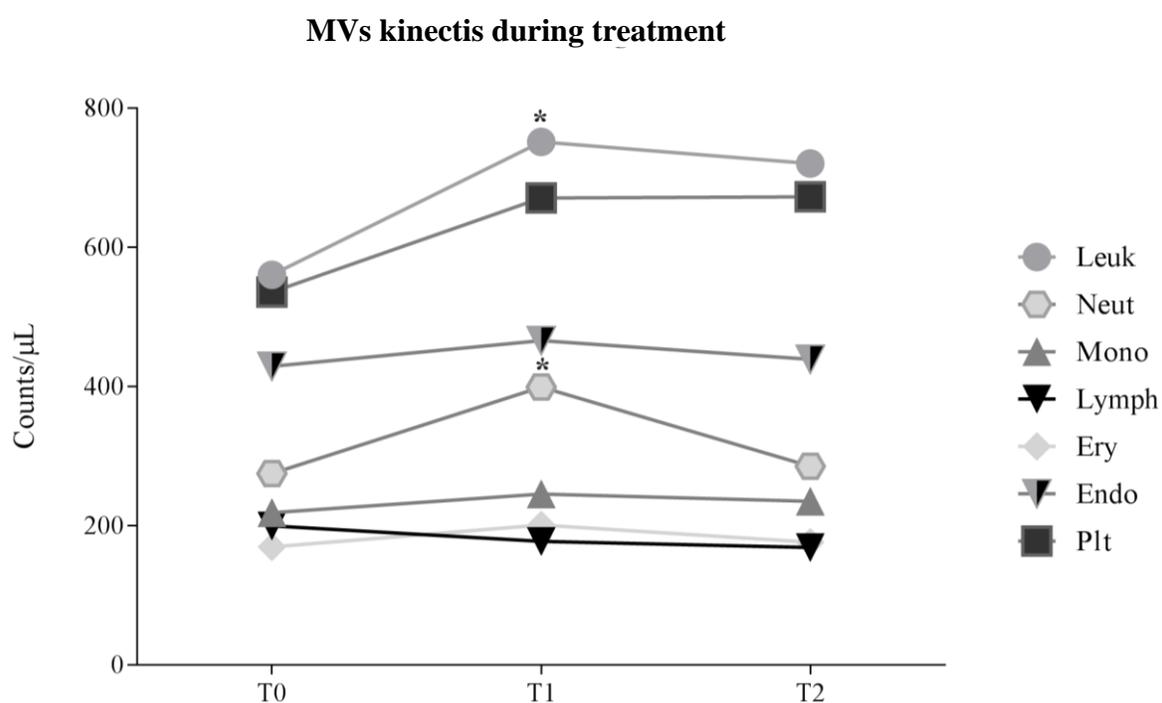
Variable	Value
Age (years)	50 (39-64)
Male	33 (58.0)
Diabetes mellitus	9 (15.8)
Chronic renal disease	13 (22.8)
<b>Predisposing conditions</b>	
Rheumatic valve disease	17 (29.8)
Degenerative valve disease	9 (15.7)
Mitral valve prolapse	11 (19.2)
Congenital heart disease	5 (8.7)
Central venous catheter	7 (12.0)
Previous infective endocarditis	2 (3.4)
<b>Clinical Findings</b>	
Fever	45 (80.0)
Weightloss	30 (53.0)
Anorexia	37 (65.0)
Musculoskeletal manifestation	12 (21.0)
Heart murmur	44 (77.0)
<b>Microbiologic Etiology</b>	
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	15 (26.3)
<i>Streptococcus</i> spp	7 (12.3)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 (10.5)
Gram negative rods	5 (8.8)
<i>Enterococcus</i> spp	3 (5.3)
Fungi	2 (2.5)
Negative culturefindings	17 (29.8)
<b>Complications and outcomes</b>	
In-hospital death	17 (30.0)
Early surgery	25 (44.0)
Development of heart failure	29 (51.0)
Fever >10 days (on treatment)	8 (14.0)
Neurologic event	11 (19.0)

Data are expressed as absolute numbers (percentage) and median (interquartile range).

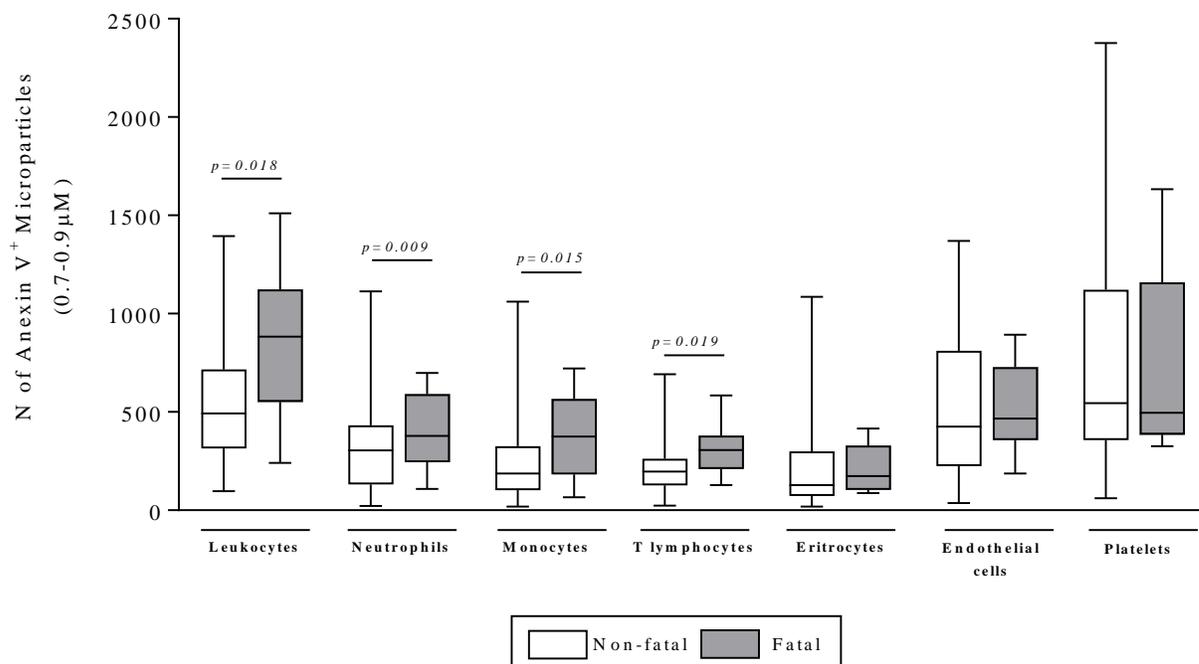
**Table 2-**Demographical and laboratorial features of the patients with IE compared with the patients with other bacterial infections

