

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

**Perfil das Citocinas na Endocardite
Infecciosa**

IZABELLA RODRIGUES DE ARAÚJO

BELO HORIZONTE

2014

IZABELLA RODRIGUES DE ARAÚJO

Perfil das Citocinas 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 para a obtenção do
título de mestre.

Orientador: Profa. Maria do Carmo
Pereira Nunes

Coorientador: Profa. Teresa Cristina
Abreu Ferrari

Belo Horizonte

2014

ii

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Professor Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitor

Professora Rocksane de Carvalho Norton

Pró-reitor de Pós-Graduação

Professor Ricardo Santiago Gomes

Pró-reitor de Pesquisa

Professor Renato de Lima Santos

Diretor da Faculdade de Medicina

Professor Francisco José Penna

Vice-diretor da Faculdade de Medicina

Professor Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Professor Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação

Professora Teresa Cristina Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Professor Ricardo de Menezes Macedo

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde- Infectologia e Medicina Tropical

Professor Vandack Alencar Nobre Júnior

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde- Infectologia e Medicina Tropical

Professor Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Professora Denise Utsch Gonçalves

Professor Manoel Otávio da Costa Rocha

Professora Mariângela Carneiro

Professor Vandack Alencar Nobre Júnior

Paula Souza Lage Carvalho (representante discente)

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Pai generoso que nos presenteia sempre com novas oportunidades de trabalho e aprendizado.

Agradeço, com carinho, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse projeto, e em especial:

À Professora Maria do Carmo Pereira Nunes, pelo incentivo inicial à pesquisa e pelo exemplo de dedicação e entusiasmo.

À Professora Teresa Cristina Abreu Ferrari, pela participação ativa e precisa, nos inspirando com sua competência e disciplina.

Aos acadêmicos Luan Vieira Rodrigues e Thaís Lins de Souza Barros, pela colaboração atenciosa e eficiente.

À biomédica Luciene de Fátima Carmo, pela disponibilidade e pelo exemplo de coragem e determinação.

À equipe de Cardiologia do Hospital das Clínicas, pela contribuição essencial para minha formação e pela excelência no atendimento aos pacientes.

À equipe de Cardiologia do Hospital São Francisco de Assis e à equipe de Cardiologia da Santa Casa de Belo Horizonte, pela receptividade e pela cooperação.

Ao Colegiado de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical, pelo aprendizado.

Aos funcionários do laboratório do Hospital das Clínicas da UFMG, pelo auxílio fraterno.

À equipe do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas), pela participação decisiva.

A todos os pacientes avaliados, que nos surpreenderam com sua generosidade, força e resignação.

A todos os voluntários, que mostraram desprendimento e compreensão.

À minha família, pelo suporte constante, fonte de afeto e inspiração.

Ao Eduardo, pelo apoio carinhoso e por tornar a minha vida mais leve e feliz.

EPÍGRAFE

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A mágica presença das estrelas!”

Mario Quintana

RESUMO

Introdução: A endocardite infecciosa (EI) é uma doença grave, associada a altas taxas de mortalidade apesar de avanços recentes dos métodos diagnósticos e terapêuticos. Citocinas, mediadores séricos da inflamação, podem contribuir para o diagnóstico e manejo da EI. O presente estudo avaliou a dosagem sérica de algumas citocinas em pacientes com EI e comparou esses valores com os níveis séricos desses marcadores em indivíduos saudáveis e em pacientes acometidos por infecções ativas, diferentes de EI, com o objetivo de explorar o perfil das citocinas na EI e em diferentes processos infecciosos. **Métodos:** Foram incluídos 81 pacientes admitidos no Hospital das Clínicas da UFMG com EI definitiva segundo os critérios de Duke. As amostras de sangue desses pacientes foram colhidas em até uma semana após a admissão para dosagem sérica de diversas citocinas. Dois grupos controle foram selecionados para a comparação dos níveis séricos de citocinas. O primeiro grupo foi constituído de 34 indivíduos saudáveis e o segundo grupo foi constituído de 30 pacientes com infecções ativas, diferentes de EI. As amostras séricas obtidas dos pacientes com EI e dos controles foram analisadas por meio da técnica *cytometric bead array* (CBA) para a dosagem das interleucinas (IL) 1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). **Resultados:** A idade dos pacientes com EI foi 47 ± 17 anos, e 40 indivíduos eram homens. A condição predisponente mais comum foi prótese valvar (33.3%), e os microorganismos causadores predominantes foram os estafilococos (19.7%). Exceto por IL-12, os pacientes com EI apresentaram níveis séricos de citocinas significativamente maiores do que os controles saudáveis. Os níveis séricos de IL-1 β , TNF- α e IL-12 foram maiores em pacientes com EI do que em pacientes com outras infecções. Quando o grupo de pacientes com EI foi estratificado de acordo com o agente etiológico, os níveis de TNF- α e IL-12 foram significativamente maiores na EI causada por estafilococos do que nos outros subgrupos. **Conclusões:** A dosagem de citocinas apresentou-se elevada na EI em comparação com os controles saudáveis. Os níveis séricos de IL-1 β , TNF- α e IL-12 foram mais altos na EI do que em outras infecções ativas. Concentrações mais baixas de IL-10 foram observadas na EI por estafilococos, quando comparada com EI causada por outros agentes etiológicos e uma prevalência elevada de altos produtores de IL-1 β , TNF- α e IL-12 foi observada somente na EI por estafilococos.

ABSTRACT

Background Infective endocarditis (IE) is a severe disease associated with a high mortality rate despite recent advances in its diagnosis and treatment. Cytokines, serum inflammatory mediators, may contribute to the diagnosis and management of IE. The aim of the present study was to determine serum cytokine concentrations in patients with IE and to compare the levels of these markers with healthy subjects and a group of patients with non-IE infections. **Methods** Eighty-one patients with definite IE according to Duke's Criteria were enrolled between January 2005 and May 2013 in University Hospital, Federal University of Minas Gerais. Serum samples of all patients were obtained within the first week of admission to assess the concentrations of several cytokines. In order to explore the profile of cytokines in different infectious processes, two control groups were selected. The first group consisted of 34 healthy individuals who are volunteers, and the second group was comprised of 30 patients with non-IE infections. Serum samples from patients with IE and from controls were analyzed for the following markers: interleukin (IL) 1β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Cytokine concentrations were measured by cytometric bead array (CBA). **Results** Mean age of IE was 47 ± 17 years (range, 15 - 80 years), and 40 (49%) individuals were male. The most common underlying heart disease was the presence of valvular prosthesis (33.3%). The main causative microorganisms were staphylococci (19.7%). Culture-negative endocarditis occurred in 44 patients (54%). Except for IL-12, patients with IE had significantly higher serum concentrations of the mediators than healthy volunteers' serum. Median of IL 1β , TNF- α and IL-12 serum levels were significantly higher in IE patients than in patients with non-IE infections. When IE group was stratified according to the infecting microorganism, serum concentrations of TNF- α and IL-12 were significantly higher in staphylococcal IE subgroup than in the non-staphylococcal IE group. **Conclusions** Cytokines were elevated in the IE in comparison to healthy controls. Median IL- 1β , TNF- α and IL-12 serum levels were significantly higher in IE than in non-IE infections. Lower IL-10 production occurred in staphylococcal IE, compared to non-staphylococcal IE and an elevated prevalence of higher producers of IL- 1β , TNF- α and IL-12 was observed only in staphylococcal subgroup.

Key-words: cytokines; endocarditis; inflammatory markers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Serum concentrations of inflammatory cytokines in study groups.....	100
Figura 2	Higher producers of immunological biomarkers.....	101
Figura 3	Serum concentrations of inflammatory cytokines in the patients with IE stratified according to the microorganisms	101
Figura 4	Higher Producers of immunological biomarkers in IE subgroups.....	102

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 2.1	Classificação da endocardite infecciosa conforme modo de aquisição.....	3
Quadro 2.2	Classes funcionais das citocinas.....	32
Quadro 2.3	Membros da família IL-1 (IL-1F)	51
Tabela 5.1	Baseline Characteristics of the Patients with IE.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA- *Cytometric Bead Array*

CLMF- fator de maturação de linfócitos citotóxicos

DNA- ácido desoxirribonucléico

EBV- vírus Epstein-Barr

EI- endocardite infecciosa

ETE- ecocardiograma transesofágico

ETT- ecocardiograma transtorácico

FDA- *Food and Drug Administration*

F18-FDG PET/CT- tomografia por emissão de pósitrons com flúor-18 fludeoxiglicose como marcador

g- gramas

G-CSF- fator estimulador de colônias de granulócitos

GM-CSF- fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos

h- horas

HIV- vírus da imunodeficiência humana

IC- insuficiência cardíaca

IFN- interferon

IL- interleucina

IL-1F- família IL-1

IL-1Ra- antagonista do receptor de IL-1

IL-6R- receptor de IL-6

IL-2R- receptor solúvel de IL-2

ITU- infecção ativa do trato urinário

KDa- quilodalton

LPS- lipopolissacarídeos

M-CSF- fator estimulador de colônias de macrófagos

mg- miligrama

MHC- complexo principal de histocompatibilidade

ml- mililitro

mm- milímetro

mm³- milímetro cúbico

MRSA- *S.aureus* resistente a metilina

NK- *natural killer*

NKSF- fator estimulador das células NK

°C– graus centígrados

PBMC- células sanguíneas mononucleares periféricas

PCR- reação em cadeia da polimerase

pg- picogramas

RNA – ácido ribonucléico

RNM- ressonância nuclear magnética

sIL-6R- receptor solúvel de IL-6

SIRS- síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TC- tomografia computadorizada

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

Th- *T helper* (linfócito)

TNF- fator de necrose tumoral

TRL- toll-like receptors

VHS- velocidade de hemossedimentação

μL- microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO.....	2
2.1	Endocardite infecciosa.....	2
2.1.1	Definição.....	2
2.1.2	Classificação.....	2
2.1.3	Epidemiologia.....	4
2.1.4	Microbiologia.....	5
2.1.5	Patogenia.....	7
2.1.6	Diagnóstico.....	9
a)	Diagnóstico clínico.....	9
b)	Diagnóstico ecocardiográfico e o papel de outros exames de imagem.....	11
c)	Diagnóstico microbiológico.....	15
d)	CrITÉRIOS diagnÓsticos.....	17
2.1.7	Tratamento.....	20
a)	Terapia antibiótica.....	20
b)	Tratamento cirúrgico.....	23
c)	Terapia antitrombótica.....	26
2.1.8	Profilaxia.....	27
2.1.9	Conclusão.....	28
2.2	Citocinas.....	29
2.2.1	Definição.....	29
2.2.2	HistÓrico.....	30
2.2.3	Nomenclatura e classificaçÓo.....	31
2.2.4	Propriedades das citocinas.....	35
2.2.5	ProduçÓo.....	37
2.2.6	Receptores.....	39
2.2.7	FunçÓes biolÓgicas das citocinas: uma visÓo geral.....	41
2.2.8	A resposta inflamatÓria e as principais citocinas envolvidas.....	44
a)	Fator de necrose tumoral- α (TNF- α).....	46

b) Interleucina-1 β (IL-1 β)	50
c) Interleucina -6 (IL-6)	53
d) Interleucina-12 (IL-12)	56
e) Interleucina-8 (IL-8)	58
f) Interleucina-10 (IL-10)	61
2.3 Endocardite infecciosa e citocinas.....	65
2.3.1 Citocinas envolvidas com a resposta inflamatória e fisiopatologia da endocardite infecciosa.....	65
2.3.2 Citocinas como ferramentas para diagnóstico e prognóstico da EI e como marcadoras da atividade da doença.....	68
3 OBJETIVOS.....	77
3.1 Objetivo geral.....	77
3.2 Objetivos específicos.....	77
4 MÉTODO.....	78
4.1 Definições.....	78
4.1.1 Definição de endocardite infecciosa.....	78
4.1.2 Definição de EI definitiva, possível e rejeitada.....	78
4.1.3 Definição de intercorrências de EI durante a internação.....	79
4.2 Delineamento do estudo.....	79
4.3 Critérios de inclusão.....	80
4.4 Critérios de exclusão.....	81
4.5 Recrutamento.....	81
4.6 Dosagem das citocinas.....	83
4.7 Local do desenvolvimento do estudo.....	85
4.8 Cálculo do tamanho amostral.....	86
4.9 Análise estatística.....	87
4.10 Aspectos éticos.....	88
4.11 Pesquisa e normalização bibliográfica.....	88
5 RESULTADOS.....	89
5.1 Artigo científico.....	89
6 LIMITAÇÕES.....	107
7 PROPOSIÇÕES.....	108
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109

9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
10	APÊNDICES.....	125
	APÊNDICE A- Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com EI.....	125
	APÊNDICE B- Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos saudáveis.....	127
	APÊNDICE C- Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com suspeita não confirmada de EI ou síndromes febris de origem infecciosa, cuja causa seja diferente de EI.....	129
	APÊNDICE D- Questionário para seleção de controles saudáveis.....	131
	APÊNDICE E- Protocolo de coleta de dados.....	133
11	ANEXOS.....	137
	ANEXO A- Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-UFMG.....	137
	ANEXO B- Cópia da ata da defesa.....	138
	ANEXO C- Declaração de aprovação.....	139

Este projeto recebeu apoio financeiro do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais.

1 INTRODUÇÃO

A endocardite infecciosa (EI) é uma doença grave, ainda caracterizada por altas taxas de mortalidade. (1) Estudos populacionais recentes realizados em países industrializados evidenciaram mortalidade intra-hospitalar elevada, variando de 15 a 22%, e uma taxa de mortalidade em 5 anos de aproximadamente 40%. (1) Apesar dos avanços nos cuidados à saúde, a sua incidência não se alterou nas últimas duas décadas, devido às modificações progressivas dos fatores de risco. A mudança nas características epidemiológicas da EI nos países desenvolvidos ocorreu pelo aumento da longevidade, novos fatores predisponentes e aumento dos casos de infecção nosocomial. (2)

A apresentação clínica da doença é variável, sofrendo influência do agente etiológico, tempo de evolução, características do paciente (idade, condição predisponente, comorbidades). O reconhecimento da doença e a condução dos casos constituem frequentemente desafios para a prática clínica. (2)

Atualmente vem ganhando destaque a pesquisa de elementos presentes no soro e no plasma relacionados à resposta inflamatória. Estas substâncias, como as citocinas, seriam potenciais preditores do prognóstico na EI, auxiliando no diagnóstico e monitoramento dos pacientes. É neste contexto que se insere a presente investigação, que teve como objetivo caracterizar o perfil de citocinas na EI.

2 REVISÃO

2.1 Endocardite Infecçiosa

2.1.1 Definição

A EI é uma infecção microbiana da superfície endotelial do coração. As valvas cardíacas são envolvidas com maior frequência; no entanto, a infecção pode ocorrer em um defeito septal, nos cordões tendíneos ou no endocárdio mural. Embora as infecções de *shunts* arteriovenosos, *shunts* arterioarteriais (exemplo: ducto arterial patente), ou coarctação de aorta sejam, na realidade, endarterites, são clínica e patologicamente semelhantes à EI. (3) Outros sítios possíveis de infecção são materiais cirúrgicos intracardíacos e dispositivos (marcapasso, cardiodesfibrilador implantável, ressinchronizador). (2)

2.1.2 Classificação

A EI foi historicamente classificada como aguda e subaguda. O termo EI aguda se referia ao quadro clínico caracterizado por toxicidade acentuada e evolução ao longo de dias até semanas para a destruição valvar. (3) O termo EI subaguda era destinado aos casos de evolução lenta, ao longo de semanas a meses. A EI aguda era atribuída, embora não de forma exclusiva, à infecção por *Staphylococcus aureus*. A EI subaguda teria maior probabilidade de ser causada por estreptococos viridans, enterococos, estafilococos coagulase-negativos ou cocobacilos Gram-negativos. (3)

Atualmente, tal classificação vem caindo em desuso, diante da ampla variedade de apresentações da doença, nem sempre compatíveis com as definições originais. Diante desta crescente diversidade de situações clínicas e como uma tentativa de evitar sobreposições, as diretrizes mais recentes da Sociedade Européia de Cardiologia sobre a prevenção, diagnóstico e tratamento da EI (2) propuseram a separação em quatro categorias de EI, considerando o sítio de infecção e a presença ou ausência de

dispositivos intracardíacos. Estas categorias são: EI de valvas nativas de câmaras cardíacas esquerdas, EI de valvas protéticas de câmaras cardíacas esquerdas, EI de câmaras cardíacas direitas, EI relacionada a dispositivos intracardíacos (com ou sem envolvimento valvar). A categoria “EI de valvas protéticas de câmaras cardíacas esquerdas” é subdividida em EI de valva protética precoce (<1 ano após cirurgia valvar) e EI de valva protética tardia (>1 ano após cirurgia valvar). (2)

A mesma diretriz também sugere uma classificação baseada na maneira de aquisição da doença, exposta no Quadro 2.1. (2)

Quadro 2.1 Classificação da endocardite infecciosa conforme modo de aquisição

Classificação	Definição
Relacionada à assistência médica, nosocomial	EI em paciente hospitalizado > 48h antes do surgimento de sinais e sintomas consistentes com EI
Relacionada à assistência médica, não nosocomial	Sinais e sintomas de EI iniciando-se < 48h da admissão de paciente com contato prévio com assistência médica*
Adquirida na comunidade	Sinais e sintomas de EI iniciando-se <48h da admissão de paciente sem contato prévio com assistência médica
Associada ao abuso de drogas	EI em usuário de drogas endovenosas sem fonte alternativa de infecção

Fonte: Habib *et al.*, 2009. (2)

Nota: EI: endocardite infecciosa; *o termo “contato prévio com assistência médica” abrange as seguintes situações: assistência domiciliar de enfermagem ou terapia endovenosa, hemodiálise ou quimioterapia endovenosa 30 dias antes do surgimento de sinais e sintomas de EI; hospitalização em pronto atendimento 90 dias antes do surgimento de sinais e sintomas de EI; pacientes institucionalizados.