<b>Variable</b>	<b>Cases (n=57)</b>	<b>Controls (n=22)</b>	<b>P value</b>
Age (years)	51.0 (39-64)	56.6 (23-67)	0.411
Male (n/%)	33 (58)	10 (41)	0.457
C-reactive protein (mg/L)	76 (37-183)	139 (50-240)	0.610
Hemoglobin (g/dl, mean)	10 (9-11)	11.5 (9-13)	0.007
Leukocytosis (x10 <sup>3</sup> /μl)	11 (7-14)	10 (5-13)	0.218
Platelets (x10 <sup>3</sup> /μl)	181 (137-251)	186 (115-267)	0.732
Creatinin (mg/dl)	1.08 (0.8/1.7)	0.97 (0.8/1.2)	1.000
<b>Microvesicles (counts/μL)</b>			
Leukocytes	560 (239-832)	313 (200-503)	0.032
Neutrophils	275 (138-478)	135 (94-265)	0.023
Monocytes	202 (121-428)	110 (82-210)	0.051
Lymphocytes	200 (130-303)	119 (58-241)	0.034
Erythrocytes	166 (85-305)	111 (58-217)	0.110
Endothelium	428 (244-728)	242 (212-380)	0.054
Platelets	536 (341-1119)	317 (218-492)	0.020

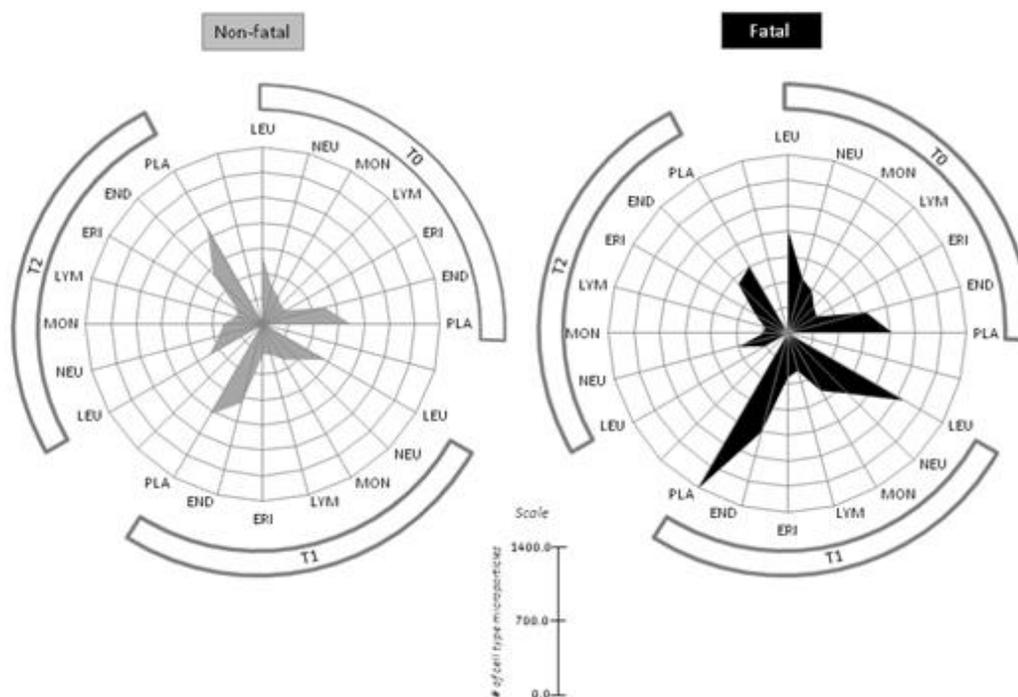
Data are expressed as the median (interquartile range).



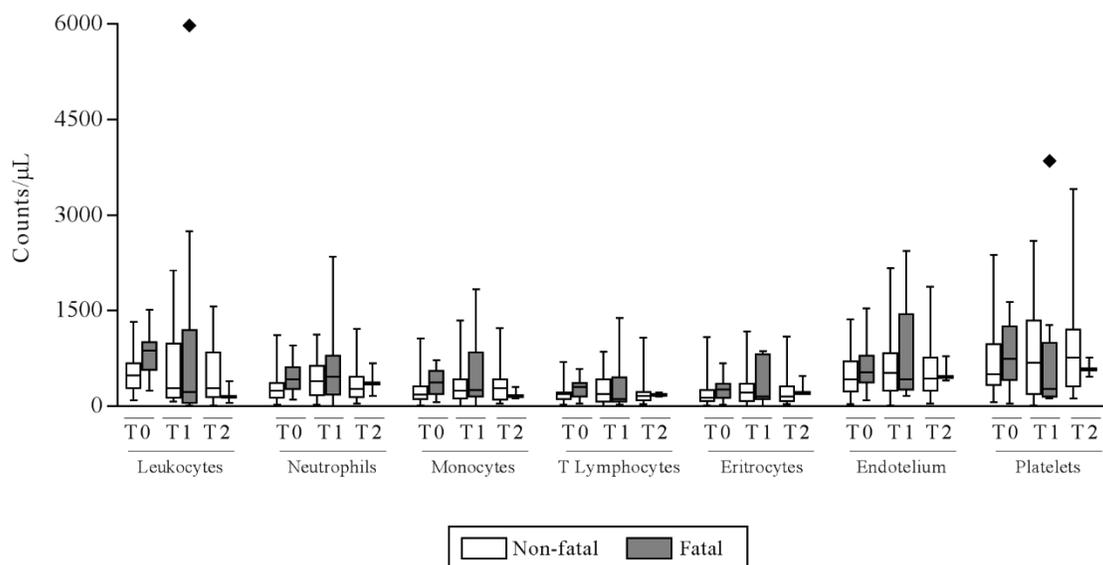
**Figure 1:** MVs levels from different phenotypes, at T0 (admission), T1 (two weeks of treatment) and T2 (end of treatment) in IE patients. Data are expressed as median. Leuk = microvesicles from leukocytes; Neut = microvesicles from neutrophils; Mono = microvesicles from monocytes; Lymph = microvesicles from T lymphocytes; Ery = microvesicles from erythrocytes; Endo = microvesicles from endothelium; Plt = microvesicles from platelets. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the times T0 and T1 are indicated by an asterisk above the symbol related to each group.