São também mencionadas na referida diretriz (2) as classificações: “EI ativa” e “recorrência de EI”. A primeira reúne as seguintes situações: pacientes com febre persistente e hemoculturas positivas, achado à cirurgia de morfologia compatível com inflamação em atividade, pacientes ainda sob terapia antimicrobiana e evidência

histopatológica de EI em atividade. A segunda classificação é subdividida em “recidiva” (episódios repetidos de EI causados pelo mesmo microorganismo menos de seis meses após o episódio inicial) e “reinfecção” (infecção por microorganismo diferente; episódios repetidos de EI causados pelo mesmo microorganismo mais de seis meses após o episódio inicial). (2)

2.1.3 Epidemiologia

A EI apresenta uma incidência anual estimada de três a nove casos por 100.000 pessoas em países industrializados. (1,2) Esta variação parece refletir diferenças metodológicas entre estudos populacionais, e não uma divergência verdadeira. Estes estudos revelam que a incidência de EI aumenta dramaticamente com a idade, sendo que a maior taxa descrita foi de 14,5 episódios/100.000 pessoas-ano em pacientes entre 70 e 80 anos. (2) Embora o aumento da média de idade de pacientes com EI seja um dado frequente em estudos realizados em países desenvolvidos, esse achado também tem sido mencionado em estudos recentes realizados em países em desenvolvimento. (4)

Segundo estudos epidemiológicos sobre EI, os homens são mais acometidos do que as mulheres, numa proporção de 2:1. As razões para a maior proporção de homens acometidos por EI ainda são desconhecidas. (2)

Os fatores de risco em países industrializados mudaram de cardiopatia reumática e congênita para o uso intravenoso de drogas, doença valvar degenerativa, dispositivos intracardíacos, infecções adquiridas em serviços de saúde e hemodiálise. (1) Entretanto, em até 50% dos casos, a EI se desenvolve em pacientes sem história prévia de doença valvar. (1,5) Nos países desenvolvidos, cardiopatia reumática corresponde atualmente a menos de 10% dos casos. (3) Essa condição ainda é fator predisponente muito comum em países em desenvolvimento, embora menos prevalente do que em estudos epidemiológicos previamente realizados nesses países. (4,6)

Outros fatores de risco incluem presença de valva protética, história prévia de EI, comorbidades como diabetes mellitus e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana

(HIV). Mais de um terço dos casos de EI nos Estados Unidos, nos últimos anos, foram classificados como relacionados à assistência médica (nosocomiais ou não-nosocomiais). (1) Vários fatores predisponentes apresentam associação com a idade, o que provavelmente explica a incidência crescente de EI entre pessoas acima de 65 anos. (7)

Considerando-se as taxas de mortalidade, estudos populacionais recentes realizados em países industrializados evidenciaram mortalidade intra-hospitalar elevada, variando de 15 a 22%, (7) e uma taxa de mortalidade em cinco anos, de aproximadamente 40%. (1,8) As taxas de mortalidade, entretanto, variam amplamente de acordo com os subgrupos de pacientes. A mortalidade intra-hospitalar é menor que 10% entre os pacientes com EI acometendo câmaras cardíacas direitas e pode chegar a 40% ou mais em pacientes com EI de valvas protéticas devido a *Staphylococcus aureus*. (1)

2.1.4 Microbiologia

Os estafilococos são atualmente os microorganismos identificados com maior frequência como causadores de EI. (1,2,7) Associados aos estreptococos, eles correspondem a 80% dos casos de EI, com proporções variando de acordo com o tipo de valva (nativa, protética), fonte de infecção, idade do paciente e comorbidades. O predomínio de estafilococos parece resultar da maior proporção de casos de EI relacionados à assistência médica. (1) Esse achado também é observado em estudos realizados em países em desenvolvimento, onde vem aumentando de maneira crescente o acesso a centros médicos, bem como a utilização de procedimentos invasivos. (6)

A infecção estafilocócica de valvas nativas, considerando-se EI adquirida na comunidade, é causada tradicionalmente por *S.aureus*, que na maior parte dos casos é sensível à oxacilina. A infecção estafilocócica de prótese valvar, em contraste, é mais frequentemente atribuída a estafilococos coagulase-negativos, com resistência à oxacilina. (2) Entretanto, estudos recentes apontaram *S.aureus* como o causador mais freqüente não apenas de EI de valva nativa, mas também de valva protética. (2,9) Destaca-se que estafilococos coagulase-negativos também podem causar EI de valva

nativa, especialmente *S.lugdunensis*, que frequentemente ocasiona curso clínico agressivo. (10)

Os estreptococos orais (previamente denominados viridans) formam um grupo misto de microorganismos, que inclui espécies como *S.sanguis*, *S.mitis*, *S.salivarius*, *S.mutans* e *Gemella morbiliorum*. Microorganismos deste grupo são quase sempre sensíveis à penicilina G. Membros dos grupos *S.mileri* ou *S.anginosus* (*S.anginosus*, *S.intermedius* e *S.constellatus*) devem ser distinguidos, uma vez que tendem a formar abscessos e causam infecção hematogênica disseminada, frequentemente requerendo maior duração de antibioticoterapia. Similarmente, estreptococos variantes defectivos nutricionalmente, recentemente classificados em outros gêneros (*Abiotrophia* e *Granulicatella*), devem ser diferenciados por serem comumente tolerantes à penicilina (concentração bactericida mínima muito maior que a concentração inibitória mínima). O complexo “*S.bovis/S.equinus*” foi criado em 2003 após extensa revisão taxonômica. Este complexo inclui quatro espécies pertencentes ao grupo D de estreptococos (*S.galloyticus*, *S.lutetiensis*, *S.infantarius*, *S.pasteurianus*). Eles são usualmente sensíveis à penicilina G, assim como os estreptococos do grupo viridans. (2)

Considerando-se os enterococos, agentes também tipicamente causadores de EI, *E.faecalis*, *E.faecium* e, menos frequentemente, *E.durans* são isolados em hemoculturas. (2)

Bactérias gram-negativas também podem causar EI, com destaque para os organismos do grupo HACEK (*Haemophilus parainfluenzae*, *H.aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H.influenzae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*). Estas bactérias estão presentes no trato respiratório superior e também fazem parte da flora orofaríngea, sendo capazes de infectar valvas cardíacas anormais. Outras bactérias gram-negativas menos comumente descritas como causadoras de EI são *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de *Enterobacteriaceae* e, raramente, *Neisseria gonorrhoeae*. (3,11)

Publicações recentes mencionam que hemoculturas negativas são observadas em 2,5 a 31% dos casos de EI. (1) Essa variação pode ser explicada por vários fatores, como diferenças nos critérios diagnósticos utilizados e diferenças epidemiológicas. (12)

Estudos realizados em países em desenvolvimento revelam taxas de hemoculturas negativas tão elevadas quanto 30%. (4,6)

Casos de EI com hemoculturas negativas podem ser consequência do uso de antibióticos antes do diagnóstico da doença e da coleta de amostras de sangue para cultura. Nessas situações, os agentes causadores são mais frequentemente os estreptococos orais ou estafilococos coagulase-negativos e as hemoculturas podem permanecer negativas por muitos dias após a suspensão dos antibióticos. (2)

Outra razão encontrada para a negatividade das hemoculturas é a presença de microorganismos fastidiosos, como variantes nutricionais de estreptococos, bactérias do grupo HACEK, espécies de *Brucella*, fungos, bactérias intracelulares, como espécies de *Chlamydia*, *Bartonella*, *Coxiella burnetii* (agente causador da febre Q), *Tropheryma whipplei* (agente causador da doença de Whipple). Nesses casos, testes sorológicos, ensaios de reação em cadeia de polimerase (PCR) realizados em materiais como valvas e amostras de sangue, além de técnicas microbiológicas altamente especializadas podem levar ao diagnóstico do patógeno em até 60% dos casos. (1,2,12)

Finalmente, uma possível razão para a presença de hemoculturas negativas e que não pode ser negligenciada, principalmente em países em desenvolvimento, corresponde a técnicas inadequadas de coleta das amostras de sangue para hemocultura. (6)

2.1.5 Patogenia

O endotélio valvar normal é resistente à colonização e infecção por bactérias circulantes. Entretanto, caso haja lesões mecânicas, ocorrerá exposição de proteínas da matriz extracelular, desencadeando o processo normal de reparação. A reparação se caracteriza pela produção de fator tecidual e pela deposição de fibrina e plaquetas. Este material trombótico facilita a adesão de microorganismos circulantes, sendo este evento essencial no desenvolvimento da EI. (2,3)

Lesões endoteliais podem resultar de fluxo sanguíneo turbulento, presença de eletrodos ou cateteres, alterações degenerativas em idosos ou injeções intravenosas repetidas de partículas sólidas em usuários de drogas. Inflamação crônica, como na cardiopatia reumática crônica, também pode promover EI. (1,3)

O risco aumentado de EI em faixas etárias mais avançadas pode ser explicado pela prevalência significativa de lesões valvares degenerativas. Estas lesões são detectadas por ecocardiografia em até 50% de pacientes assintomáticos maiores de 60 anos, e em uma proporção similar em pacientes idosos com EI. (2)

Inflamação endotelial sem lesões valvares pode também promover EI. A inflamação local estimula a produção de proteínas transmembrana pelas células endoteliais (integrinas da família $\beta 1$). Estas proteínas ligam a fibronectina circulante à superfície endotelial, sendo que *S.aureus* e alguns outros patógenos apresentam proteínas ligantes de fibronectina em sua superfície. Assim, quando células endoteliais ativadas ligam a fibronectina, forma-se uma superfície de adesão para os estafilococos circulantes. Uma vez aderidos, *S.aureus* realizam internalização ativa pela célula endotelial, estabelecendo a infecção. (2)

Conclui-se, assim, que a EI pode desenvolver-se a partir da infecção do endotélio fisicamente danificado ou a partir da infecção do endotélio sem lesões, ocasionada por microorganismos virulentos como *S.aureus* e outros patógenos potencialmente intracelulares. (1,3)

Caso o microorganismo infectante consiga persistir e se multiplicar, tem início um processo dinâmico complexo caracterizado pela agregação de plaquetas e fibrina, culminando com a produção da vegetação. Replicações múltiplas desse ciclo de aderência e multiplicação de microorganismos e depósito de plaquetas e fibrina ocasionam o aumento progressivo da vegetação infectada. A infecção, caso não controlada, pode se estender além do folheto valvar, acometendo o tecido paravalvar e resultando, por exemplo, na formação de abscessos. (3)

Estudos desenvolvidos em modelos animais têm buscado definir o papel da bacteriemia no contexto da EI. (2) Tanto a magnitude da bacteriemia quanto a habilidade do

patógeno em aderir ao endotélio valvar danificado parecem ser importantes. Entretanto, em estudo recente foi possível produzir modelo animal de EI utilizando-se bacteriemia em baixo grau por *S.aureus*, evidenciando a patogenicidade desse microorganismo conferida por suas proteínas de adesão. (13)

O resultado desse estudo está de acordo com publicações recentes, que apontam a ocorrência de bacteriemia não somente após procedimentos invasivos, mas também durante atividades cotidianas como mastigar e escovar os dentes. (14) Essa “bacteriemia espontânea” apresenta baixo grau e curta duração (1-100 unidades formadoras de colônia/ml de sangue/10 minutos), mas sua alta incidência pode explicar muitos casos de EI não relacionados a procedimentos invasivos. (2)

2.1.6 Diagnóstico

a) Diagnóstico clínico

A apresentação clínica da EI pode ser bastante variada, dependendo do microorganismo causador, da presença ou ausência de doença cardíaca prévia e de características específicas do paciente (idade, comorbidades). Somam-se a esses fatores, o perfil epidemiológico da doença, em processo constante de alteração. Essa complexa combinação de diferentes situações pode fazer com que o diagnóstico de EI seja frequentemente um desafio. (2,5)

A EI pode se apresentar de maneira aguda e rapidamente progressiva, mas também como doença subaguda ou crônica, com sintomas inespecíficos. Não raramente, os pacientes acometidos pela doença são avaliados por várias especialidades médicas antes que o diagnóstico de EI seja aventado. (2,3)

A presença de febre é comum, relatada em até 80% dos casos e frequentemente associada com sintomas sistêmicos como calafrios, inapetência e perda de peso. (15)

O encontro de novo sopro ou acentuação de sopro pré-existente são relatados em 48% e 20% dos casos, respectivamente. Outros sinais menos comuns são hematúria (25% dos casos), esplenomegalia (11%) e hemorragias conjuntivais (5%). (1)

As manifestações periféricas clássicas podem ainda ser vistas em países em desenvolvimento, sendo menos comuns em países desenvolvidos, onde o paciente chega ao serviço de saúde em estádios mais precoces da doença. (2) Essas manifestações incluem hemorragias ungueais, petéquias nas mucosas e extremidades (8% dos casos), nódulos de Osler (nódulos pequenos e dolorosos nos dedos), lesões de Janeway (máculas hemorrágicas indolores nas palmas e plantas dos pés, 5% dos casos) e alterações na retina (“Roth spots”, 5% dos casos). (1-3)

Segundo publicações, em até 30% dos casos pode ocorrer embolia cerebral, pulmonar ou esplênica, sendo frequentemente a forma de apresentação da doença nesses casos. (16) Outras formas de apresentação podem ser sepse, meningite, insuficiência cardíaca inexplicada, acidente vascular encefálico, oclusão arterial periférica aguda e insuficiência renal. (1)

Alterações laboratoriais podem corroborar o diagnóstico, como dosagem elevada de proteína-C-reativa e velocidade de hemossedimentação (VHS) aumentada (dois terços dos casos), leucocitose, anemia (cerca de metade dos casos), hematúria microscópica. Entretanto, esses achados são inespecíficos e não foram incluídos nos critérios diagnósticos atuais. (1,2,15)

É importante destacar que a ocorrência de febre é menos frequente em pacientes idosos ou imunocomprometidos, que podem ter apresentação clínica atípica, sendo necessário um alto grau de suspeição para que o diagnóstico de EI seja feito. (2)

As complicações cerebrais são as mais graves complicações da EI, bem como as mais frequentes (15 a 20% dos pacientes). (17) Elas incluem acidente vascular encefálico isquêmico ou hemorrágico (precedendo o diagnóstico de EI em até 60% dos pacientes), embolia cerebral silenciosa, ataque isquêmico transitório, aneurisma micótico, meningite e abscesso cerebral. (1) A ressonância nuclear magnética (RNM) cerebral

revela anormalidades em até 80% dos pacientes, incluindo-se eventos embólicos (a maioria assintomáticos) em 50% dos casos. (18)

Algumas características específicas das vegetações têm sido associadas com maior risco de eventos embólicos cerebrais sintomáticos, como maior extensão, maior mobilidade e localização na valva mitral. A infecção por *S.aureus* também parece acarretar maior risco. (1)

Aneurismas micóticos ocorrem em pontos de ramificações dos vasos cerebrais, sendo comuns em ramos da artéria cerebral média. Essas complicações podem resultar da oclusão do vaso por embolia séptica com arterites secundárias ou serem conseqüência de embolismo arterial séptico para o *vasa vasorum* e disseminação da infecção pela parede do vaso. Os aneurismas micóticos são relatados em 2 a 10% dos casos, mas atualmente são detectados com maior freqüência devido ao maior emprego de exames de imagem, sendo a angiografia por RNM o melhor teste confirmatório. (3)

b) Diagnóstico ecocardiográfico e o papel de outros exames de imagem

A ecocardiografia (transtorácica e transesofágica) tem importância fundamental no diagnóstico, manejo e seguimento dos casos de EI. Três achados ecocardiográficos são considerados critérios maiores para o diagnóstico de EI: vegetação, abscesso e nova deiscência de valva protética. O ecocardiograma deve ser realizado rapidamente, tão logo haja suspeita de EI. (2,19)

O ecocardiograma transtorácico (ETT) é realizado inicialmente, sendo recomendado como método de imagem de primeira linha em casos suspeitos de EI. (1)

O ecocardiograma transesofágico (ETE) apresenta maior sensibilidade e especificidade e é recomendado quando os resultados do ETT são negativos e nas seguintes situações: suspeita clínica alta, qualidade da imagem ruim, presença de valvas protéticas, presença de dispositivos intracardíacos e nos casos em que os achados do ETT são sugestivos de EI, porém não definitivos. (1,20) O ETE apresenta grande valor na detecção de

abscessos ou outras complicações de EI, como disfunção aguda de prótese valvar, perfuração de folhetos e fístulas, estando indicado para se programar o procedimento cirúrgico.

A sensibilidade do ETT para detecção de vegetações é aproximadamente 75%, enquanto este dado para o ETE varia de 85 a 90%. Os valores de sensibilidade tanto do ETT quanto do ETE são menores para valvas protéticas se comparados aos mesmos valores para valvas nativas. (20). O diagnóstico pode ser particularmente desafiador quando a infecção atinge dispositivos intracardíacos, mesmo utilizando-se o ETE. A identificação de vegetações pode ser dificultada pela presença de lesões severas prévias (prolapso valvar mitral, lesões valvares degenerativas calcificadas, valvas protéticas), se as vegetações são muito pequenas ($\leq 2\text{mm}$), não ainda presentes ou se já embolizaram. (2) A taxa de ecocardiografia falso-negativa pode chegar a 15%. (20)

Algumas estruturas podem assemelhar-se a vegetações, como as alterações vistas na doença degenerativa mixomatosa valvar, no lúpus eritematoso sistêmico (lesões inflamatórias de Libman-Sacks), em doenças reumatológicas, na síndrome antifosfolípide primária, nas neoplasias avançadas (endocardite marântica). Outras condições potencialmente confundidoras são existência de trombo valvar, ruptura de corda tendínea e associação com tumores intracardíacos pequenos (tipicamente fibroelastoma). (2,21)

Abscessos representam o segundo achado ecocardiográfico mais típico sugestivo de EI, e podem ser complicados por pseudo-aneurismas ou fistulização. A sensibilidade para a detecção é de 50% para ETT e 90% para ETE. (20) Pequenos abscessos podem ser difíceis de identificar, particularmente em estádios precoces da doença, no período pós-operatório, na presença de dispositivos e quando o abscesso está localizado em torno da calcificação do ânulo mitral posterior. (22)

Outros achados ecocardiográficos sugestivos de EI incluem destruição valvar, prolapso valvar, aneurisma e perfuração da valva. (20)

Considerando-se EI de câmaras cardíacas direitas, devido à menor pressão e menores velocidades do fluxo sanguíneo, as vegetações crescem mais rapidamente e são maiores

dos que as encontradas em câmaras esquerdas. A EI de câmaras direitas é mais comumente observada em pacientes com cateteres venosos centrais, cardiopatia congênita, dispositivos intracardíacos ou usuários de drogas endovenosas. (23) Nesses casos, as vegetações podem ser encontradas em qualquer local no endocárdio, mas são tipicamente localizadas na face atrial da valva tricúspide ou nos eletrodos dos dispositivos, ou, menos frequentemente, na valva pulmonar. O ETT fornece informações valiosas, pois as estruturas das câmaras direitas estão localizadas anteriormente, próximas ao transdutor. Entretanto, interferências anatômicas podem limitar o uso do ETT em alguns pacientes. A sensibilidade do ETT e ETE para detecção de lesões em câmaras cardíacas direitas foi comparada em alguns estudos recentes, sendo encontrados valores similares em alguns estudos e superioridade do ETE em outros. (20,24)

O ETT ou o ETE deve ser repetido sete a 10 dias após o primeiro exame se persiste a suspeita de EI, ou mesmo antes, se há bacteriemia por *S.aureus*. Nestes casos, a ecocardiografia de rotina se justifica pelo alto risco de EI e pela virulência deste microorganismo, capaz de levar a efeitos devastadores após estabelecimento da infecção. (2,20) Recomenda-se também a repetição desses exames caso haja suspeita de complicação da EI com indicação cirúrgica. (1,2) Ressalta-se que a sensibilidade e especificidade do ETT e do ETE diminuem quando esses exames são empregados indiscriminadamente, particularmente em pacientes com baixa probabilidade de EI. (25)

Outras técnicas de imagem, embora representem avanços tecnológicos, têm apresentado impacto mínimo na prática clínica diária. Essas técnicas, como ecocardiografia tridimensional, tomografia computadorizada, RNM, tomografia por emissão de pósitrons, melhoraram a qualidade dos estudos, porém seu papel no diagnóstico e condução dos casos de EI precisa ser mais bem estabelecido, segundo as diretrizes mais recentes. (2)

A ecocardiografia tridimensional permite rápida aquisição de imagem mais fidedigna da morfologia e estrutura cardíaca. Essa técnica tem particular utilidade na avaliação de abscessos paravalvares, regurgitação paravalvar, perfuração ou deiscência valvar. Outra vantagem da ecocardiografia tridimensional é sua habilidade em fornecer uma “visão cirúrgica” durante os procedimentos de troca ou reparo valvar. (20) Entretanto, devido à

sua baixa taxa de quadros (*low frame rate*), essa técnica pode não ser adequada para detecção de pequenas vegetações. (26)

A tomografia computadorizada (TC) *multislice* permite a aquisição de imagens com alta resolução temporal e espacial em poucos minutos e com pouca exposição à radiação. O ETE é superior na detecção de pequenas vegetações e perfurações valvares, enquanto a TC *multislice* parece ter vantagem em pacientes com maior calcificação da valva e na avaliação da extensão perivalvar da infecção, como nos casos de abscessos e pseudoaneurismas, ou nas infecções de valvas protéticas quando a sombra acústica pode diminuir a sensibilidade do ETE. (2,20) Diferentes modalidades de imagem são frequentemente complementares em casos de difícil diagnóstico. Uma limitação importante do uso de TC *multislice* é a necessidade do uso de contraste iodado, restringindo seu uso em pacientes com alteração da função renal, em pacientes instáveis hemodinamicamente e ou com alergia a iodo. (20)

A RNM tem sido usada no contexto da EI para diagnosticar eventos cerebrais embólicos clínicos e subclínicos. O uso sistemático da RNM demonstrou a presença de lesões cerebrais em até 80% dos pacientes, sendo que eventos cerebrovasculares subclínicos foram observados em 30-40% dos pacientes. (27) Entretanto, a realização rotineira e triagem com RNM não é recomendada. Essa técnica é limitada por sua baixa resolução espacial, pouca disponibilidade e maior gasto de tempo para sua realização. Além disso, não pode ser usada em pacientes com certos dispositivos intracardíacos. (20)

A utilização da tomografia por emissão de pósitrons com flúor-18 fluordeoxiglicose como marcador (F18-FDG PET/CT) permite a detecção do metabolismo aumentado da glicose nos órgãos. Este método tem sido largamente empregado em neoplasias para diagnóstico e estadiamento. Recentemente, sua utilidade foi também comprovada para o diagnóstico e monitoramento de condições inflamatórias de origem infecciosa ou não. (28)

Em estudo recentemente publicado, analisou-se prospectivamente 72 pacientes com suspeita de EI de valvas protéticas. Os pacientes foram submetidos à tomografia por emissão de pósitrons utilizando-se como marcador flúor-18 fluordeoxiglicose (F18-FDG PET/TC). Observou-se que a inclusão de uma captação anormal do marcador em

torno das valvas protéticas como um novo critério maior, aumentou significativamente a sensibilidade dos Critérios de Duke modificados à admissão (70% para 97%; $p= 0,008$). Entretanto, os próprios autores ponderam que essa modalidade de imagem não substitui a avaliação clínica, microbiológica e ecocardiográfica, constatando que futuros estudos em larga escala serão necessários para se confirmar a custo-efetividade desta estratégia. (29)

Considerando-se EI de valvas nativas, o uso de F18-FDG PET/TC pode ser limitado. Embora a formação de abscessos e a extensão perivalvar da infecção tenham sido demonstradas com F18-FDG PET/TC, na maior parte dos casos, o método foi utilizado para se confirmar o diagnóstico. Uma potencial aplicação seria em casos de febre de origem indeterminada; o uso de F18-FDG PET/TC mostrou-se útil neste contexto para revelar EI na vigência de ecocardiografia transesofágica negativa. (20) Quando a F18-FDG PET/TC é utilizada para diagnóstico nos casos de EI relacionada a dispositivos intracardíacos, sensibilidade e especificidade de 89 e 86%, respectivamente, são relatados. (30) Entretanto, esses dados precisam ser confirmados por séries maiores. (20)

Concluindo, apesar de suas limitações, a ecocardiografia continua exercendo papel fundamental para o diagnóstico e monitoramento dos casos de EI. Novas técnicas de imagem estão sendo desenvolvidas e podem vir a trazer grandes contribuições. Entretanto, as evidências são ainda limitadas para que seu uso seja recomendado como ferramentas de primeira linha para o diagnóstico de EI. (20)

c) Diagnóstico microbiológico

A identificação do microorganismo causador é ponto central para realizar o diagnóstico de EI e guiar a terapia antimicrobiana. Três amostras contendo cada uma 10ml de sangue, obtidas em três sítios diferentes (veias periféricas) por meio de técnica de punção estéril, são virtualmente suficientes para permitir a identificação do microorganismo causador. O rendimento diagnóstico de amostras repetidas posteriormente é baixo. Coleta de amostras de cateteres venosos centrais deve ser

evitada devido ao alto risco de contaminantes (falsos positivos, tipicamente estafilococos) e resultados enganosos. (31)

As amostras devem ser colhidas antes do início da antibioticoterapia, embora pesquisas sobre a prática contemporânea revelem frequentemente violações a esta regra. (32) Partindo-se do conceito de que a bacteriemia é quase constante na EI, (2) não há justificativa em atrasar a coleta das amostras buscando coincidência com os picos febris. Esse conceito também explica porque, virtualmente, todas as hemoculturas (ou a maioria delas) são positivas. Assim, uma única amostra de hemocultura positiva deve ser analisada com cuidado antes de ser considerada para o diagnóstico de EI, principalmente se o microorganismo causador for um contaminante potencial, como os estafilococos coagulase-negativos. (2)

As culturas devem ser incubadas em atmosferas aeróbicas e anaeróbicas, embora EI causada por anaeróbios seja incomum. Esse cuidado permite a detecção de organismos como espécies de *Bacteroides* ou *Clostridium*. Quando as culturas permanecem negativas após cinco dias, a realização de subculturas em ágar chocolate pode permitir a identificação de microorganismos fastidiosos. (2) Culturas prolongadas são associadas com maior chance de contaminação, e nesses casos, técnicas ou diagnósticos alternativos devem ser considerados. (33)

A presença de hemoculturas negativas após 48h, associada a sinais clínicos e ou ecocardiográficos sugestivos de EI deve levar ao início de tratamento com cobertura para microorganismos causadores de EI com hemoculturas negativas, por exemplo, microorganismos fastidiosos. Esses agentes podem ser comuns em pacientes com valvas protéticas, cateteres profundos, dispositivos, falência renal e estados de imunodeficiência. (2) Hemoculturas negativas ocorrem em até 31% dos casos e frequentemente são consequência do uso de antibióticos previamente à coleta das amostras. O atraso no diagnóstico é comum nesse contexto, gerando impacto profundo no prognóstico. (12)

Testes sorológicos para *Bartonella*, *C.burnetti* e *Brucella* devem ser realizados em pacientes com hemoculturas negativas que apresentam fatores de risco para estas infecções. (12) O diagnóstico microbiológico pode ser alcançado, nos casos de EI com

hemoculturas negativas, por meio do exame patológico do tecido valvar ressecado, caso a cirurgia seja necessária. Fragmentos embólicos podem ser também analisados. O exame patológico permanece como padrão-ouro para o diagnóstico de EI e pode também guiar a terapia antimicrobiana se técnicas imuno-histoquímicas ou colorações especiais forem utilizadas. A amplificação genética por meio de PCR, apesar de ser caracterizada por sensibilidade muito alta, apresenta limitações inerentes à técnica, como o risco de contaminações, inabilidade em fornecer informações sobre a susceptibilidade bacteriana a agentes terapêuticos e persistência da positividade a despeito da remissão clínica. A microscopia eletrônica apresenta alta sensibilidade e pode auxiliar na caracterização de novos microorganismos, porém demanda maior tempo e alto custo. Mais estudos são necessários para validar a incorporação desses métodos nos critérios diagnósticos. (1,2)

d) Critérios diagnósticos

A variabilidade na apresentação clínica da EI requer uma estratégia diagnóstica que seja ao mesmo tempo sensível e específica. Pesquisadores da Universidade de Duke propuseram em 1994 um esquema diagnóstico denominado “Os critérios de Duke”. O reconhecimento do papel da febre-Q (zoonose causada por *Coxiella burnetii*), a prevalência crescente da infecção estafilocócica e o uso disseminado do ETE levaram a modificações nos critérios originais, resultando nos “Critérios de Duke modificados”. (34) Esse esquema é atualmente recomendado para a classificação diagnóstica na EI e baseia-se na presença de critérios patológicos e critérios clínicos. (1,2,11)

Os critérios patológicos incluem a identificação de microorganismos, por meio de cultura ou exame histológico de material obtido após ressecção cirúrgica ou autópsia (vegetações, fragmentos de vegetações que embolizaram ou material proveniente de abscesso intracardíaco). Incluem também a identificação de endocardite ativa, confirmada por exame histológico de vegetação ou abscesso intracardíaco. (34)

Os critérios clínicos podem ser maiores ou menores. Os critérios maiores incluem achados microbiológicos específicos e evidências de envolvimento endocárdico.

Considerando-se os achados microbiológicos, é necessária a presença de hemocultura positiva com características específicas para que o critério diagnóstico maior seja atendido. Como exemplo, bacteriemia causada por *S.viridans* e membros do grupo HACEK, que são patógenos classicamente causadores de EI, tem peso diagnóstico máximo. Bacteriemia por *S.aureus* e *E.faecalis*, em contraste, é valorizada apenas se a infecção foi adquirida na comunidade e sem um foco primário aparente. Isto ocorre porque *S.aureus* e *E.faecalis* comumente causam bacteriemias relacionadas ou não à EI. Se a infecção é adquirida na comunidade, há maior risco de associação com EI. Essa estratégia mantém a alta especificidade dos resultados de hemocultura para EI. (11,35)

Também é considerado critério maior microbiológico a presença de hemocultura positiva para *Coxiella burnetti* (uma amostra positiva é suficiente) ou título de anticorpos IgG para febre Q (antígeno fase 1) maior que 1:800. (1)

O critério maior “evidência de envolvimento endocárdico” incorpora os achados ecocardiográficos na estratégia diagnóstica. Três achados típicos em EI recebem peso diagnóstico máximo: massas móveis aderidas a valvas ou endocárdio mural, no trajeto de jatos regurgitantes, ou aderidas a material intracardíaco implantado, na ausência de explicação anatômica alternativa; abscessos; nova deiscência de prótese valvar. Também é critério maior a presença de regurgitação valvar nova, mas não a piora ou alteração de sopro preexistente. (1,11)

Os critérios menores constituem achados comuns e menos específicos de EI. São eles: presença de condição predisponente para EI, como valvopatia ou uso de drogas endovenosas; febre, definida como temperatura maior que 38°C; fenômeno vascular, como embolia arterial, infarto pulmonar séptico, aneurisma micótico, hemorragia intracraniana, hemorragia conjuntival e lesões de Janeway; fenômenos imunológicos, como glomerulonefrite, nódulos de Osler, manchas de Roth e positividade do fator reumatóide; evidência microbiológica: hemoculturas positivas, porém sem corresponder à definição de critério maior; evidência sorológica de infecção ativa por microorganismo consistente com EI. (34)

O diagnóstico de EI é considerado definitivo quando algum dos critérios patológicos anteriormente referidos é atendido. Também se considera definitivo o diagnóstico de EI quando estão presentes dois critérios clínicos maiores, ou um critério maior e três menores, ou cinco critérios menores. O diagnóstico de EI é classificado como possível se são observados apenas um critério maior e um critério menor ou se são encontrados apenas três critérios menores. A hipótese de EI é rejeitada quando existe um diagnóstico alternativo firmemente estabelecido, ou quando a síndrome febril resolve-se com quatro dias ou menos após início da antibioticoterapia. Também se rejeita a hipótese de EI se não foi encontrada à cirurgia ou autópsia evidência patológica de EI, com uso de antibioticoterapia por quatro dias ou menos, ou quando não são atendidos os critérios para EI possível. (1,2)

A análise direta dos critérios de Duke foi realizada em 11 estudos da década de 90, que incluíram em conjunto cerca de 1700 pacientes. Essas amostras foram compostas por grupos geograficamente e clinicamente diversos (adultos, crianças, idosos, pacientes provenientes da comunidade, com ou sem história de uso de drogas, pacientes com valvas nativas e pacientes com valvas protéticas). (11) Estes estudos confirmaram a alta sensibilidade e especificidade dos critérios de Duke e a utilidade da ecocardiografia na identificação de casos definidos clinicamente. (36)