**Figure 2:** Comparison between levels of microvesicles (MVs) at T0 (admission), in infective endocarditis patients who survival (white bars) or died (grey bars) during hospitalization. The results are expressed as percentage in box plot format. The box extends from the 25th percentile to 75th percentile, with a horizontal line at the median (50th percentile). Whiskers extend from the lowest value to the 25th percentile and from the 75th percentile to the highest value, showing the range of data distribution. Statistical significance is indicated in each graph.



**Figure 3A:** Radar graphics showing MVs levels according to the cell origin at different times (T0, T1, T2) in survival and non-survival patients. T0 = admission; T1 = 2 weeks of treatment; T3 = end of treatment; Leu = MVs from leukocytes; Neu = MVs from neutrophils; Mon = MVs from monocytes; Lym= MVs from T lymphocytes; Eri = MVs from erythrocytes; End = MVs from endothelium; Pla = MVs from platelets.



**Figure 3B:** Kinetics of circulating microvesicles (MVs) from endocarditis patients, according to non-fatal and fatal cases at different times (T0, T1, T2). T0 = admission; T1 = 2 weeks of treatment; T2 = end of treatment. The results are expressed as percentage in box plot format. The box extends from the 25th percentile to 75th percentile, with a horizontal line at the median (50th percentile). Whiskers extend from the lowest value to the 25th percentile and from the 75th percentile to the highest value, showing the range of data distribution. Outliers values was plotted as individual points.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Um crescente corpo de evidências tem demonstrado o uso das MPs como biomarcadores promissores, nos mais variados contextos clínicos. Demonstramos sua aplicabilidade na EI. O emprego das MPs esbarra nas dificuldades impostas pela mensuração de vesículas de dimensões micrométricas, na falta de padronização e nos vários fatores analíticos e pré-analíticos que podem influenciar os resultados.

Explorar as possibilidades das MPs foi uma tarefa desafiadora. Tratava-se, para o autor, de campo praticamente desconhecido. Adentrar por esse mundo exigiu muita leitura e pesquisa. Ao final do trabalho, escrevendo sobre esses novos biomarcadores e fazendo uma interface clínica com uma doença de grande importância como a EI, senti os esforços recompensados.

## 8 CONCLUSÕES

As concentrações plasmáticas das MPs leucócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas foram significativamente mais elevadas nos pacientes com EI em relação à outras infecções bacterianas. Exceto pela elevação significativa das MPs derivadas dos leucócitos e neutrófilos ao final da segunda semana de tratamento, os níveis das MPs apresentaram um padrão relativamente estável ao longo dos três tempos avaliados. Todas as MPs derivadas dos leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos, e linfócitos estavam elevadas nos pacientes que progrediram para o óbito, comparando-se com os sobreviventes. As MPs apresentam um valor potencial na EI, auxiliando no diagnóstico diferencial com outras outras infecções bacterianas, e útil na identificação dos pacientes com maior risco de óbito.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nunes MCP, Gelape CL, Ferrari TCA. Profile of infective endocarditis at a tertiary care center in Brazil during a seven-year period: prognostic factors and in-hospital outcome. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(5):e394-e8.
2. Nunes MdCP, Gelape CL, Barbosa FBL, Leduc LR, Araújo CGd, Chalup LF, et al. Tratamento clínico de endocardite em prótese valvar complicada por abscesso para-protético. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2009;24:416-8.
3. Araújo IRd, Nunes MdCP, Gelape CL, Carvalho VT, Lacerda BERA, Oliveira GBd, et al. Challenge in the management of infective endocarditis with multiple valvular involvement. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45:272-4.
4. Nunes MdCP, Barbosa FBL, Gomes GHM, Bráulio R, Nicolliello MF, Ferrari TCA. Fatal right-sided endocarditis caused by *Fusarium* in an immunocompromised patient: a case report. *Mycoses*. 2011;54(5):460-2.
5. Nunes MdCP, Barbosa FBL, Gelape CL, Leduc LR, Castro LRA, Gresta LT, et al. Piercing-Related Endocarditis Presenting with Multiple Large Masses in the Right-Side Chamber of the Heart. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 21(6):776.e1-.e3.
6. Nunes MCP, de Araújo IR, de Carvalho AT, Andrade LA, Resende MHL, da Silva JLP, et al. Do Cytokines Play a Role in Predicting Some Features and Outcome in Infective Endocarditis? *Advances in Infectious Diseases*. 2013;3(02):115.
7. Araújo IR, Ferrari TCA, Teixeira-Carvalho A, Campi-Azevedo AC, Rodrigues LV, Júnior MHG, et al. Cytokine signature in infective endocarditis. *PloS one*. 2015;10(7):e0133631.
8. Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. *The Lancet*. 2015;387(10021):882-93.
9. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*. 2008;117(24):3118-25.
10. Werdan K, Dietz S, Löffler B, Niemann S, Bushnaq H, Silber R-E, et al. Mechanisms of infective endocarditis: pathogen-host interaction and risk states. *Nature Reviews Cardiology*. 2014;11(1):35-50.
11. Mooberry MJ, Key NS. Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytometry Part A*. 2016;89(2):111-22.
12. Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep*. 2008;60(1):75-84.
13. Mause SF, Weber C. Microparticles. Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. 2010;107(9):1047-57.
14. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*. 2015;4(1):27066.
15. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing A, Romijn F, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART-*. 2001;85(4):639-46.
16. Souza ACP, Yuen PS, Star RA. Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI. *Kidney international*. 2015;87(6):1100.
17. Zafrani L, Gerotziafas G, Byrnes C, Hu X, Perez J, Lévi C, et al. Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;185(7):744-55.
18. Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, et al. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive care medicine*. 2013;39(10):1695-703.
19. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberger D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(22):6830-40.
20. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet J-M, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000;101(8):841-3.
21. Takahashi T, Kubo H. The role of microparticles in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:303-14.