Segundo a mais recente diretriz de EI, (2) os critérios de Duke apresentam sensibilidade e especificidade aproximada de 80% para o diagnóstico de EI. Como previamente mencionado, o reconhecimento do papel da febre-Q, a prevalência crescente da infecção estafilocócica e o uso disseminado do ETE levaram a modificações nos critérios originais, resultando nos “Critérios de Duke modificados”, sendo esse esquema atualmente recomendado para a classificação diagnóstica na EI. Deve-se lembrar, entretanto, que estas modificações aguardam validação formal e que os critérios originais foram desenvolvidos inicialmente para se definir casos de EI para estudos epidemiológicos e ensaios clínicos. (2) Deficiências ainda existem, e o julgamento clínico permanece essencial, especialmente nas situações em que a sensibilidade dos critérios modificados é menor. Exemplos destas situações são: casos de EI com hemoculturas negativas, infecção envolvendo prótese valvar ou dispositivos, ou ainda em endocardite de câmaras direitas. (37)

2.1.7 Tratamento

A EI tem apresentação e evolução variáveis, constituindo-se a condução dos casos frequentemente em desafio terapêutico. O tratamento dos casos suspeitos ou confirmados de EI deve ser realizado por equipe multidisciplinar com experiência em Cardiologia Clínica, Cirurgia Cardíaca e Infectologia. (1)

O sucesso do tratamento depende da erradicação do agente causador, o que requer tratamento antibiótico prolongado. A cirurgia pode contribuir para esse objetivo por meio da remoção do material infectado e drenagem de abscessos. (1,2)

a) Terapia antibiótica

As defesas do hospedeiro usualmente contribuem pouco para a erradicação do microorganismo causador; isto explica porque os regimes bactericidas são mais efetivos que as terapias bacteriostáticas, tanto em experimentos em animais quanto em seres humanos. (1)

Os aminoglicosídeos apresentam ação sinérgica com inibidores da produção da parede celular (β -lactâmicos e glicopeptídeos) para a atividade bactericida e são úteis na redução da duração da terapia e para a erradicação de microorganismos como os enterococos. Entre os aminoglicosídeos, somente a gentamicina foi satisfatoriamente avaliada para o tratamento da EI e deve ser usada quando a doença é causada por cocos Gram positivos. (1,38)

Um grande obstáculo para a erradicação bacteriana é a tolerância a antibióticos. Microorganismos tolerantes são ainda susceptíveis à inibição do crescimento pela droga, porém não são erradicados e podem reiniciar a proliferação após a descontinuação do tratamento. Eles permanecem presentes em vegetações e biofilmes (por exemplo, em valvas protéticas), justificando a necessidade de antibioticoterapia prolongada para esterilização completa das valvas. (2)

As diretrizes atuais apresentam regimes de tratamento direcionados para microorganismos específicos e regimes de tratamento empírico (iniciados antes da identificação do agente causador, geralmente direcionados para o grupo de microorganismo mais comum conforme a situação clínica e a epidemiologia local). (2,11)

Considerando-se EI de valvas nativas causada por microorganismos comuns, a duração da terapia antibiótica varia de duas a seis semanas. Duas semanas de antibioticoterapia são necessárias para o tratamento de EI não complicada devido a estreptococos totalmente sensíveis à penicilina tratados com a combinação de β -lactâmicos e aminoglicosídeos, enquanto o tratamento da EI por enterococos requer duração de seis semanas. (1)

A duração do tratamento quando a infecção envolve uma valva protética é usualmente seis semanas. Os regimes de tratamento são basicamente os mesmos utilizados na EI de valvas nativas, com exceção da infecção de valva protética por estafilococos. Neste caso, o regime antimicrobiano deve incluir rifampicina (se a cepa for susceptível) e gentamicina. (1)

A gentamicina deve também estar incluída no regime terapêutico quando a EI é causada por enterococos, a menos que a cepa exiba alto grau de resistência a este antibiótico. Apesar da administração usual de gentamicina por seis semanas, estudo observacional recente evidenciou que um menor curso de tratamento (15 dias) pode ser efetivo. (39) Esse regime é atrativo, pois reduz o risco de toxicidade renal. A combinação de ampicilina (dose de 12g/24h) com ceftriaxone (2g, duas vezes ao dia) pode ser efetiva na EI causada por *E.faecalis*, independentemente de a cepa ser ou não altamente resistente à gentamicina. (1,40)

Considerando-se o tratamento de EI estafilocócica envolvendo valvas nativas, a gentamicina não é mais recomendada por duas razões principais: ausência de benefício clínico documentado e risco de nefrotoxicidade. A exceção é a EI de valva nativa por enterococos, em que a gentamicina permanece indicada. Além disso, conforme previamente mencionado, a gentamicina permanece também indicada para o tratamento

de EI de valvas protéticas por estafilococos, especialmente na infecção por *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA). A utilização de um regime que inclua a gentamicina nas primeiras duas semanas é recomendada nesse caso, com o objetivo de reduzir o risco de seleção de microorganismos mutantes resistentes à rifampicina. (1,41)

Quando for realizada a troca de uma valva nativa infectada por uma prótese valvar durante o tratamento antibiótico, a duração da antibioticoterapia deve permanecer a mesma recomendada para EI de valva nativa e não deve ser trocada por aquela recomendada para EI de valva protética. Tanto para a EI de valva nativa quanto para a EI de valva protética, a duração do tratamento deve ser calculada tendo como ponto inicial o primeiro dia de terapia antibiótica adequada, não a partir do dia da cirurgia. Após a cirurgia, um novo curso completo de tratamento deve ser iniciado somente se as culturas das valvas forem positivas. (42)

A daptomicina foi recomendada como uma alternativa à vancomicina para o tratamento de adultos com EI por MRSA. (1) Estudos observacionais mostraram a eficácia da daptomicina em pacientes com EI de câmaras esquerdas e em pacientes com EI envolvendo dispositivos intracardíacos. (43) Além disso, ensaio clínico randomizado mostrou a não inferioridade da daptomicina em relação à terapia padrão (vancomicina ou uma penicilina antiestafilocócica). (44) Esse estudo fundamentou a aprovação da daptomicina pela “*Food and Drug Administration*” (FDA) para o tratamento de adultos com bacteriemia por *S.aureus* e EI de câmaras direitas.

O tratamento da EI por fungos merece atenção especial. A infecção fúngica é observada com maior frequência em EI de valvas protéticas, em pacientes com EI e história de uso de drogas endovenosas ou em pacientes com EI e imunodeficiência. *Candida* e *Aspergillus* são os gêneros predominantes. As taxas de mortalidade são muito altas (50%), e o tratamento requer a administração de antifúngicos e a substituição da valva. A maior parte dos casos é tratada com diferentes formulações de anfotericina B com ou sem azólicos. (2)

b) Tratamento cirúrgico

A identificação de pacientes que requerem abordagem cirúrgica é frequentemente difícil. Cada caso deve ser individualizado e todos os fatores que impliquem em maiores riscos identificados no momento do diagnóstico. A consulta à equipe de Cirurgia Cardíaca é recomendada para determinar a melhor estratégia terapêutica. (2)

A troca (ou reparo) valvar é considerada precoce quando realizada durante o curso da terapia antimicrobiana da EI. Estudos observacionais nos quais se investigou associações entre o momento da cirurgia e os desfechos, mostraram resultados inconsistentes. Entretanto, a taxa de realização de cirurgia valvar precoce vem aumentando progressivamente nas últimas três décadas para aproximadamente 50%. (7,15)

Em ensaio clínico randomizado recente, comparou-se a realização de cirurgia valvar precoce com o tratamento convencional em 76 pacientes com EI segundo os critérios de Duke modificados. Esses pacientes apresentavam EI de câmaras cardíacas esquerdas, doença valvar grave e grandes vegetações (maior que 10 mm), porém sem indicações de cirurgia de emergência no momento de inclusão no estudo. Foi evidenciado que a cirurgia realizada em até 48 horas após o diagnóstico reduziu a mortalidade global e a taxa de eventos embólicos que ocorreram em até seis semanas após a randomização (hazard ratio 0,10, intervalo de confiança 95% 0,01-0,82, $p=0,03$). O benefício deveu-se principalmente à redução de eventos embólicos. (45) Esse resultado foi alcançado sem aumento das taxas de mortalidade perioperatória e de recorrência de EI. Esse estudo apresenta, entretanto, graves limitações, entre elas a exclusão de pacientes com EI acometendo valvas protéticas e EI complicada por abscesso aórtico. Os critérios de exclusão também afetaram a frequência relativa dos microorganismos causadores, sendo que a incidência de EI por *S.aureus* foi menor que a observada em estudos prévios. Os pacientes incluídos nesse estudo foram mais jovens (idade média 47 anos) e com baixa frequência de comorbidades. Os próprios autores comentam que os resultados do estudo podem não ser aplicáveis a pacientes com alto risco operatório. Segundo revisão recente sobre EI, ainda não está claro se esses resultados podem fundamentar a utilização rotineira da cirurgia valvar precoce. (1,45)

A realização da cirurgia em fase ativa, isto é, quando o paciente está ainda recebendo tratamento antibiótico, implica em risco significativo. Tal conduta se justifica em situações de maior gravidade, em que a possibilidade de cura com o tratamento antibiótico isolado é improvável e em pacientes que não apresentam comorbidades ou complicações que tornam muito remota a possibilidade de recuperação. A idade por si só não é contraindicação à cirurgia. (2) As principais indicações de cirurgia valvar precoce são insuficiência cardíaca (IC), infecção não controlada e prevenção de eventos embólicos. (2)

A IC é a mais frequente complicação da EI (50-60% dos casos) e representa a indicação mais comum para a cirurgia. (46) A IC pode ser causada por insuficiência aórtica ou mitral grave, fístula intracardíaca ou, mais raramente, obstrução valvar, quando uma grande vegetação obstrui parcialmente o orifício valvar. IC moderada a grave é o mais importante preditor de mortalidade durante a internação de seis meses após alta hospitalar. (2) A IC é mais frequente quando a infecção acomete a valva aórtica (29%) em relação ao acometimento da valva mitral (20%). (11)

Infecção não controlada é a segunda indicação mais freqüente de cirurgia na EI e compreende infecção persistente (por exemplo, por microorganismos resistentes ou terapia antibiótica inadequada) e infecção localmente não controlada (por exemplo, extensão perivalvar da EI). Complicações perivalvares incluem formação de abscessos (mais comuns em EI de valva aórtica), pseudoaneurismas e fístulas. Outras complicações menos frequentes são defeitos ventriculares septais, bloqueio atrioventricular de terceiro grau e síndrome coronariana aguda. (2,46)

Eventos embólicos são complicações frequentes e graves da EI, relacionados à migração de vegetações cardíacas. O embolismo pulmonar é mais comum em EI de câmaras direitas e EI relacionada a dispositivos. O cérebro e o baço são os alvos mais comuns de embolismo na EI de câmaras esquerdas, Acidentes vasculares cerebrais estão associados com alta morbidade e mortalidade. (2,17)

Vários fatores estão associados com risco aumentado de embolismo, porém o tamanho e a mobilidade das vegetações são os preditores independentes mais potentes de eventos embólicos novos (os que ocorrem após o início de terapia antibiótica). Pacientes com

vegetações de 10 mm de extensão apresentam maior risco de embolismo, sendo este risco ainda maior em pacientes com vegetações muito grandes (15mm) e móveis, especialmente nos casos de EI de valva mitral por estafilococos. (16,47)

O risco de novos eventos embólicos é maior durante os primeiros dias que se seguem ao início da antibioticoterapia e diminui rapidamente, particularmente após as duas primeiras semanas de tratamento. Algum grau de risco, embora menor, permanece indefinidamente enquanto as vegetações estão presentes. Portanto, os benefícios da cirurgia para prevenir o embolismo são maiores durante a primeira semana de tratamento antimicrobiano, quando o risco de eventos embólicos atinge seu pico. (16,47)

Após um evento cerebral embólico, a maioria dos pacientes ainda apresenta indicação para a cirurgia valvar. A decisão de se realizar o procedimento deve levar em consideração o risco de embolismo adicional e o risco associado à cirurgia. Geralmente, a cirurgia é realizada se o paciente não apresenta dano neurológico grave, desde que a ocorrência de hemorragia cerebral tenha sido excluída por métodos de imagem. (1)

A cirurgia valvar pode ser emergencial, quando realizada em até 24 horas após a identificação da condição que indica o procedimento; urgente, quando realizada em alguns dias após a observação da condição precipitante; ou eletiva, se realizada após uma ou duas semanas de antibioticoterapia e identificação da condição que indica o procedimento. (1)

As indicações de cirurgia valvar emergencial são: EI de valva aórtica ou mitral com regurgitação aguda grave ou obstrução significativa gerando edema pulmonar refratário ou choque cardiogênico; EI de valva aórtica ou mitral com fístula para uma câmara cardíaca ou pericárdio causando edema pulmonar refratário ou choque cardiogênico. (1,2)

As indicações de cirurgia valvar urgente são: EI de valva aórtica ou mitral com regurgitação aguda grave ou obstrução significativa e IC persistente ou sinais de baixa tolerância hemodinâmica (fechamento valvar mitral precoce ou hipertensão pulmonar); infecção localmente não controlada (abscesso, pseudoaneurisma, fístula, vegetação

crescente, deiscência de valva protética); febre persistente e hemoculturas positivas por mais de cinco a sete dias. (1,2)

Outras indicações de cirurgia valvar urgente, relativas à prevenção de embolismo, incluem: EI de valva aórtica ou mitral com grandes vegetações (> 10mm) após um ou mais episódios de embolia, apesar de terapia antimicrobiana adequada, especialmente durante as primeiras duas semanas de terapia; EI de valva aórtica ou mitral com grandes vegetações (>10mm) e outros preditores de complicações (IC, infecção persistente ou abscessos); vegetações isoladas muito grandes (>15mm), em que a cirurgia pode ser preferida se um procedimento para preservar a valva nativa for factível. (1,2)

A cirurgia valvar eletiva está indicada nas seguintes situações: EI de valva aórtica ou mitral com regurgitação grave e IC facilmente controlada com medidas clínicas; infecção causada por fungos ou organismos multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa* e outros bacilos Gram-negativos. (1,2)

A mortalidade e morbidade perioperatórias na EI variam de acordo com o microorganismo causador, a extensão da destruição das estruturas cardíacas, o grau de disfunção ventricular e a condição hemodinâmica do paciente no momento da cirurgia. A mortalidade operatória na EI atualmente varia entre 5 e 15%, com taxas maiores relacionadas a procedimentos realizados na primeira semana de antibioticoterapia. As causas de óbito são frequentemente multifatoriais, sendo as razões principais falência de múltiplos órgãos, IC, choque séptico refratário, coagulopatias e acidentes vasculares encefálicos. (2,48)

c) Terapia antitrombótica

Segundo a mais recente diretriz de EI, (2) não há indicação para o início de drogas antitrombóticas (trombolíticos, anticoagulantes e antiplaquetários) durante a fase ativa de EI. Essa informação é corroborada por revisão recente sobre EI. (1)

Estudos observacionais mostraram resultados conflitantes em relação à associação do uso de aspirina anteriormente ao desenvolvimento de EI com riscos de morte e eventos embólicos. O uso prévio de aspirina deve ser mantido, a não ser em casos de hemorragia, mas seu início não é recomendado em pacientes com EI. Em estudo duplo-cego avaliou-se pacientes com EI randomizados para receber 325mg de aspirina por dia por quatro semanas ou placebo. Não houve diferença entre a incidência de eventos embólicos e houve uma tendência de aumento da taxa de hemorragia cerebral no grupo que recebeu aspirina.(1,49)

Pacientes com EI já em uso de anticoagulantes orais apresentam risco de hemorragia intracraniana, que parece ser maior em pacientes com EI de valvas protéticas por *S.aureus* e em pacientes com história de evento neurológico prévio. As diretrizes da Sociedade Européia de Cardiologia, atualmente, recomendam a substituição do anticoagulante oral por heparina por duas semanas em pacientes já em uso de anticoagulantes orais com EI complicada por acidentes encefálicos isquêmicos e não hemorrágicos. Esta diretriz, entretanto, refere que os níveis de evidência para esta recomendação são baixos. (1,2)

2.1.8 Profilaxia

As indicações de profilaxia para EI sofreram alterações na última década. Segundo a mais recente diretriz sobre EI, essas alterações tiveram o objetivo de evitar o uso extensivo e sem evidências de antibióticos para a profilaxia, limitando seu uso aos pacientes de maior risco. (2,50)

Atualmente, as recomendações das principais diretrizes para profilaxia da EI abrangem um grupo específico de pacientes. Apesar de pequenas diferenças entre essas diretrizes, as orientações são concordantes na indicação de profilaxia para pacientes com valvas protéticas, pacientes com história prévia de EI ou pacientes com doença cardíaca congênita sem reparo cirúrgico ou com defeitos residuais, que irão submeter-se a procedimentos odontológicos invasivos (por exemplo, perfuração da mucosa oral). (1,2,51)

A higiene oral adequada e regular é recomendada para a prevenção de EI. A bacteriemia transitória ocorre frequentemente no contexto de atividades rotineiras como escovar os dentes e usar o fio dental. Assim, é plausível que uma grande proporção de bacteriemias causadoras de EI possa derivar dessas ações diárias. Bacteriemia pode ser observada em pacientes com má higiene bucal, independentemente da realização de procedimentos dentários. (2,52)

O esquema antibiótico mais utilizado em adultos para a profilaxia e que consta nas diretrizes atuais consiste na administração de 2g de amoxicilina ou ampicilina por via oral ou venosa em dose única, de 30 minutos a uma hora antes do procedimento dentário. Se há história de alergia à penicilina ou à ampicilina, pode ser utilizada clindamicina 600mg por via oral ou venosa, também precedendo o procedimento dentário em 30 minutos ou uma hora. (2)

2.1.9 Conclusão

EI é doença grave, ainda caracterizada por altas taxas de mortalidade. A apresentação clínica é bastante variável, dependendo do agente microbiano causador, pelas condições predisponentes e comorbidades do paciente.

Avanços científicos recentes propiciaram melhoras no reconhecimento e tratamento da doença. Permanecem, entretanto, várias dificuldades e áreas de incerteza.

A duração apropriada da terapia antibiótica, especialmente os aminoglicosídeos, permanece incerta. A combinação de ciprofloxacina oral e rifampicina foi relatada como efetiva para o tratamento de EI por *S.aureus* em um estudo com usuários de drogas endovenosas; a terapia oral, entretanto, não pode ser ainda recomendada para o tratamento de EI. (1)

O momento adequado para a realização da cirurgia permanece controverso, apesar do benefício sugerido por ensaio clínico randomizado recente. Quando a cirurgia é

realizada durante a primeira semana de tratamento antibiótico, pode haver riscos maiores de recidiva e disfunção da prótese valvar. (1)

Estudos adicionais são necessários para melhor compreensão da doença e esforços devem continuar sendo empreendidos na tentativa de facilitar o diagnóstico e o manejo terapêutico.

2.2 Citocinas

2.2.1 Definição

As citocinas consistem em um grande grupo heterogêneo de proteínas solúveis de baixo peso molecular produzidas por muitos tipos diferentes de células. As citocinas medeiam e regulam todos os aspectos da imunidade natural e adaptativa. (53,54) O termo citocina provém de “*cyto*”, “célula”, e do grego “*kinein*”, “mover-se”, denotando o papel destas proteínas na comunicação entre as células. (53)

O desenvolvimento de uma resposta imune efetiva envolve a mobilização de diversos tipos celulares, como células linfóides, células inflamatórias e células hematopoiéticas. Várias células efectoras, entre as quais as que agem sobre antígenos e reparam lesões teciduais, podem ser transportadas pela corrente sanguínea, atingindo órgãos e tecidos ou estruturas mais organizadas do tecido linfático. Esse estado dinâmico representa um desafio para o sistema celular, sendo necessária a elaboração de uma resposta rápida e integrada ao insulto antigênico em qualquer parte do corpo. (55)

Os mecanismos que permitem tal sofisticação na resposta imune dos mamíferos abrangem uma enorme variedade de mensageiros solúveis. As citocinas constituem o grupo melhor caracterizado dentre esses mensageiros. (55) As citocinas podem agir localmente ou à distância, de maneira específica ou generalizada, transitoriamente ou de maneira sustentada, funcionando como meio de comunicação fundamental para as células do sistema imune. (53,55)

2.2.2 Histórico

As citocinas evoluíram a partir de formas mais precoces de moléculas intracelulares, antes do surgimento de receptores e cascatas sinalizadoras. Atividades semelhantes às das citocinas foram demonstradas em invertebrados como *Drosophila* e estrela do mar, onde exercem papel essencial na defesa e reparo. A elevação da temperatura corporal como um mecanismo de sobrevivência foi demonstrada em lagartos peilotérmicos. As funções iniciais das citocinas na evolução compreendem sua atuação como fatores de transcrição; posteriormente, passaram a atuar também como ligantes de receptores específicos. (56)

O primeiro passo para a descoberta das citocinas e suas atividades é proveniente do estudo microscópico em laboratório da secreção purulenta resultante de processos inflamatórios e infecciosos. Estudos realizados na década de 1940 identificaram “fatores solúveis” como produtos dos glóbulos brancos sanguíneos. (56)

A atividade das citocinas foi reconhecida somente na década de 1960, quando “fatores solúveis” foram descobertos em sobrenadantes de culturas *in vitro* de linfócitos. Observou-se que estes fatores solúveis podiam regular a proliferação, diferenciação e maturação de células do sistema imune. Posteriormente, detectou-se indução da produção destes fatores em resposta à estimulação com antígeno. (53)

As ações desses “fatores solúveis” como reguladores das funções dos linfócitos foi descoberta apenas na década de 1970, com a primeira descrição de um “fator ativador de linfócito” e posteriormente com a identificação de um “fator estimulador de crescimento das células T.” (56)

As técnicas de clonagem gênica desenvolvidas durante as décadas de 1970 e 1980 propiciaram grande avanço, pois tornaram possível a produção de citocinas puras. Havia anteriormente grande dificuldade para o isolamento químico e purificação das citocinas, devido às baixas concentrações em sobrenadantes de culturas. (53)

O primeiro sistema de ensaios simples foi criado após a descoberta de linhagens celulares cujo crescimento dependia da presença de citocinas específicas. O desenvolvimento de técnicas quantitativas para detecção de cada uma das mais importantes citocinas foi viabilizado após a origem de anticorpos monoclonais específicos. (53)

Durante os últimos 25 anos, o estudo das citocinas tem ocupado lugar de destaque na Medicina, por sua utilidade potencial como agentes diagnósticos, prognósticos e terapêuticos nas doenças humanas. As citocinas são estudadas atualmente em praticamente todas as disciplinas biológicas; seus efeitos dominam principalmente os estudos sobre inflamação, imunologia, aterosclerose e oncologia. (56)

2.2.3 Nomenclatura e classificação

Os “fatores solúveis” foram inicialmente nomeados de acordo com suas fontes primárias: “linfocinas” (fatores secretados pelos linfócitos) e “monocinas” (fatores secretados por monócitos e macrófagos”. Essa nomenclatura, entretanto, não permaneceu por muito tempo e foi posteriormente modificada para “citocinas”. (53,56)

A designação de cada citocina específica é um tanto aleatória, e muitas delas são arbitrariamente nomeadas com base em uma das atividades biológicas descobertas (por exemplo, fator de necrose tumoral, interferons), enquanto outras são denominadas interleucinas (IL), com um número como sufixo, visto que se acreditava serem produzidas pelos leucócitos e neles atuarem. (54)

A designação das interleucinas por meio de um sistema numérico simplifica o dilema da existência de vários nomes descrevendo atividades biológicas. Essa nomenclatura, entretanto, não fornece indicação das propriedades dessas moléculas. Os números são apenas indicadores da ordem de descrição do DNA complementar associado a uma atividade. (56)

O quadro a seguir, presente em revisão recente sobre as citocinas, (56) propõe classificação dessas substâncias em classes funcionais. Essa classificação não inclui os receptores solúveis de citocinas, como a proteína ligante da IL-18. (56)

Quadro 2.2 Classes funcionais das citocinas

Classe funcional	Propriedade primária	Outros efeitos	Exemplos
Fatores de crescimento de linfócitos	Expansão clonal	Polarização Th1/Th2/Th17	IL-2, IL-4, IL-7, IL-17, IL-15
Citocinas Th1	Aumentam resposta Th1	Expansão clonal de CTL	IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18
Citocinas Th2	Aumentam resposta Th2	Aumentam a produção de anticorpos	IL-4, IL-5, IL-18, IL-25, IL-33
Citocinas Th17	Aumentam resposta Th17, IFN- γ	Respostas autoimunes	IL-17, IL-23, IFN- γ
Citocinas pró-inflamatórias	Aumentam mediadores inflamatórios	Aumentam respostas imunes inatas	IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-18, IL-23, MIF, IL-32, IL-33
Citocinas anti-inflamatórias	Reduzem expressão de genes inflamatórios	Reduzem a letalidade mediada por citocinas e a atividade de doenças autoimunes	IL-10, IL-13, TGF- β , IL-22, IL-1Ra, IFN- α/β
Adipocinas	Pró-inflamatórias	Pró-aterogênicas, anti-inflamatórias	IL-1 α , TNF- α , IL-6, leptina, adiponectina, resistina
Citocinas sinalizadoras gp130	Fatores de crescimento	Ativação de células B, fase aguda	IL-6, CNTF, IL-11, LIF, CT-1
Fatores de crescimento de nervos	Aumentam produção de nervos e células de Schwann	Ativação de células B	BDNF, NGF
Citocinas	Reabsorção óssea	Estimulação imune	RANKL

ativadoras de osteoclastos			
Fatores estimuladores de colônias	Hematopoiese	Pró e anti-inflamatórios	IL-3, IL-7, G-CSF, GM-CSF, M-CSF
Citocinas angiogênicas	Neovascularização	Pró-metastáticas	VEGF, IL-1, IL-6, IL-8
Fatores de crescimento mesenquimais	Fibrose	Pró-metastáticos	FGF, HGF, TGF- β , BMP
IFN tipo II	Ativação de macrófagos	Aumentam MHC tipo II	IFN- γ
IFN tipo I	Anti-virais, aumentam MHC classe I	Anti-inflamatório, anti-angiogênico	IFN- α , IFN- β
Quimiocinas	Aumentam migração celular	Aumentam ativação celular	IL-8, MCP-1, outras

Fonte: Modificado de Dinarello *et al.*, 2007. (56)

Nota: IL: interleucina; Th1: linfócito T *helper* subtipo 1; Th2: linfócito T *helper* subtipo 1; Th17: linfócito T *helper* subtipo 17; IFN: interferon; TNF: fator de necrose tumoral; CTL: linfócitos T citotóxicos; MIF: fator de inibição da migração de macrófagos; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; CNTF: fator neurotrófico ciliar; CT-1: cardiotrofina-1; LIF: fator inibidor de leucemia; NGF: fator de crescimento de nervos; RANKL: ligante RANK (ativador receptor para fator nuclear ligante kB); G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos; GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos; M-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; FGF: fator de crescimento de fibroblastos; HGF: fator de crescimento de hepatócitos; TGF- β : fator de transformação do crescimento β ; BMP: proteína óssea morfogenética; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1.

Os termos “citocinas Th1”, “citocinas Th2” e “citocinas Th17” referem-se às citocinas envolvidas, respectivamente, com os subtipos distintos de células T CD4+: Th1, Th2 e Th17. Esses subtipos de células T auxiliares funcionam na defesa do hospedeiro, estando cada um relacionado a diferentes tipos de agentes infecciosos e também a diferentes tipos de lesão ao tecido nas patologias imunomediadas. (57)

As adipocinas são um grupo de citocinas produzidas pelo tecido adiposo branco (incluindo macrófagos residentes) que apresentam papel na síndrome metabólica, particularmente na resistência à insulina, sendo também relacionadas a doenças relacionadas à obesidade, como diabetes tipo 2. Várias adipocinas, como a IL-1 α e TNF- α , já são reconhecidas por sua atividade pró-inflamatória em processos ateroscleróticos. (56)

As citocinas são também agrupadas em famílias, conforme sua atividade biológica. As citocinas não são, entretanto, membros de uma única superfamília de genes. Poucas similaridades foram observadas em seu nucleotídeo primário ou nas sequências de aminoácidos e seus genes estão, em sua maioria, dispersos pelo genoma humano. (55) O genoma humano contém cerca de 180 genes que podem codificar proteínas com as características estruturais das citocinas. (54)

A família do TNF inclui mais de 20 membros, sendo cada um deles um produto genético distinto, mas com uma considerável superposição de propriedades biológicas, como participação no processo de morte celular. (56)

A família da IL-1, de maneira semelhante, tem diversos membros e inclui IL-1 α , IL-18 e IL-33. Cada membro da família IL-1 é codificado por um gene diferente, mas, de maneira semelhante aos membros da família TNF, apresentam funções superpostas, sobretudo pró-inflamatórias. A família da IL-6 inclui vários membros como IL-6, fator inibidor da leucemia, IL-11, oncostatina, cardiotropina-1. Todos os membros dessa família induzem produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, apesar de apresentarem outras propriedades biológicas não relacionadas. (56)

A família da IL-10 incluiu a IL-22 e representa uma família de citocinas que inibem a inflamação e a resposta imune. Os fatores estimuladores de colônias, como a IL-3, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), macrófagos (M-CSF) e granulócitos-macrófagos (GM-CSF), também apresentam funções biológicas semelhantes, apesar de serem produtos genéticos distintos, com receptores específicos. (56)

A família mais expressiva de citocinas corresponde às quimiocinas (citada no Quadro 2.2), uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas. Há mais de 30 genes

separados no genoma humano para as quimiocinas. Elas estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a sua migração do sangue para os tecidos. O termo quimiocina é uma contração de “citocina quimiotática”. (56,58)

O avanço das técnicas científicas tem permitido a descoberta crescente de novas citocinas e novos receptores. Muitas atividades e interações entre estas proteínas, bem como características contraditórias, têm sido descritas. É importante destacar que todas essas moléculas apresentam propriedades em comum, e aproximadamente todas as citocinas recém-descobertas agem em conjunto com as citocinas já descritas. (53)

2.2.4 Propriedades das citocinas

As citocinas compartilham muitas propriedades gerais, entre elas o mecanismo de atuação. As citocinas ligam-se a receptores específicos de membranas nas células-alvo, o que desencadeia uma via de transdução de sinais. O efeito final dessa via de transdução é a alteração da expressão gênica em células-alvo. (53,54)

As citocinas e seus receptores inteiramente montados exibem alta afinidade e liberam sinais intracelulares. Essa alta afinidade permite que concentrações pico molares de citocinas possam ser responsáveis por efeitos biológicos. (53)

A presença de receptores de membrana específicos determina a susceptibilidade de uma célula-alvo a uma citocina particular. Os receptores de citocinas podem ser constituídos de várias cadeias diferentes. A combinação dessas cadeias pode variar de acordo com a afinidade com a qual se ligam à citocina. (53)

As citocinas atuam, em sua maioria, nas proximidades do local em que são produzidas, seja na mesma célula que secreta a citocina (ação autócrina) ou em uma célula adjacente (ação parácrina). Isto pode ser um motivo pelo qual as citocinas frequentemente atuam sobre células que estão em contato com células que as produzem. Atualmente, entretanto, sabe-se que algumas citocinas podem funcionar como proteínas de membrana e algumas nunca são liberadas da célula. (54,56)

Quando produzidas em grandes quantidades, as citocinas podem entrar na circulação e atuar à distância do seu local de produção, o que é considerada uma ação endócrina. (54) As citocinas são entendidas por alguns pesquisadores como os “hormônios” das respostas imune e inflamatória. Várias propriedades das citocinas escapam, entretanto, desta definição. Por exemplo, o papel das citocinas na resposta imune a antígenos nos órgãos linfóides é principalmente local. Além disso, hormônios são produtos primários de um tecido ou célula específicos, enquanto as citocinas são produtos da maior parte das células. Durante a resposta inflamatória sistêmica, porém, as citocinas realmente exibem atividades endócrinas, como a estimulação da síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado e a liberação de leucócitos pelo tecido ósseo marrom, sendo nesses casos os alvos de ação distantes do local de infecção ou inflamação. (54,56)

Uma citocina pode atuar em diversos tipos de células e exercer múltiplos efeitos biológicos, propriedade designada como pleiotropismo. A maioria das citocinas possui uma ou duas propriedades proeminentes, além de outros efeitos. Conforme mostrado no Quadro 2.2, algumas citocinas atuam primariamente como fatores de crescimento dos linfócitos T ou B; outras funcionam como mediadores da inflamação, enquanto outras suprimem a atividade inflamatória e as respostas imunes. (53,54,56)

O pleiotropismo é um conceito que em um primeiro momento se opõe ao fato de que cada citocina liga-se a seu receptor específico, iniciando uma cascata de sinais intracelulares. Assim, como relacionar propriedades múltiplas e variadas a uma única citocina? Uma possível explicação seria o fato de que, em alguns casos, o receptor da citocina é encontrado primariamente em um tipo celular, enquanto em outros casos o receptor é encontrado em quase todos os tipos celulares, como o que ocorre com IL-1 e TNF- α . Uma outra explicação para a natureza pleiotrópica das citocinas é sua habilidade em funcionar como coativadores. (56)

Uma citocina pode estimular ou inibir a produção de outras, e as citocinas podem antagonizar umas às outras ou produzir efeitos aditivos ou sinérgicos. (59) O sinergismo de citocinas ocorre quando o efeito combinado de duas citocinas é maior que os efeitos aditivos das citocinas individualmente. (53)

É importante mencionar que, em contrapartida, várias citocinas podem exercer a mesma ação, sendo descritas como redundantes. (54,59) Essa característica é mais bem explicada quando se consideram a defesa do hospedeiro e a função imune. A existência de poucas citocinas para resgatar o hospedeiro de uma infecção letal é pouco compatível com os processos evolutivos. Quando existe ameaça causada, por exemplo, por uma invasão microbiana, vários genes são ativados, levando à produção de citocinas e mobilizando vários mecanismos de defesa. Várias citocinas auxiliam as células dendríticas no processo de apresentação de antígenos, resultando na geração de linfócitos citotóxicos e na produção de anticorpos neutralizantes. (56)

Outra propriedade importante das citocinas é a capacidade de indução de cascatas de sinalização: a ação de uma citocina em uma célula-alvo induz a célula a produzir uma ou mais citocinas, as quais podem induzir outras células-alvo a produzir outras citocinas. Esse mecanismo permite respostas rápidas e amplificadas do sistema imune. (53)