22. Deng F, Wang S, Zhang L. Endothelial Microparticles Act as Novel Diagnostic and Therapeutic Biomarkers of Diabetes and Its Complications: A Literature Review. *BioMed Research International*. 2016;2016.
23. Aharon A, Katzenell S, Tamari T, Brenner B. Microparticles bearing tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in gestational vascular complications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(6):1047-50.
24. Osler W. The Gulstonian lectures, on malignant endocarditis. *British medical journal*. 1885;1(1263):522.
25. Botelho-Nevers E, Thuny F, Casalta JP, Richet H, Gouriet F, Collart F, et al. Dramatic reduction in infective endocarditis-related mortality with a management-based approach. *Archives of Internal Medicine*. 2009;169(14):1290-8.
26. Abdulhak AAB, Baddour LM, Erwin PJ, Hoen B, Chu VH, Mensah GA, et al. Global and regional burden of infective endocarditis, 1990–2010: a systematic review of the literature. *Global heart*. 2014;9(1):131-43.
27. Tornos P, Gonzalez-Alujas T, Thuny F, Habib G. Infective endocarditis: the European viewpoint. *Current problems in cardiology*. 2011;36(5):175-222.
28. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, et al. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis–Prospective Cohort Study. *Archives of internal medicine*. 2009;169(5):463-73.
29. Duval X, Delahaye F, Alla F, Tattevin P, Obadia J-F, Le Moing V, et al. Temporal trends in infective endocarditis in the context of prophylaxis guideline modifications: three successive population-based surveys. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59(22):1968-76.
30. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, Doco-Lecompte T, Chirouze C, Iung B, et al. Preeminence of *Staphylococcus aureus* in infective endocarditis: a 1-year population-based survey. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;54(9):1230-9.
31. Tleyjeh IM, Abdel-Latif A, Rahbi H, Scott CG, Bailey KR, Steckelberg JM, et al. A systematic review of population-based studies of infective endocarditis. *CHEST Journal*. 2007;132(3):1025-35.
32. Cresti A, Chiavarelli M, Scalese M, Nencioni C, Valentini S, Guerrini F, et al. Epidemiological and mortality trends in infective endocarditis, a 17-year population-based prospective study. *Cardiovascular diagnosis and therapy*. 2017;7(1):27.
33. Siciliano RF, Castelli JB, Mansur AJ, Dos Santos FP, Colombo S, Do Nascimento EM, et al. *Bartonella* spp. and *Coxiella burnetii* associated with community-acquired, culture-negative endocarditis, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(8):1429.
34. Vogkou CT, Vlachogiannis NI, Palaiodimos L, Kousoulis AA. The causative agents in infective endocarditis: a systematic review comprising 33,214 cases. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2016;35(8):1227-45.
35. Fournier P-E, Thuny F, Richet H, Lepidi H, Casalta J-P, Arzouni J-P, et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clinical Infectious Diseases*. 2010;51(2):131-40.
36. Topan A, Carstina D, Slavcovici A, Rancea R, Capalneau R, Lupse M. Assessment of the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis after twenty-years. An analysis of 241 cases. *Clujul Medical*. 2015;88(3):321.
37. Hoen B, Duval X. Infective Endocarditis. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(15):1425-33.
38. Braunwald E, Bonow RO. *Braunwald's heart disease*. Elsevier Saunders; 2012.
39. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(2):167-93.
40. Tuchscherl L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(7):1031-40.
41. Martín S, Pérez A, Aldecoa C. Sepsis and immunosenescence in the elderly Patient: A Review. *Frontiers in Medicine*. 2017;4.
42. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. *Transplant international*. 2009;22(11):1041-50.
43. Wenisch C, Patruta S, Daxböck F, Krause R, Hörl W. Effect of age on human neutrophil function. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000;67(1):40-5.
44. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet infectious diseases*. 2005;5(11):685-94.
45. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(16):1546-54.
46. Fowler VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *Jama*. 2005;293(24):3012-21.

47. Durack DT, Lukes AS, Bright DK, Service DE. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. *The American journal of medicine*. 1994;96(3):200-9.
48. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. Infective endocarditis in adults: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications. *Circulation*. 2015;132(15):1435-86.
49. Habib G, Derumeaux G, Avierinos J-F, Casalta J-P, Jamal F, Volot F, et al. Value and limitations of the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999;33(7):2023-9.
50. Cecchi E, Parrini I, Chinaglia A, Pomari F, Brusasco G, Bobbio M, et al. New diagnostic criteria for infective endocarditis. *European heart journal*. 1997;18(7):1149-56.
51. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Ryan T, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clinical infectious diseases*. 2000;30(4):633-8.
52. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta J-P, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis. *European heart journal*. 2015;ehv319.
53. Champey J, Pavese P, Bouvaist H, Vittoz J-P, Tahon F, Eker OF, et al. Cerebral imaging in infectious endocarditis: a clinical study. *Infectious Diseases*. 2016;48(3):235-40.
54. Sonnevile R, Mirabel M, Hajage D, Tubach F, Vignon P, Perez P, et al. Neurologic complications and outcomes of infective endocarditis in critically ill patients: the ENDOcardite en REAnimation prospective multicenter study. *Critical care medicine*. 2011;39(6):1474-81.
55. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications. A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. 2015.
56. Evangelista A, Gonzalez-Alujas M. Echocardiography in infective endocarditis. *Heart*. 2004;90(6):614-7.
57. Snipsøyr MG, Ludvigsen M, Petersen E, Wiggers H, Honoré B. A systematic review of biomarkers in the diagnosis of infective endocarditis. *International journal of cardiology*. 2016;202:564-70.
58. Yu C-W, Juan L-I, Hsu S-C, Chen C-K, Wu C-W, Lee C-C, et al. Role of procalcitonin in the diagnosis of infective endocarditis: a meta-analysis. *The American journal of emergency medicine*. 2013;31(6):935-41.
59. Kahveci G, Bayrak F, Mutlu B, Bitigen A, Karaahmet T, Sonmez K, et al. Prognostic value of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with active infective endocarditis. *The American journal of cardiology*. 2007;99(10):1429-33.
60. Shiue AB, Stancoven AB, Purcell JB, Pinkston K, Wang A, Khera A, et al. Relation of level of B-type natriuretic peptide with outcomes in patients with infective endocarditis. *The American journal of cardiology*. 2010;106(7):1011-5.
61. Purcell JB, Patel M, Khera A, de Lemos JA, Forbess LW, Baker S, et al. Relation of troponin elevation to outcome in patients with infective endocarditis. *The American journal of cardiology*. 2008;101(10):1479-81.
62. Bjurman C, Snygg-Martin U, Olaison L, Fu ML, Hammarsten O. Cystatin C in a composite risk score for mortality in patients with infective endocarditis: a cohort study. *BMJ open*. 2012;2(4):e000856.
63. Vollmer T, Piper C, Kleesiek K, Dreier J. Lipopolysaccharide-binding protein: a new biomarker for infectious endocarditis? *Clinical chemistry*. 2009;55(2):295-304.
64. Thuny F, Textoris J, Amara AB, El Filali A, Capo C, Habib G, et al. The gene expression analysis of blood reveals S100A11 and AQP9 as potential biomarkers of infective endocarditis. *PLoS One*. 2012;7(2):e31490.
65. Söderquist B, Sundqvist K, Vikerfors T. Adhesion molecules (E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)) in sera from patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia with or without endocarditis. *Clinical and experimental immunology*. 1999;118(3):408.
66. Rawczynska-Englert I, Hryniewiecki T, Dzierzanowska D. Evaluation of serum cytokine concentrations in patients with infective endocarditis. *The Journal of heart valve disease*. 2000;9(5):705-9.
67. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews*. 2012;64(3):676-705.
68. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3:10.3402/jev.v3.26913.
69. Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*. 2013;2.
70. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of Wood. *Journal of Biological Chemistry*. 1946;166:189-97.
71. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*. 1967;13(3):269-88.

72. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006;20(5):847-56.
73. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood reviews*. 2007;21(3):157-71.
74. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *European journal of clinical investigation*. 2004;34(6):392-401.
75. Zhang Y, Meng H, Ma R, He Z, Wu X, Cao M, et al. Circulating microparticles, blood cells, and endothelium induce procoagulant activity in sepsis through phosphatidylserine exposure. *Shock*. 2016;45(3):299-307.
76. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *The Keio journal of medicine*. 2004;53(4):210-30.
77. Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood*. 1996;88(9):3456-64.
78. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015;4(1):27066.
79. Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Grützner S, Iberer M, Toth B, et al. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets*. 2011;22(2):111-6.
80. Willekens FL, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Döpp YA, van den Bos AG, et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*. 2005;105(5):2141-5.
81. Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H, Matsui Y, Ohara S, Imai T, et al. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *Journal of biotechnology*. 2013;165(2):77-84.
82. Owens AP, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circulation research*. 2011;108(10):1284-97.
83. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, et al. Platelet microparticle membranes have 50-to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*. 2007;97(3):425.
84. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet J-M, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1999;99(3):348-53.
85. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'fallon WM, Melton LJ. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Archives of internal medicine*. 2000;160(6):809-15.
86. Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature medicine*. 2000;6(7):769-75.
87. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2013;2(1):20360.
88. Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PloS one*. 2009;4(9):e7140.
89. Ismail N, Wang Y, Dakhllallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*. 2013;121(6):984-95.
90. Walters SB, Kieckbusch J, Nagalingam G, Swain A, Latham SL, Grau GER, et al. Microparticles from Mycobacteria-Infected Macrophages Promote Inflammation and Cellular Migration. *The Journal of Immunology*. 2013;190(2):669-77.
91. Timár CI, Lőrincz ÁM, Csépanyi-Kömi R, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzás EI, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*. 2013;121(3):510-8.
92. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*. 2004;104(8):2543-8.
93. Aline F, Bout D, Amigorena S, Roingeard P, Dimier-Poisson I. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infection and immunity*. 2004;72(7):4127-37.
94. Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *The Journal of Immunology*. 2012;188(4):1942-52.

95. Kim H, Song K, Park Y, Kang Y, Lee Y, Lee K, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *European Journal of Cancer*. 2003;39(2):184-91.
96. Campos FM, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Agnaldo Filho L, de Paula SC, Fontes CJ, et al. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malaria journal*. 2010;9(1):327.
97. Lopes-Bezerra L, Filler S. Endothelial cells, tissue factor and infectious diseases. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2003;36(8):987-91.
98. Kochtebane N, Passefort S, Choqueux C, Ainoun F, Achour L, Michel J-B, et al. Release of leukotriene B<sub>4</sub>, transforming growth factor-beta1 and microparticles in relation to aortic valve calcification. *The Journal of heart valve disease*. 2013;22(6):782-8.
99. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(2):138-50.
100. Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, et al. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Critical care medicine*. 2009;37(6):2045-50.
101. Densmore JC, Signorino PR, Ou J, Hatoum OA, Rowe JJ, Shi Y, et al. Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock*. 2006;26(5):464-71.
102. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Critical care medicine*. 2005;33(11):2540-6.
103. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, et al. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;178(11):1148-55.
104. Matsumoto H, Yamakawa K, Ogura H, Koh T, Matsumoto N, Shimazu T. Clinical Significance of Tissue Factor and CD13 Double-Positive Microparticles in SIRS Patients with Trauma and Severe Sepsis. *Shock*. 2017;47(4):409-15.
105. Tökés-Füzesi M, Woth G, Ernyey B, Vermes I, Mühl D, Bogár L, et al. Microparticles and acute renal dysfunction in septic patients. *Journal of critical care*. 2013;28(2):141-7.
106. Forest A, Pautas E, Ray P, Bonnet D, Verny M, Amabile N, et al. Circulating microparticles and procoagulant activity in elderly patients. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2009;65(4):414-20.
107. Sadallah S, Eken C, Martin PJ, Schifferli JA. Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2011;186(11):6543-52.
108. Dalli J, Norling LV, Renshaw D, Cooper D, Leung K-Y, Perretti M. Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood*. 2008;112(6):2512-9.
109. Rohde JM, Dimcheff DE, Blumberg N, Saint S, Langa KM, Kuhn L, et al. Health care-associated infection after red blood cell transfusion: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2014;311(13):1317-26.
110. Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney international*. 2012;82(4):412-27.
111. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Iacono ML, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007;110(7):2440-8.
112. Tempo JA, Englyst NA, Holloway JA, Smith DC. Platelet Microvesicles (Microparticles) in Cardiac Surgery. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. 2016;30(1):222-8.
113. Andersen KS, Nygreen EL, Grong K, Leirvaag B, Holmsen H. Comparison of the centrifugal and roller pump in elective coronary artery bypass surgery—a prospective, randomized study with special emphasis upon platelet activation. *Scandinavian Cardiovascular Journal*. 2003;37(6):356-62.
114. Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG, et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation*. 1997;96(10):3534-41.
115. Straub A, Breuer M, Wendel HP, Peter K, Dietz K, Ziemer G. Critical temperature ranges of hypothermia-induced platelet activation: possible implications for cooling patients in cardiac surgery. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;97(4):608-16.