As citocinas também compartilham alguns mecanismos de controle de suas ações, entre os quais a regulação da expressão de seus receptores nas células. Esses receptores são expressos em uma célula somente após a interação desta célula com o antígeno. Esta propriedade limita a resposta das citocinas a linfócitos ativados por antígenos. Além disso, a secreção de citocinas ocorre apenas após a interação da célula produtora de citocina com a célula-alvo, determinando assim que concentrações efetivas de citocinas ocorram apenas localmente, sendo insuficiente para afetar células mais distantes. Outro ponto de controle comum às citocinas é sua curta meia-vida na corrente sanguínea e em outros fluidos extracelulares; essa propriedade assegura que as citocinas ajam por período limitado de tempo e em curta distância. (53)

2.2.5 Produção

Toda célula, com exceção das hemácias, pode produzir, bem como responder a uma citocina. (56) Entretanto, a maior parte das linhagens celulares expressam somente um subconjunto de genes relacionados às citocinas. A especialização contribui para a localização anatômica da síntese de citocinas, limitando a exposição a um largo espectro

de potenciais alvos celulares em tecidos distantes. Enquanto algumas citocinas são expressas por muitas e diferentes linhagens hematopoiéticas e não-hematopoiéticas (por exemplo, IL-1, IL-6, TNF- α), outras estão altamente restritas (por exemplo, IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5, cuja produção é limitada a certos leucócitos como eosinófilos). Especializações adicionais podem ser observadas, por exemplo, entre as células T, de acordo com o estágio de diferenciação e estado de ativação. (55)

A síntese das citocinas é iniciada por nova transcrição gênica como resultado da ativação celular. As citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas, de maneira geral. A ativação da transcrição é transitória, e os RNA mensageiros que codificam a maioria das citocinas são instáveis, sendo, frequentemente, rapidamente degradados. Após sua síntese, as citocinas são rapidamente secretadas, resultando em um surto de liberação, quando necessário. (54,59)

A produção de algumas citocinas pode ser regulada por processamento do RNA e por mecanismos pós-tradução, como a liberação proteolítica de um produto ativo de um precursor inativo. (54)

Diferentes imunógenos induzem a síntese de diferentes citocinas que, por sua vez, ativam diferentes mecanismos efetores do sistema imune. A natureza dessa resposta seletiva de citocinas dita o desfecho da interação entre o hospedeiro e o “parasita” (agente infeccioso, tumores, corpos estranhos ou outra fonte de antígenos) em muitas circunstâncias. Foram identificados vários mecanismos que capacitam as células produtoras de citocinas a responderem aos estímulos do ambiente por meio da síntese de citocinas apropriadas no local correto e pela duração necessária. (55)

Conforme mencionado previamente, as citocinas geralmente não são produzidas constitutivamente. A natureza do estímulo que desencadeia a síntese varia de acordo com o tipo celular e seu estágio de diferenciação e ativação, determinando quais citocinas serão produzidas por aquela célula. As células T *helper*, as principais produtoras de citocinas, secretam essas proteínas quando o receptor de células T reconhece um antígeno ligado a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em uma célula apresentadora de antígeno apropriada, como macrófagos, células dendríticas ou células B. (53, 55)

Há vários sinais que desencadeiam a síntese de citocinas. Entre os sinais mais importantes estão aqueles reconhecidos como elementos “não-próprios”: antígenos isolados ou ligados a moléculas MHC, complexos antígeno-anticorpo detectados por receptores do sistema complemento, superantígenos, como algumas enterotoxinas bacterianas, e outros constituintes de microorganismos (como os lipopolissacarídeos [LPS]) e vírus (como RNA de fita dupla). (55)

A síntese das citocinas pode também ser induzida ou modulada por moléculas próprias do hospedeiro, incluindo elementos ligantes de receptores coestimuladores presentes nas células T e nas próprias citocinas. (55)

2.2.6 Receptores

Conforme mencionado previamente, as citocinas exercem seu efeito biológico por meio da ligação a receptores específicos presentes nas membranas celulares das células-alvo. Dependendo da citocina e da célula-alvo, o número de receptores pode chegar a mais de 10000, mas pode ser de apenas 10 por célula. (55) De fato, a caracterização dos receptores de citocinas progrediu de maneira lenta inicialmente, pois os níveis dos receptores nas membranas de células responsivas são muito baixos. A clonagem dos genes que codificam os receptores de citocinas propiciou avanço importante para a caracterização desses receptores. (53)

Os receptores de citocinas apresentam constituição semelhante: uma ou mais proteínas transmembrana composta por partes extracelulares e intracelulares. As partes extracelulares são responsáveis pela ligação às citocinas; as partes intracelulares (citoplasmáticas) iniciam as vias de sinalização intracelular. (54)

As vias de sinalização da maioria dos receptores compartilham a mesma maneira de ativação: o ligante induz o agrupamento dos receptores, aproximando as partes citoplasmáticas de duas ou mais moléculas do receptor, culminando com a estimulação da atividade de tirosinocinases não específicas para as receptoras. (54,59)

Algumas famílias de citocinas, como a família do TNF, apresentam via de sinalização distinta: após o contato com ligantes triméricos cognatos, o receptor pré-formado sofre alteração de sua conformação. (59,60)

Os receptores de citocinas são muito diversos estruturalmente; entretanto, quase todos pertencem a uma das cinco famílias: (53)

- a) Receptores de citocinas do tipo I (ou família do receptor de hematopoietina): os membros desta família contêm motivos com sequências conservadas de aminoácidos no domínio extracelular: um ou dois domínios contendo um par conservado de resíduos de cisteína e um motivo peptídico contendo a sequência triptofano-serina-X-triptofano-serina, na qual X é qualquer aminoácido. (53,54)
- b) Receptores de citocinas do tipo II (ou família de receptores dos interferons): os receptores do tipo II são semelhantes aos do tipo I porque possuem dois domínios extracelulares com cisteínas conservadas. Entretanto, os receptores do grupo II não têm o motivo triptofano-serina-X-triptofano-serina. (54)
- c) Família dos receptores de TNF: apresentam domínios extracelulares conservados ricos em cisteína e mecanismos de sinalização intracelular comuns, que em alguns casos induzem a apoptose. (54,60)
- d) Família da IL-1/toll-like receptors (TRL): os receptores desta família compartilham uma sequência citosólica conservada conhecida como domínio do receptor de IL-1/TRL e utilizam vias de transdução de sinais semelhantes às que ativam a transcrição de novos genes. (53,54,61)

Existe ainda uma família de receptores ativados pelas quimiocinas. Estes receptores existem em grande número e são estruturalmente distintos dos receptores de outras citocinas. (53,58)

2.2.7 Funções biológicas das citocinas: uma visão geral

As citocinas possuem inúmeras funções biológicas, podendo ser secretadas por uma grande variedade de células. As citocinas estão envolvidas nas respostas imunes celular e humoral, na indução da resposta inflamatória, na regulação da hematopoiese, no controle da proliferação e diferenciação celulares, entre outras atividades. (53)

O Quadro 2.2 classifica as citocinas dentro de grupos funcionais; é importante mencionar que a maior parte das funções listadas foi identificada por meio de análises *in vitro*. Considerando-se as condições fisiológicas, as citocinas raramente agem isoladamente, sendo que, *in vivo*, uma célula-alvo é exposta a um ambiente contendo um conjunto de citocinas que podem agir de maneira sinérgica, ou antagônica, ou ainda em cascata, gerando resultados diversos. (53,56)

Algumas citocinas são mediadoras e reguladoras da imunidade inata (também denominada imunidade natural ou nativa), que proporciona a linha de defesa inicial contra microorganismos. Exemplos de células que as produzem são células dendríticas, macrófagos e mastócitos. As citocinas envolvidas com a imunidade inata participam ativamente do processo da inflamação ou contribuem para a defesa contra as infecções virais. (53,54)

Além da imunidade inata, existe a imunidade adaptativa (ou adquirida), responsável por combater a infecção por meio de uma resposta específica para o patógeno agressor. A imunidade adaptativa dispõe do fenômeno da memória imunológica, em que exposições sequentes pelo mesmo patógeno geram respostas rápidas e mais vigorosas. Algumas citocinas, particularmente aquelas produzidas por subgrupos de células T *helper*, contribuem para a defesa do hospedeiro mediada pela imunidade adaptativa e também regulam as respostas imunológicas. Membros dessa categoria de citocinas também são responsáveis pela ativação e diferenciação das células T e das células B. (53,57)

As citocinas participam ativamente dos processos de ativação dos linfócitos T, sendo produzidas após o reconhecimento do antígeno pelas células T virgens e contribuindo para a proliferação de linfócitos específicos ao antígeno (expansão clonal) e para a

diferenciação das células virgens em linfócitos efetores. Após a fase de expansão clonal, ocorrem episódios de apoptose em larga escala, resultando em uma redução substancial do número de células T antígeno-específicas. Entretanto, uma subpopulação de células T escapa e permanece como uma população estável de células T de memória. As citocinas estão também intimamente envolvidas nesta etapa, contribuindo para a manutenção, diferenciação e renovação das células T de memória. (62)

As citocinas assumem papel importante em um processo fundamental para a elaboração de uma resposta efetiva contra o patógeno agressor: a diferenciação das células TCD4⁺ em células efectoras dos subtipos Th1, Th2 e Th17. Esse processo é ocasionalmente denominado “polarização das células T”. (57)

As citocinas envolvidas no desenvolvimento dos subtipos de células TCD4⁺ são produzidas pelas células apresentadoras de antígenos e por outras células imunes (como basófilos e mastócitos) presentes no local da resposta imune. Essas citocinas atuam sobre as células T para induzir a transcrição dos genes de citocina próprios da diferenciação de cada subtipo. Uma vez ocorrida a diferenciação, as citocinas continuam a ser produzidas pelo subtipo de células TCD4⁺ gerado, promovendo o desenvolvimento desse subtipo e inibindo a diferenciação na direção de outros subtipos. Estes são exemplos de alças de retroalimentação positiva e negativa, respectivamente. (53,57)

É importante ressaltar que cada tipo de patógeno leva à diferenciação de um determinado subtipo de célula TCD4⁺; o subtipo gerado é justamente aquele que melhor combate o patógeno estimulador de sua diferenciação. Por exemplo, o desenvolvimento das células Th1 é induzido por microorganismos intracelulares. O desenvolvimento das células Th2 e as citocinas produzidas por essas células são críticas para combater os helmintos e estão também envolvidas com o desenvolvimento de doenças atópicas. As respostas do tipo Th17 são induzidas por algumas bactérias e fungos, sendo esta a resposta mais efetiva na defesa contra esses patógenos. Essas funções efectoras são exemplos da especialização da imunidade adaptativa. (57,63)

As citocinas características produzidas pelos principais subtipos de células T CD4⁺ são IFN- γ para as células Th1; IL-4, IL-5 e IL-13 para as células Th2; e IL-17 e IL-22 para

as células Th17. (57) Estudos recentes permitiram identificar o envolvimento de mais duas citocinas derivadas predominantemente de células epiteliais nas respostas tipo Th2: IL-25 e IL-33. (63)

Algumas citocinas são fatores de crescimento para a hematopoiese e regulam a geração de diferentes tipos de células do sistema imune e de seus precursores na medula óssea. (54) Durante a hematopoiese, as citocinas funcionam como sinais direcionadores do desenvolvimento das células progenitoras em linhagens específicas. Um progenitor mielóide comum, conforme a citocina atuante, pode originar eritrócitos ou seguir uma via diferente de diferenciação, produzindo monócitos, neutrófilos e outros leucócitos. (53)

As citocinas são também importantes para a homeostase das células do sistema imune. Por exemplo, cerca de 10^{11} linfócitos periféricos que estão em excesso morrem todos os dias. O tamanho da população de linfócitos é limitado, em parte, pela competição por citocinas, como IL-7 e IL-15: as células que não conseguem sinalização suficiente proveniente dos receptores dessas citocinas não são capazes de sobreviver. A manipulação genética de camundongos, envolvendo a alteração da produção de citocinas ou interferindo com os mecanismos de sinalização destas substâncias pode gerar animais tanto com linfopenia quanto com linfocitose. (64)

As funções biológicas das citocinas são diversas e de importância crucial para o funcionamento adequado do sistema imune. Essas funções estão sendo cada vez mais estudadas, gerando informações que fundamentam sua utilização como ferramentas terapêuticas. Terapias baseadas em citocinas e seus receptores já fazem parte da prática clínica. Exemplos atuais são a utilização de citocinas hematopoiéticas, como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), como suporte de terapias para pacientes com imunodeficiência resultante de defeito genético ou quimioterapia, e a utilização dos interferons (grupo de citocinas com ação antiviral), empregados, entre outras ações, no tratamento da hepatite C. (53)

2.2.8 A resposta inflamatória e as principais citocinas envolvidas

A inflamação corresponde ao processo básico por meio do qual o sistema imune inato responde às infecções e lesões teciduais. Esse processo normalmente leva ao reparo estrutural e funcional, sendo, portanto, fundamental para a manutenção da homeostase tecidual. (65)

O reconhecimento da inflamação data de tempos remotos. Os romanos descreveram há cerca de 2000 anos os marcadores da resposta inflamatória: tumor, rubor, calor e dor. O físico Galen acrescentou, no século II, outro marcador: a perda de função (*functio laesa*). Embora os processos relacionados à inflamação e suas implicações clínicas sejam objetos de estudo por mais de 3000 anos, ainda há campos sendo explorados. Atualmente encontra-se em foco o envolvimento da inflamação em condições como aterosclerose, neoplasias, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica. (65,66)

Considerando-se os processos evolutivos, a inflamação precede, em longo tempo, o desenvolvimento da imunidade adaptativa: todos os organismos multicelulares apresentam elementos da inflamação. Entretanto, a resposta inflamatória fornece sinais que induzem, juntamente com os antígenos, a proliferação e a diferenciação de linfócitos T e B antígeno-específicos. Assim, apesar de sua interconexão profunda com a imunidade inata, a inflamação é um elemento fundamental para o início da resposta imune adaptativa. (65)

A inflamação pode ser aguda, podendo desenvolver-se de minutos a horas e perdurar por dias. Caso a infecção não seja eliminada ou caso haja lesão tecidual prolongada, os processos inflamatórios podem persistir, constituindo-se assim a inflamação crônica. A inflamação crônica envolve remodelamento tecidual, angiogênese e fibrose, podendo levar a consequências patológicas, como na artrite reumatóide. (59,66) Percebe-se assim um paradoxo na inflamação: embora seja um processo essencial para a manutenção da homeostase tecidual, seus mecanismos podem também contribuir para a injúria aos tecidos. (65)

Os processos envolvidos na inflamação seguem uma sequência muito bem coordenada pelo sistema imune. Cerca de minutos após a lesão tecidual, ocorrem alterações reversíveis nos vasos sanguíneos do tecido infectado ou danificado, incluindo dilatação arteriolar e aumento do fluxo sanguíneo no tecido. Ocorre também aumento da permeabilidade de capilares e vênulas às proteínas plasmáticas e aos fluidos, resultando em edema tecidual. Outra alteração fundamental é a maior adesão dos leucócitos circulantes ao revestimento endotelial das vênulas, permitindo aos leucócitos a passagem através das paredes capilares e a entrada no espaço tecidual. Os leucócitos recém-chegados fagocitam os patógenos invasores, removem os debris celulares e estimulam o reparo do tecido, além de liberar mediadores moleculares que contribuem para a resposta inflamatória e o recrutamento e ativação de células efetoras. (59,65,66)

O principal leucócito recrutado do sangue aos sítios de inflamação aguda é o neutrófilo. Estas células utilizam várias moléculas efetoras tóxicas para combater os microorganismos invasores. Além dessa ação direta, os neutrófilos e outros granulócitos (eosinófilos e basófilos) também exibem propriedades imunomoduladoras importantes, sendo capazes de produzir vários mediadores proinflamatórios. (59,67) O avanço da resposta inflamatória é caracterizado pela presença cada vez mais proeminente de monócitos circulantes, que se transformam em macrófagos nos tecidos e podem ser a população dominante em algumas reações. (59)

Além de células inflamatórias, importantes proteínas plasmáticas também adentram o sítio inflamatório: proteínas do sistema complemento, anticorpos e proteínas de fase aguda. As proteínas do sistema complemento realizam a opsonização de microorganismos, recrutam fagócitos para o sítio de infecção e, em alguns casos, efetuam a morte direta de patógenos. (59,66) Considerando-se os anticorpos, aqueles com milhões de especificidades diferentes são produzidos por linfócitos B como parte do sistema imune adaptativo. Existem, porém, subtipos de linfócitos B produtores de anticorpos com número limitado de especificidade, denominados anticorpos naturais. Esses anticorpos já estão presentes antes da infecção e reconhecem padrões moleculares comuns em microorganismos ou células danificadas ou mortas, sendo capazes de conferir proteção contra infecções bacterianas e facilitar a fagocitose de células apoptóticas. (59)

As proteínas de fase aguda são produzidas principalmente pelo fígado pelo estímulo de algumas citocinas pró-inflamatórias. O significado fisiológico de muitas proteínas desse grupo ainda não foi identificado; porém, sabe-se que algumas fazem parte da resposta imune inata para infecções. A família das pentraxinas é uma das mais estudadas, sendo seus componentes mais clássicos a proteína-C-reativa e o componente amilóide P sérico. Essas proteínas se ligam preferencialmente a monócitos e neutrófilos e opsonizam alvos (patógenos) para fagocitose direta por estas células ou indiretamente por meio da ativação do complemento. A proteína-C-reativa é forte reagente da resposta de fase aguda. Sua dosagem é utilizada como marcador de inflamação e infecção. (66, 68)

Os processos inflamatórios mencionados são orquestrados por diversos mediadores. Esses mediadores são moléculas solúveis que agem nas células inflamatórias por meio de receptores específicos. Entre os principais mediadores estão as citocinas, revisadas anteriormente. As citocinas apresentam papel importante na regulação do desenvolvimento e funcionamento das células efetoras imunes. As quimiocinas constituem uma família de citocinas cuja atividade característica é sua capacidade controlar a adesão, quimiotaxia e ativação de várias subpopulações de leucócitos, regulando o trânsito destas células. (65)

Diversas citocinas, pertencentes a outras famílias além da família das quimiocinas, estão envolvidas no processo inflamatório. Destacam-se, dentre elas, o TNF- α , a IL-1- β e IL-6. Também são importantes para os processos inflamatórios as citocinas IL-8, IL-10 e IL-12. Estas citocinas serão abordadas a seguir, com ênfase em suas funções biológicas. (59)

a) Fator de necrose tumoral - α (TNF- α)

O TNF é o mediador das respostas inflamatórias agudas a bactérias e outros microorganismos. (69)

O TNF é também chamado TNF- α , para sua distinção do TNF- β . O TNF- β foi inicialmente descrito como linfotoxina, porém sua homologia com o TNF- α e a existência de receptores celulares em comum, levaram à alteração de sua denominação para TNF- β . (59,60)

A história da identificação dessa citocina tem início na década de 1940, quando foi demonstrado que lipopolissacarídeos isolados de extratos bacterianos eram capazes de induzir regressão tumoral em camundongos. (69) Entretanto, somente nas décadas de 1960 e 1970, os cientistas voltaram a dedicar-se seriamente ao estudo desses extratos. Felizmente, os avanços da biologia molecular ocorridos nesta época permitiram a identificação da substância responsável pela atividade de necrose tumoral, que acabou recebendo o nome vinculado à ação biológica inicialmente descrita: fator de necrose tumoral. (60,69)

A maior fonte de TNF são as células da linhagem monócito/macrófagos, sendo que linfócitos T, neutrófilos, mastócitos e células endoteliais podem também contribuir para sua produção sob diferentes circunstâncias. (70)

Os receptores de TNF são membros de uma grande família de proteínas denominada superfamília do receptor de TNF, muitas das quais estão envolvidas em respostas imunológicas e inflamatórias. Dois receptores distintos de TNF, chamados tipo I (TNF-RI) e tipo II (TNF-RII) são encontrados na maioria dos tipos celulares. A ligação do TNF a alguns membros da família de receptores desencadeia mecanismos que ativam fatores de transcrição, enquanto a ligação do TNF a outros membros leva ao recrutamento de uma proteína que determina a apoptose. Assim, conforme o membro da família de receptores a que se liga, o TNF pode induzir a expressão gênica ou a morte celular, sendo que alguns receptores podem fazer as duas ações. (59)

Diversos estímulos potencialmente nocivos, desde os físicos (calor, luz ultravioleta) até os químicos e imunológicos, podem induzir rapidamente a produção e a liberação de TNF. Esta citocina é a citocina pró-inflamatória mais rapidamente produzida *in vivo*, apresentando níveis séricos detectáveis em camundongos em 30 minutos. Essa elevação provavelmente provém da liberação de estoques pré-formados da citocina em macrófagos, neutrófilos e linfócitos T ativados. (70)

O TNF é considerado um pirógeno endógeno, sendo capaz de agir no hipotálamo e induzir o aumento da temperatura corporal (febre). Sua ação envolve também a indução da expressão de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, que são secretadas no sangue. (59,71)

Existem evidências sugerindo que o TNF coordena a resposta das citocinas à injúria tecidual, agindo como um “alarme de incêndio”. O TNF leva ao aumento da produção de macrófagos pelas células progenitoras, além de promover a ativação e diferenciação desses macrófagos e prolongar sua sobrevivência. Além disso, o TNF induz a produção de múltiplas quimiocinas e moléculas de adesão, atraindo rapidamente leucócitos ao sítio de infecção. Esta citocina também aumenta a adesividade de integrinas nos neutrófilos (proteínas de superfície celular que medeiam a adesão das células a outras células ou à matriz extracelular). Assim promove o extravasamento dos neutrófilos para os tecidos. O TNF foi ainda identificado como um dos principais mediadores da ativação da coagulação induzida pela inflamação, apresentando ação reguladora positiva potente sobre a expressão endotelial de procoagulantes. (70,71)

O TNF exerce também outras funções que corroboram com seu papel de regulador principal da produção de citocinas inflamatórias. Se a rápida liberação do TNF em momentos de estresse é bloqueada, a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6, é reduzida. O TNF tem também a capacidade de exercer regulação positiva sobre o sistema imune, amplificando cascatas inflamatórias de maneira autócrina e parácrina e estimulando macrófagos a secretar outras citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, a exposição prolongada e excessiva a esta citocina pode ser imunossupressiva. (70,71)

O TNF pode ser produzido em grandes quantidades durante infecções por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Essas bactérias liberam de suas paredes, respectivamente, substâncias como lipopolissacarídeos (LPS) e ácido lipoteicoico. A ligação destes componentes microbianos a receptores de diversos tipos celulares leva à ativação de várias vias de sinalização, induzindo a expressão de genes cujos produtos são importantes para a resposta inflamatória. O TNF é um desses produtos. (59,72)

Caso o estímulo para a produção de TNF seja suficientemente forte, por exemplo, na existência de infecções graves, a quantidade sintetizada pode ser muito grande. Níveis muito elevados de TNF são capazes de atingir a corrente sanguínea e atuar em locais distantes. O TNF é considerado um dos principais mediadores da sepse e de suas formas mais severas, a sepse grave e o choque séptico. (71) A injeção experimental de TNF em animais causa uma síndrome praticamente indistinguível do choque séptico e a infusão de TNF recombinante em humanos resulta na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). (71)

Conforme mencionado previamente, o TNF amplifica cascatas inflamatórias, ativando a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos macrófagos. Quando o TNF é produzido em grandes quantidades, suas ações têm consequências sistêmicas, como a inibição da contratilidade do miocárdio e do tônus da musculatura lisa vascular, causando grande redução na pressão arterial e podendo levar ao choque circulatório. (59)

O TNF também estimula a expressão de fator tecidual pelas células endoteliais, um potente ativador da coagulação, e inibe a expressão de trombomodulina, um inibidor da coagulação. Assim, pode haver o desenvolvimento de trombose intravascular, contribuindo para o fenômeno de coagulação intravascular disseminada, característico do choque séptico. (71)

Finalmente, a produção prolongada de TNF pode levar a alterações metabólicas, como à diminuição do apetite e à redução da síntese da lipoproteína lipase. Essa enzima é necessária para a liberação de ácidos graxos das lipoproteínas circulantes para sua utilização pelos tecidos. A consequência é a fadiga de células musculares e adiposas, também denominada caquexia. (59)

Em uma das primeiras abordagens para o tratamento da sepse utilizou-se antagonistas de TNF, como anticorpos monoclonais contra TNF e receptores solúveis de TNF. Resultados iniciais positivos foram obtidos em modelos experimentais, porém esses antagonistas não se mostraram capazes de reduzir a mortalidade de pacientes sépticos avaliados em ensaios clínicos. (71) A causa dessa falha terapêutica não é conhecida, mas algumas explicações foram elaboradas. Uma delas diz respeito a fato de que,

devido à propriedade de redundância, outras citocinas provocam as mesmas respostas que o TNF, não sendo possível gerar um bloqueio total das atividades inflamatórias compartilhadas por estas substâncias. Outra explicação seria a ação muito precoce do TNF: durante a progressão da doença, os níveis circulatórios de TNF retornam praticamente aos níveis basais após poucas horas. Assim, haveria uma janela muito estreita para a intervenção terapêutica. (59,71)

b) Interleucina -1 β (IL-1 β)

A IL-1 foi a primeira interleucina a ser descrita, como o próprio nome sugere. Ela apresenta duas formas, denominadas IL-1 α e IL-1 β , que se ligam aos mesmos receptores celulares de superfície e apresentam atividades biológicas idênticas. A IL-1 β circula de maneira sistêmica, sendo a principal forma biologicamente ativa secretada. (59,61)

As duas formas de IL-1 (IL-1 α e IL-1 β), apesar de se ligarem aos mesmos receptores e exercerem as mesmas ações, diferenciam-se de diversas maneiras. Enquanto a IL-1 β circula de maneira sistêmica, a IL-1 α geralmente está associada com a membrana plasmática da célula produtora, agindo localmente. Considerando-se as fontes celulares produtoras, a IL-1 β é produzida principalmente por monócitos e macrófagos, enquanto a IL-1 α pode ser produzida por queratinócitos e células endoteliais. Finalmente, os genes de IL-1 α e IL-1 β são regulados de maneira diferente, resultando em contribuições diversas durante a ativação da resposta imune. (59,61)

Muitos membros da família IL-1 (IL-1F) foram identificados nas últimas décadas, resultando na atribuição de novos nomes aos seus componentes (ver Quadro 2.3). (73) Atualmente são descritos 11 membros, entre eles IL-1 α , IL-1 β , antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) e IL-18. Os membros desta família provavelmente surgiram da duplicação de um gene ancestral comum, pois possuem uma estrutura genética altamente conservada. Considerando-se as famílias de citocinas, a família IL-1 é a única que exerce controle da inflamação em dois níveis: nível do receptor e nível nuclear. Os membros da família de receptores de IL-1 apresentam ativadores e supressores da

inflamação. Um exemplo importante é o IL-1Ra, que se liga ao receptor tipo I de IL-1 (IL-1RI) e bloqueia a atividade de IL-1 α e IL-1 β . O IL-1Ra é utilizado para tratamento dos sinais e sintomas da destruição articular na artrite reumatóide. (61,73)

Quadro 2.3 Membros da família IL-1 (IL-1F)

Novo nome	Nome prévio	Propriedade
IL-F1	IL-1 α	Agonista (inflamatória)
IL-F2	IL-1 β	Agonista (inflamatória)
IL-F3	IL-1Ra	Receptor antagonista
IL-F4	IL-18; fator indutor de IFN- γ	Agonista (inflamatória)
IL-F5	FIL1 δ	Anti-inflamatória
IL-F6	FIL-1 ϵ	Agonista (inflamatória)
IL-F7	IL1H4, IL-1 ζ	Anti-inflamatória
IL-F8	IL-1H2	Agonista (inflamatória)
IL-F9	IL-1 ϵ	Agonista (inflamatória)
IL-F10	IL-1H γ 2	Receptor antagonista(?)
IL-F11	IL-33	Agonista (inflamatória)

Fonte: Modificado de Dinarello *et al.*, 2009. (73)

A IL-1 β é um importante mediador de respostas inflamatórias agudas, sendo que muitas de suas ações são semelhantes às do TNF- α . A IL-1 β aumenta a expressão de moléculas de adesão em células vasculares e em células endoteliais, além de induzir a produção de quimiocinas. O resultado é a infiltração de células inflamatórias no espaço extravascular e nos tecidos. (61)

A IL-1 β está envolvida em fenômenos comuns ao processo inflamatório, como febre, redução do limiar para dor, vasodilatação e hipotensão. Estes quadros são resultado da ação de substâncias como prostaglandina E2, fator de ativação de plaquetas e óxido nítrico, cuja produção é estimulada pela IL-1 β . (61) A IL-1 β é também um fator angiogênico, estando envolvida na formação de vasos sanguíneos. (73)

Outras ações da IL-1 β , também compartilhadas pelo TNF- α , são o estímulo da síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, a proliferação de fibroblastos, a indução de IL-6, a ativação de células T e B. A IL-1 β também age na medula óssea marrom estimulando

a diferenciação dos progenitores da série mielóide. (72) Além disso, assim como o TNF- α , a IL-1 β participa ativamente dos mecanismos relacionados à sepse, sepse grave e choque séptico. (71)

Os processos sépticos caracterizam-se pela rápida liberação de IL-1 β de macrófagos ativado, em um período de tempo semelhante ao requerido para a liberação de TNF- α (cerca de 30 minutos após o estímulo inicial). A IL-1 β apresenta ações semelhantes às do TNF- α . De fato, estas duas citocinas agem de maneira sinérgica, ativando macrófagos de maneira autócrina e parácrina. Essa ação leva à produção de outras citocinas pró-inflamatórias, mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio, amplificando a cascata da inflamação. O resultado final é o aumento da permeabilidade vascular, edema pulmonar grave, hemorragia e disfunção de múltiplos órgãos. (71)

A ação potente e extensa de IL-1 β exige que sua atividade biológica seja rigorosamente regulada. Esta citocina é expressa em baixos níveis sob condições normais; o processamento e secreção de IL-1 β são ações finamente controladas, e a perda dessa regulação resulta em síndromes caracterizadas por febre, erupções cutâneas e artrite, manifestações típicas das doenças autoinflamatórias. (61,74)

O termo doenças autoinflamatórias foi inicialmente proposto em 1999 para classificar um grupo de doenças herdadas caracterizadas por episódios recorrentes de febre associada a manifestações inflamatórias em vários órgãos, como articulações, pele, olhos, ouvidos e sistema nervoso central. (74) Apesar de praticamente todas as doenças imunes possuírem um componente inflamatório, estas doenças se distinguem por serem primariamente inflamatórias em sua natureza, sendo marcadas por sua periodicidade e forte associação com fatores desencadeantes exógenos. (73)

As doenças autoinflamatórias têm em comum o fato de estarem relacionadas a mutações específicas de proteínas que regulam a atividade de IL-1 β , resultando na excessiva produção dessa citocina. Assim, esse grupo de doenças é altamente responsivo ao bloqueio de IL-1 β , sendo esta propriedade utilizada na terapêutica clínica. Exemplos de doenças autoinflamatórias são: febre familiar do mediterrâneo, síndrome de Behçet, síndrome de Sweet, gota. Foi incluída nesse grupo a diabetes tipo 2, uma vez que

estudos recentes evidenciaram proteção das células β pancreáticas produtoras de insulina por meio do bloqueio de IL-1 β . (73,74)

Conclui-se que a IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória fundamental para a elaboração da resposta imune, sendo que a perda do controle de suas ações leva a alterações capazes de gerar doenças caracterizadas por grande morbidade e impacto clínico.

c) Interleucina - 6 (IL-6)

A IL-6 é uma importante citocina inflamatória, que apresenta efeitos locais e sistêmicos. (72) Sua identificação data da segunda metade da década de 1980, quando vários grupos científicos envolveram-se no reconhecimento de fatores aparentemente não relacionados; posteriormente concluiu-se que esses fatores correspondiam à mesma proteína. Como resultado, antes de ser denominada IL-6, esta citocina recebeu diversos nomes, cada um referindo-se a uma característica diferente da proteína: fator 2 estimulador de células B, fator de crescimento de plasmocitoma, fator de crescimento de hibridoma/plasmocitoma humano, entre outros. (75,76)

A clonagem de DNA complementar de IL-6 e estudos subsequentes confirmaram que esta molécula havia de fato sido estudada sob diferentes nomes. Assim, foi possível perceber que a IL-6 apresentava várias atividades biológicas, não limitadas à ação sobre as células B ou outros grupos celulares descritos. Estudo importante demonstrou que anticorpos anti-IL-6 bloqueavam a atividade de uma proteína derivada de monócitos denominada “fator estimulador de hepatócitos”, responsável pela elevação da produção de proteínas de fase aguda pelo fígado. Foi detectado que esta proteína era na realidade IL-6. Esta descoberta vinculou a IL-6 à regulação da resposta de fase aguda. (75,76)

A IL-6 é uma glicoproteína pequena (21 KDa), produzida por vários tipos celulares em resposta a uma grande variedade de estímulos. Células do sistema imune inato, como macrófagos, células dendríticas e mastócitos produzem IL-6; linfócitos B e, em menor escala linfócitos T CD4 também produzem esta citocina. Células endoteliais, fibroblastos, astrócitos, células do tecido muscular liso, células epiteliais e várias células

malignas também são capazes de secretar IL-6. (77) A produção de IL-6 é induzida por citocinas como IL-1 β e TNF- α , além de substâncias provenientes da parede celular de bactérias, como os LPS. (71)

O receptor de IL-6 (IL-6R) é composto por uma cadeia polipeptídica capaz de interagir com a citocina e uma subunidade capaz de transduzir sinal (denominada gp130). A expressão do IL-6R é restrita predominantemente a leucócitos e hepatócitos. A proteína transmembrana gp130, de maneira diferente, é expressa por diversas células, sendo também um componente da sinalização de receptores de outras citocinas. (59,77) Além do receptor IL-6R, presente na membrana celular, há o receptor solúvel de IL-6 (sIL-6R), cuja presença foi demonstrada tanto em humanos quanto em camundongos. Esse receptor se liga à IL-6 e a gp130 de maneira agonista; considerando-se a expressão ubíqua de gp130, conclui-se que a IL-6 pode interagir com vários tipos celulares. (75,77)