116. Fu L, Hu X-X, Lin Z-B, Chang F-J, Ou Z-J, Wang Z-P, et al. Circulating microparticles from patients with valvular heart disease and cardiac surgery inhibit endothelium-dependent vasodilation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2015;150(3):666-72.
117. Vila-Liante V, Sánchez-López V, Martínez-Sales V, Ramón-Nuñez LA, Arellano-Orden E, Cano-Ruiz A, et al. Impact of sample processing on the measurement of circulating microparticles: storage and centrifugation parameters. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2016;54(11):1759-67.
118. Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, Woywodt A, Lovric S, Haller H, et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vascular health and risk management*. 2010;6:1125.
119. Erdbrügger U, Lannigan J. Analytical challenges of extracellular vesicle detection: a comparison of different techniques. *Cytometry Part A*. 2016;89(2):123-34.
120. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;10(3):437-46.
121. Lechner D, Weltermann A. Circulating tissue factor-exposing microparticles. *Thrombosis research*. 2008;122:S47-S54.
122. Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thrombosis research*. 2011;127(4):370-7.
123. Shah MD, Bergeron AL, Dong J-F, López JA. Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications. *Platelets*. 2008;19(5):365-72.
124. Trummer A, De Rop C, Tiede A, Ganser A, Eisert R. Recovery and composition of microparticles after snap-freezing depends on thawing temperature. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2009;20(1):52-6.
125. Combes V, Taylor TE, Juhan-Vague I, Mège J-L, Mwenechanya J, Tembo M, et al. Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe falciparum malaria complicated with coma. *Jama*. 2004;291(21):2542-4.
126. Couper KN, Barnes T, Hafalla JC, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog*. 2010;6(1):e1000744.
127. Faille D, Combes V, Mitchell AJ, Fontaine A, Juhan-Vague I, Alessi M-C, et al. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *The FASEB Journal*. 2009;23(10):3449-58.

## 10 APÊNDICES

### APÊNDICE A- Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com EI

Você, \_\_\_\_\_, paciente do Hospital das Clínicas da UFMG, está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa e tem o direito de saber sobre sua participação.

O objetivo desta pesquisa é estudar alguns aspectos da evolução de pacientes que, como você, foram acometidos por endocardite infecciosa (doença que acontece quando há uma infecção dentro do coração) ou infecção de dispositivo cardíaco (marcapasso, cardiodesfibrilador implantável ou resincronizador cardíaco). A pesquisa contribuirá para um melhor conhecimento dessa doença no nosso meio.

Para que este trabalho possa ser realizado, serão revisados os prontuários e analisados os dados clínicos e laboratoriais de pacientes acometidos por endocardite infecciosa tratados no Hospital das Clínicas da UFMG no período de 1995 - 2004 e a partir de 2005.

Todos estarão livres para decidir participar ou não desta pesquisa. Não haverá qualquer ônus nem compensação financeira para aqueles que concordarem em participar. Caberá aos participantes permitir a revisão do prontuário e a utilização de seus dados clínicos e laboratoriais na pesquisa, bem como e concordar com a coleta de uma amostra de 5 mL de sangue para a realização de dosagem de substâncias envolvidas no processo inflamatório.

Será utilizado material estéril e descartável para a coleta de sangue, que será feita por profissional experiente. A coleta de sangue causa apenas um pequeno desconforto pela picada da agulha, associando-se a risco mínimo de infecção.

Todos os indivíduos têm o direito de se recusar a participar da pesquisa, bem como de desistir da participação, caso tenham concordado inicialmente. Não haverá qualquer comprometimento da sua assistência no caso de recusa ou desistência.

Os pesquisadores assumem o compromisso de utilizar os dados coletados somente para esta pesquisa. Os resultados da pesquisa serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Você poderá fazer contato com as pesquisadoras Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo Pereira Nunes, pelo telefone (31)9951-0773 e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Teresa Cristina de Abreu Ferrari, pelo telefone (31) 9984-6725, sempre que julgar necessário.

#### **Caso aceite participar, é necessário que você assine o termo de consentimento abaixo:**

Eu, \_\_\_\_\_, registro número \_\_\_\_\_ no Hospital das Clínicas da UFMG, após ter sido esclarecido(a) sobre a pesquisa, aceito em participar voluntariamente do estudo, concordando com o uso, na pesquisa, das minhas informações clínicas e laboratoriais.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho a garantia de acesso ao tratamento e ao acompanhamento médico e hospitalar quando necessário, independente da minha participação ou não nessa pesquisa.

---

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

Data

---

Assinatura da testemunha

Data

---

Assinatura do médico

Data

APÊNDICE B- Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com outras infecções bacterianas

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você, \_\_\_\_\_, está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa e tem o direito de saber sobre sua participação.

O objetivo desta pesquisa é estudar alguns aspectos da evolução de pacientes que foram acometidos por endocardite infecciosa (doença que acontece quando há uma infecção dentro do coração), o que contribuirá para um melhor conhecimento dessa doença no nosso meio.

Para que este trabalho possa ser realizado, serão analisados os dados clínicos e laboratoriais de três grupos de pacientes. O primeiro grupo incluirá pacientes acometidos por endocardite infecciosa no período de 2005– 2013. O segundo grupo será formado por pacientes com outras causas de febre diferentes de endocardite e por pacientes com suspeita não confirmada de endocardite. O terceiro grupo será constituído por indivíduos saudáveis. Posteriormente os dados destes grupos serão comparados.

Todos estarão livres para decidir participar ou não desta pesquisa. Não haverá qualquer ônus nem compensação financeira para aqueles que concordarem em participar. Caberá aos participantes permitir a revisão do prontuário e a utilização de seus dados clínicos e laboratoriais na pesquisa, bem como e concordar com a coleta de amostras de 20 mL de sangue para a realização de dosagem de substâncias envolvidas no processo inflamatório.

Será utilizado material estéril e descartável para a coleta de sangue, que será feita por profissional treinado. A coleta de sangue causa apenas um pequeno desconforto pela picada da agulha, associando-se a risco mínimo de infecção.

Todos os indivíduos têm o direito de se recusar a participar da pesquisa, bem como de desistir da participação, caso tenham concordado inicialmente. Não haverá qualquer comprometimento da sua assistência no caso de recusa ou desistência.

Os pesquisadores assumem o compromisso de utilizar os dados coletados somente para esta pesquisa. Os resultados da pesquisa serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Você poderá fazer contato com as pesquisadoras, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria do Carmo Pereira Nunes, pelo telefone (31)9951-0773 e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Teresa Cristina de Abreu Ferrari, pelo telefone (31) 9984-6725, sempre que julgar necessário.

### **Caso aceite participar, é necessário que você assine o termo de consentimento abaixo:**

Eu, \_\_\_\_\_, registro número \_\_\_\_\_ no Hospital \_\_\_\_\_, após ter sido esclarecido(a) sobre a pesquisa, aceito em participar voluntariamente do estudo, concordando com o uso, na pesquisa, das minhas informações clínicas e laboratoriais.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho a garantia de acesso ao tratamento e ao acompanhamento médico e hospitalar quando necessário, independente da minha participação ou não nessa pesquisa.



## APÊNDICE C – Protocolo de coleta de dados

## PROTOCOLO DO ESTUDO SOBRE ENDOCARDITE INFECCIOSA

IDENTIFICAÇÃO RESPONSÁVEL:

Coletas: T0: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

T ½: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

TF: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome:		Número:	
Data Nascimento:	Idade: anos	Sexo: 1- M     2- F	
Instituição:	Prontuário:		
Logradouro:			
Cidade:	CEP:		
Naturalidade:			
Telefone FIXO:	Contato:		
Data da Internação:	Data do diagnóstico:	Data da Alta/Óbito:	
Óbito: 1- S     2- N     : Mecanismo do óbito:			

## HISTÓRIA CLÍNICA:

<b>Condição Predisponente</b>					
1 - Doença Reumática	2 - Prótese	3 - Dispositivos	4 – Doenças sistêmicas	5 – Não identificada	<input type="checkbox"/>
<b>Fatores Predisponentes Cardiovasculares</b>					
<b>Doença Reumática</b>	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>
	1- Mitral	2- Aórtica	3- Mitro-Aórtica	4- Outras	5- Ignorado
<b>Prolapso de Valva Mitral</b>	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>
	1- Sem Regurgitação		2- Reg Leve	3- Moderado / Grave	
<b>Doença Valvar Degenerativa</b>	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>
	1- Aórtica		2- Mitral		<input type="checkbox"/>
<b>Prótese Valvar</b>	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>
	1- Biológica		2- Mecânica		<input type="checkbox"/>
	1- Mitral		2- Aórtica	3- Mitro-Aórtica	4- Tricúspide
<b>Motivo de implante da prótese</b>	1 –Valvopatia Reumática	2 – Doença valvar degenerativa	3 – Prolapso de valva mitral	4 – Doença aórtica bicúspide	
<b>Tempo de implante da prótese</b>	1 – Início < 2 meses	2 – Entre 2 e 12 meses	3 - > 12 meses		<input type="checkbox"/>
<b>Tempo de implante da prótese (meses)</b>	meses				<input type="checkbox"/>
<b>IM isquêmica</b>	1 - Sim		2 - Não		<input type="checkbox"/>
<b>Dispositivos</b>	1- Marcapasso	2- CDI	3 - Nenhum	4- Ressincronizador	
<b>Cardiopatia Congênita</b>	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>

Fatores Predisponentes Sistêmicos / Comorbidades

Fatores Predisponentes Sistêmicos / Comorbidades				
<b>Endocardite prévia</b>	<b>1- Sim</b>	<b>2- Não</b>	<b>Data:</b>	<input type="text"/>
<b>HIV</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
<b>Uso de Droga</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
<b>Diabetes Mellitus</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
<b>Uso de Imunossupressores</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
<b>IRC</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
<b>Uso de Cateter Venoso Central</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
<b>Insuficiência Hepática</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>

<b>Fonte de Bacteremia:</b>	1- Identificada	2- Não Identificada		<input type="text"/>
Manipulação do TGI		1- Sim	2- Não	<input type="text"/>
Cavidade Oral		1- Sim	2- Não	<input type="text"/>
Pele		1- Sim	2- Não	<input type="text"/>
Ferida Operatória		1- Sim	2- Não	<input type="text"/>
Manipulação Genito-urinária		1- Sim	2- Não	<input type="text"/>
Outras Infecções. Qual? _____		1- Sim	2- Não	<input type="text"/>

Manifestações Clínicas				
<b>Febre</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
	Duração da Febre Prévia (Semanas):			
	Intensidade:			
<b>Anorexia/Hiporexia</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
	Duração: 1 mês			<input type="text"/>
<b>Emagrecimento</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
	Quantidade de Massa Perdida em Kg:			<input type="text"/>
	Em Quanto Tempo:			<input type="text"/>
<b>Sudorese</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
<b>Evento Neurológico</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
	1-Isquêmico	2-Hemorrágico	3- Outra manifestação	<input type="text"/>
<b>Evento Embólico</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
	1- Baço	2- Rim	3- Extremidade	4- Outros
<b>Manif. Músculo-Esqueléticas</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
<b>Manifestações Oculares</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
<b>Sopro</b>	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
Sinais Periféricos de Endocardite Infecçiosa:				
Hemorragia Ungueal	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>
Petéquias conjuntiva/mucosas	1- Sim	2- Não		<input type="text"/>

Petéquias conjuntiva/mucosas		1- Sim	2- Não	<input type="checkbox"/>	
Nódulos de Osler		1- Sim	2- Não	<input type="checkbox"/>	
Lesões de Janeway		1- Sim	2- Não	<input type="checkbox"/>	
Esplenomegalia		1- Sim	2- Não	<input type="checkbox"/>	
<b>Insuficiência Cardíaca</b>		1- Sim	2- Não	<input type="checkbox"/>	
Início	Prévio	1- Sim	2- Não	<input type="checkbox"/>	
	Durante	1- Sim	2- Não	<input type="checkbox"/>	
Evolução	1- Estável	2- Agravado	3- Refratário	<input type="checkbox"/>	
<b>Manifestação Clínica Inicial</b>		1- Sim	2- Não	<input type="checkbox"/>	
Qual? (Escrever uma das acima)					
Tempo Entre a Manifestação Clínica Inicial e o Diagnóstico:			___ dias		
<b>Crítérios de Duke:</b>	1- 2 maiores	2- 1 maior e 3 menores	3- 5 menores	4- EI possível (1> e 1< ou 3<)	<input type="checkbox"/>
<b>Endocardite por marcapasso</b>	1 – Sim		2 - Não	<input type="checkbox"/>	

<b>Exames Laboratoriais ao diagnóstico e durante evolução semanal</b>						
<b>Anemia</b>	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>	
<b>Anemia (data e valor)</b>						
<b>Leucocitose</b>	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>	
<b>Leucocitose global (data e valor)</b>						
<b>PCR (valor)</b>						
<b>VHS (valor)</b>						
<b>Fator Reumatóide</b>	1- Positivo		2- Negativo		<input type="checkbox"/>	
<b>Urina Rotina Alterada</b>	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>	
Hematúria	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>	
Proteinúria	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>	
Creatinina:						
Uréia						
K+						
Na+						
Outros exames alterados:						
<b>Hemocultura</b>	1- Positiva		2- Negativa		<input type="checkbox"/>	
Uso Prévio de Antibiótico	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>	
Quando?	1 - No Último Mês		2 – Nas Duas Últimas Semanas		<input type="checkbox"/>	
Agente Etiológico	1 - Streptococcus _____ 2 - Staphylococcus aureus 3 - Staphylococcus - Coagulase Negativo 4 - Enterococcus _____ 5 - BGN _____ 6 – Fungos			7 - HACEK 8 - Difteróides 9 - Polimicrobiano 10- Não Identificado 11- Ignorado		<input type="checkbox"/>

Tratamento					
<b>Antibioticoterapia</b>	1- Sim		2- Não		<input type="checkbox"/>
	_____				<input type="checkbox"/>
<b>Cirurgia</b>	1- Sim		2- Não		Data: _____
<b>Crítérios de Indicação</b>	1- IC	2- Infecção não controlada	3- Embolia de Repetição	4- Retirada de MP	5-Outras: _____
<b>Complicações na cirurgia</b>	1- Morte		2 - Infecção	3 - AVC	4-Outras: _Tamponamento cardíaco _____
<b>Evolução durante internação</b>	Escrever: _____				
<b>Exame Anátomo-patológico:</b>	Escrever: _____				

Evolução Clínica / Complicações Após o Início do Tratamento			
<b>Cardíacas</b>	1- Sim		2- Não
<b>Neurológicas</b>	1- Sim		2- Não
<b>Êmbolos Sistêmicos</b>	1- Sim		2- Não
<b>Febre Prolongada (&gt;10 dias)</b>	1- Sim		2- Não
<b>Defervescência</b>	Quantos Dias? _____		
<b>Complicações intra-hospitalares:</b>			

<b>ECOCARDIOGRAMA</b>	<b>DATA:</b>		<b>Modalidade: 1 - ETT 2 – ETE</b>			
<b>Vegetação</b>	1- Presente	2- Ausente	3- Questionável			
<b>Extensão</b>	1-Única	2-Múltipla em um folheto	3- Múltiplos Folhetos	4-Estrutura Extra-Valvar		
<b>Mobilidade</b>	1-Fixa	2- Base Fixa	3- Pedunculada	4- Prolapsante		
<b>Localização (1)</b>	1-Mitral	2-Aórtica	3-Tricúspide	4- Outras: escrever		
<b>Localização (2)</b>	1- Prótese Mitral	2- Prótese Aórtica	3- MP	4- CDI	5- Cateter	
<b>Tamanho</b>	Valor (mm): _____ milímetros					
<b>Tamanho</b>	1- <5 mm	2- 5-10 mm	3- >10 mm	4- Sem descrição		
<b>Densidade</b>	1- Calcificada	2- Parcialmente Calcificada	3- Mais Densa que o Miocárdio	4- Igual ao Miocárdio		
<b>Complicações</b>	1- Ruptura Cordoalha	2- Perfuração de Folheto	3- Disfunção Protética ("Leak")	4- Fístulas	5-Abscesso	6-Outras (escrever)
<b>Evolução do Eco</b>	Escrever os detalhes do novo Eco					

Seguimento do paciente: 6 meses – 1 ano pós-alta.						
<b>Contato:</b>	Data:			Tempo pós-alta (meses):		
<b>Eventos</b>	0 - Nenhum	1 – Evento embólico	2- IC	3 – Troca valvar	4 - Óbito	5 - Desconhecido
<b>Óbito</b>	Data:			Mecanismo:		
<b>Cirurgia</b>	1-Sim. Qual?			2-Não		
<b>Comentários</b>	_____					

## 11 ANEXOS

### ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG

 Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

**Parecer nº. ETIC 412/06**

**Interessada: Profa. Maria do Carmo Pereira Nunes**  
**Departamento de Clínica Médica**  
**Faculdade de Medicina-UFMG**

---

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou *ad referendum*, no dia 14 de janeiro de 2007, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "Perfil clínico da endocardite infecciosa no Hospital das Clínicas da UFMG" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
Presidente do COEP/UFMG