A IL-6 é uma citocina multifuncional, sendo capaz de induzir a diferenciação celular e a expressão de genes específicos. Esta citocina desempenha um importante papel nas fases iniciais de infecções e injúrias ao organismo, funcionando como sinalizador da presença de ameaças. (78)

Concentrações elevadas de IL-6 são observadas em muitas condições agudas, como queimaduras, grandes cirurgias e na sepse, sendo o pico desta citocina subsequente aos das citocinas IL-1 β e TNF- α . Geralmente os níveis plasmáticos de IL-6 permanecem elevados nestas condições e se correlacionam com vários indicadores de gravidade de doenças, como escores clínicos e taxa de mortalidade global. É interessante observar, entretanto, que, em contraste com IL-1 β e TNF- α , a injeção experimental isolada de IL-6 não produz um estado semelhante a sepse. (71)

A IL-6 é um importante mediador da resposta de fase aguda, agindo em três principais frentes: indução de febre, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda. (71,72) Assim como a IL-1 β e TNF- α , a IL-6 é um pirógeno endógeno, agindo no hipotálamo e levando ao aumento da temperatura corpórea. A IL-6 atua sobre a medula óssea marrom, ativando as células germinativas hematopoiéticas e estimulando a produção de

neutrófilos. (59) A IL-6 induz também a maturação dos megacariócitos, aumentando a produção de plaquetas. (78)

Considerando-se a produção de proteínas de fase aguda, a IL-6 induz a produção de elementos como proteína-C-reativa, componentes do complemento e fibrinogênio pelos hepatócitos, enquanto reduz a síntese de albumina, fibronectina, transferrina e citocromo P450 por essas mesmas células. (72,77) Estudos *in vivo* com camundongos *knockout* para IL-6 demonstraram que a deleção de genes codificadores desta citocina reduz a inflamação pulmonar em um modelo de injúria pulmonar aguda. (71)

A IL-6 também atua sobre os linfócitos, induzindo a diferenciação de linfócitos B em células produtoras de imunoglobulinas e estimulando a diferenciação de células TCD4+ virgens em células produtoras de IL-17 (subtipo de linfócitos T *helper* 17- Th17). Finalmente, a IL-6 também age sobre as células TCD8+ para induzir sua ação citotóxica. (78)

A IL-6 age sobre os fibroblastos sinoviais, induzindo a produção de fatores promotores da diferenciação de osteoclastos e da angiogênese. Além disso, a IL-6 estimula os fibroblastos dérmicos a produzir colágeno e promove o crescimento de células como as células do mieloma/plasmocitoma e células mesangiais. (78)

Outra função importante e que tem sido alvo de estudos recentes é a participação da IL-6 na regulação da transição da imunidade inata para a imunidade adquirida. Entre as atividades desta citocina que apontam para seu envolvimento nesta transição estão: o recrutamento, ativação e apoptose de leucócitos; participação na regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência dos linfócitos T, bem como na regulação da secreção de imunoglobulinas pelos linfócitos B. (79)

Devido às diversas e importantes ações da IL-6 sobre o processo inflamatório, vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de estabelecer tratamentos para doenças inflamatórias por meio do bloqueio das atividades desta citocina. Resultados expressivos foram obtidos para o tratamento da artrite reumatóide e da Doença de Crohn. (79) A expectativa atual é que estas terapias possam também ser úteis no

tratamento de doenças não consideradas como doenças inflamatórias convencionais, como a inflamação relacionada ao câncer e às alterações metabólicas. (77)

Finalmente, é importante destacar que a IL-6 também apresenta propriedades antiinflamatórias. Esta citocina é capaz de inibir a liberação de TNF- α e IL-1 e aumentar os níveis séricos de mediadores antiinflamatórios, como IL-10 e cortisol. Assim, pode proteger contra o desenvolvimento do choque séptico. O fator determinante da ação pro ou antiinflamatória da IL-6 ainda não foi esclarecido. (71,79)

d) Interleucina -12 (IL-12)

A IL-12 apresenta importantes funções no sistema imune inato, estando também envolvida com a resposta imune adaptativa.

Esta citocina foi identificada inicialmente em culturas de células infectadas pelo vírus Epstein-Barr (“*EBV-transformed cell lines*”). Foi reconhecida nessas culturas a presença de um fator que mediava várias atividades biológicas de células T humanas e células NK, incluindo a produção de IFN- γ . Esse fator foi denominado fator estimulador das células NK (NKSF) e, posteriormente, purificado; foi demonstrado que o NKSF possuía uma estrutura heterodimérica, diferente das outras citocinas descritas. Culturas de células semelhantes permitiram a identificação de um fator de maturação de linfócitos citotóxicos (CLMF), que foi purificado. A clonagem dos genes codificadores de CLMF demonstrou que este fator e NKSF eram a mesma citocina, sendo as duas denominações unificadas sob o termo IL-12. (80)

A interleucina-12 é uma proteína heterodímera composta de duas subunidades unidas por pontes dissulfeto. Estas subunidades são designadas como p35 e p40, baseando-se nos seus pesos moleculares aproximados. Curiosamente, as subunidades de IL-12 são codificadas por genes não relacionados, localizados em *loci* independentes no genoma humano. Considerando-se a estrutura da IL-12 e a existência de sequências homólogas, é possível que esta citocina tenha evoluído de uma citocina primordial similar à IL-6. (81) Foram descritas recentemente outras citocinas heterodiméricas com subunidades homólogas a uma ou ambas as cadeias de IL-12, como a IL-23, IL-27 e IL-35,

denotando que a IL-12 é na realidade o membro protótipo de uma pequena família de citocinas compostas por heterodímeros. (82)

A IL-12 é produzida principalmente por células dendríticas e macrófagos ativados em resposta a vários estímulos microbianos, como LPS, ácido lipoteicoico (substâncias provenientes da parede celular de bactérias) e vírus. (59,80)

O receptor de IL-12 é composto por duas subunidades, $\beta 1$ e $\beta 2$. Essas duas cadeias são necessárias para que a IL-12 se ligue com alta afinidade ao receptor. A expressão da subunidade $\beta 2$ é aumentada pelo IFN- γ , cuja produção é estimulada pela própria IL-12, representando um exemplo da alça de amplificação positiva do sistema imune. (59,81)

A IL-12 é uma importante citocina proinflamatória. Ela estimula a produção de diversas citocinas pelas células T e pelas células NK, sendo particularmente eficiente em induzir a produção de IFN- γ . São necessárias apenas baixas concentrações de IL-12 para a produção de IFN- γ . (82) O IFN- γ produzido por células NK ou por linfócitos T também estimula a produção de IL-12, gerando assim uma alça de alimentação positiva. (59)

O IFN- γ apresenta várias atividades importantes para a resposta imune. Esta citocina atua sobre os macrófagos, aumentando as funções microbidas destas células; age também sobre várias células, aumentando a expressão de moléculas MHC de classe I e classe II, resultando em aumento do processamento de antígeno e apresentação a células T. Além disso, atua sobre as células T, estimulando a sua diferenciação no subtipo linfócito T *helper* 1 (Th1). (57,59)

A IL-12 apresenta ações importantes sobre os linfócitos. Considerando-se os linfócitos T, esta citocina age sinergicamente com receptores de superfície dessas células para facilitar sua proliferação após a apresentação de antígenos, por exemplo, por células dendríticas. A IL-12 também estimula a geração de linfócitos T citotóxicos. Além disso, aumenta a citotoxicidade destas células e também das células NK por meio do aumento da expressão de moléculas de adesão e da indução da produção de proteínas mediadoras da morte de células-alvo. (82)

A IL-12 pode afetar de maneira direta a proliferação de linfócitos B, sua diferenciação e a produção de IFN- γ por estas células; entretanto, os efeitos da IL-12 sobre a ativação dos linfócitos T e sobre a produção de um isotipo particular de imunoglobulina são indiretos e baseiam-se na ação da IL-12 sobre as células Th1. (82)

A IL-12 promove a diferenciação dos linfócitos TCD4 + em linfócitos Th1. Esse subtipo de linfócitos apresenta propriedades importantes para a defesa contra os microorganismos intracelulares. Acredita-se que, durante a resposta de fase aguda, a IL-12 induz as células T e as células NK a produzir IFN- γ . Sequencialmente, a IL-12, em cooperação com o IFN- γ induz as células T que estão se proliferando em resposta a antígenos específicos a se diferenciarem em linfócitos Th1. Assim, percebe-se que a IL-12 é um instrumento por meio do qual a imunidade inata influencia as respostas imunológicas adaptativas. (80,82)

Foi evidenciado que a IL-12 está envolvida com a patogenia de várias doenças autoimunes, como artrite reumatóide, além de participar da promoção e manutenção da inflamação na doença aterosclerótica e nas lesões psoriáticas. Esses dados colocam a IL-12 e os mecanismos regulatórios de sua produção como possíveis alvos para o tratamento de diversas doenças; de fato, terapias anti-IL-12 vem sendo desenvolvidas e testadas. Estudos adicionais são necessários, entretanto, considerando-se as ações biológicas complexas da IL-12 e dos outros membros desta família de citocinas. (82,83)

e) Interleucina-8 (IL-8)

A IL-8 é uma citocina pertencente à família das quimiocinas. As quimiocinas constituem uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, envolvidas com a estimulação do movimento dos leucócitos e regulação da migração destas células para os tecidos. (58,84)

As quimiocinas são constituídas por polipeptídeos, sendo sua estrutura caracterizada pela existência de quatro cisteínas, resultando em duas alças de dissulfeto internas. As quimiocinas são classificadas em quatro subfamílias, com base no número e na

localização destes resíduos de cisteína. As duas subfamílias principais são as quimiocinas CC (também denominadas β), em que os resíduos de cisteína são adjacentes, e a família CXC (ou α), cujos resíduos estão separados por um aminoácido. Os membros destas subfamílias diferem com relação à sua seletividade sobre as células-alvo: embora haja exceções, as quimiocinas CC agem principalmente sobre os monócitos e linfócitos, enquanto as quimiocinas CXC em sua maior parte medeiam o recrutamento dos neutrófilos. (58,85)

A nomenclatura das quimiocinas foi recentemente atualizada, sendo atualmente baseada, em parte, nos receptores aos quais as quimiocinas se ligam. Considerando este novo sistema, a IL-8 seria denominada CXCL8. A sigla “CXC” demonstra que esta citocina pertence à subfamília de quimiocinas CXC. A letra “L” indica que esta citocina é um ligante (e não um receptor), enquanto o “8” indica, obviamente, sua numeração. (85)

A IL-8 está entre as quimiocinas mais estudadas, sendo o protótipo da subfamília CXC.(86) Esta citocina foi identificada originalmente em culturas de monócitos séricos humanos. Suas antigas denominações estão vinculadas à descoberta de suas funções: “fator quimiotático para neutrófilos derivado de monócitos”, “peptídeo ativador de neutrófilos”. (84,85)

Vários tipos celulares podem produzir IL-8; virtualmente todas as células nucleadas do corpo humano podem secretar esta citocina. As principais fontes celulares, entretanto, são os monócitos e os macrófagos. Outros exemplos de células que podem produzir IL-8 são: células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, células sinoviais, condrócitos. (59,84,85)

A produção de IL-8 pode ser induzida por vários estímulos, incluindo LPS, bactérias e outros microorganismos. Citocinas pró-inflamatórias precoces, como a IL-1 e a TNF, também induzem a produção desta quimiocina. Até mesmo alterações na pressão parcial de oxigênio podem acionar a produção de IL-8. (84,85)

Os receptores de quimiocinas expressos nos neutrófilos e nos monócitos são diferentes. Esse fato provavelmente constitui o determinante principal do comportamento

migratório de cada tipo de célula. Os neutrófilos expressam os receptores CXCR1 e CXCR2, que se ligam à IL-8 e a outras quimiocinas. A IL-8 é a principal quimiocina que sustenta a migração dos neutrófilos para os tecidos. (58)

A IL-8 destaca-se como importante mediador nos processos inflamatórios. Essa citocina é produzida precocemente e de maneira abundante pelos macrófagos residentes teciduais, sendo fundamental para o recrutamento inicial dos neutrófilos. (58) Esse recrutamento ocorre por meio do desenvolvimento de um gradiente quimiotático, fazendo com que a célula inflamatória se direcione para a área de maior concentração da quimiocina. O gradiente quimiotático não só auxilia a movimentação dos neutrófilos para o local da inflamação, mas também retém essas células após sua chegada. (85)

A IL-8 também está envolvida com a ativação dos neutrófilos, além de sua migração. Ela age sobre essas células induzindo a expressão de moléculas de adesão, a formação de lipídios bioativos, a produção de espécies reativas de oxigênio e a liberação de enzimas lisossômicas. (84,86)

Outras propriedades de IL-8 também contribuem para situá-la como importante citocina para a inflamação e defesa do hospedeiro. Conforme mencionado, a IL-8 é secretada por diversos tipos celulares, podendo assim ser produzida em potencialmente qualquer tecido. Além disso, vários estímulos, inclusive não infecciosos, são capazes de levar à produção de IL-8, como isquemia, trauma e outros distúrbios da homeostase tecidual. Finalmente, a IL-8 apresenta características especiais: ela é produzida precocemente no curso da resposta inflamatória, mas persiste por um longo período de tempo, mesmo por dias e semanas, enquanto a maior parte das citocinas inflamatórias é degradada em questão de horas. A durabilidade de IL-8 se deve à resistência desta citocina à temperatura, proteólise e a ambientes ácidos. Esta longevidade permite que a IL-8 permaneça em ação e continue recrutando células inflamatórias para combater as infecções. (84,85)

As concentrações de IL-8 estão significativamente aumentadas nos fluidos corporais nas inflamações agudas mediadas por neutrófilos. Há muitos exemplos de doenças humanas em que foram observados níveis séricos elevados de IL-8. Vários estudos mostraram que pacientes que progrediram para síndrome da injúria pulmonar aguda apresentavam

altos níveis de IL-8 no lavado broncoalveolar. Outros estudos mostraram associação entre níveis elevados de IL-8 e desenvolvimento de pneumonia associada à ventilação mecânica. (85,86)

Elevação de IL-8 foi também detectada no líquido de pacientes com meningite, no escarro de pacientes asmáticos e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide. (85,87) Além disso, a IL-8 foi também implicada em muitos dos processos patológicos envolvendo a progressão de neoplasias, como câncer de próstata e câncer colorretal. (88) Estes achados colocam a IL-8 como possível alvo para a intervenção terapêutica em diversas situações; esta perspectiva vem sendo focalizada por diversos estudos. (86,88)

f) Interleucina-10 (IL-10)

As respostas inflamatórias são extremamente importantes para a proteção contra microorganismos, porém, são potencialmente causadoras de lesão tecidual e doenças. Diversos mecanismos regulam a magnitude e a duração da resposta imune inata, limitando a possibilidade de ocorrência de danos teciduais. Destacam-se, dentre esses mecanismos, as ações desempenhadas pela IL-10. (59)

A IL-10 foi identificada inicialmente em 1989; ela foi descoberta por meio da análise de um fator presente em clones de células Th2 que inibia as respostas do subtipo de linfócitos Th1. Essa substância foi denominada “fator inibidor da síntese de citocinas”. Posteriormente, o DNA complementar do “fator inibidor da síntese de citocinas” de humanos e camundongos foi clonado, sendo esta citocina renomeada como IL-10. (89,90)

A IL-10 é o primeiro membro descrito de uma família de citocinas heterodiméricas constituída por vários membros, como IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-27. Esses membros apresentam diferentes funções biológicas, sendo que a IL-10 destaca-se por sua ação supressora sobre respostas inflamatórias excessivas. O receptor de IL-10 é

formado por duas cadeias, sendo ambas importantes para a estimulação celular por IL-10. (91)

Logo após a descoberta de IL-10, foi evidenciado que essa citocina é produzida por vários tipos celulares além dos linfócitos Th2, incluindo células do sistema imune inato e da resposta imune adaptativa. Exemplos de células produtoras são: células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células NK, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD8+, linfócitos T reguladores e linfócitos B. A IL-10 também pode ser produzida por alguns tipos de células não imunes, como os queratinócitos, células epiteliais e mesmo células tumorais. (89,91,92)

Quando comparada à secreção de outras citocinas, a produção de IL-10 é relativamente tardia após a ativação de linfócitos T ou monócitos, o que parece ser importante para o papel regulador dessa citocina. (89) A importância relativa da produção de IL-10 por cada tipo celular pode variar com o tipo, intensidade e localização do estímulo inflamatório, sendo os macrófagos geralmente grandes produtores. (92)

As ações anti-inflamatórias da IL-10 foram bem documentadas por vários estudos experimentais *in vivo*. A administração de proteína recombinante IL-10 em camundongos foi capaz de protegê-los contra endotoxemia letal após injeção de LPS. A expressão aumentada dessa citocina em camundongos transgênicos aumenta a sobrevivência desses animais durante síndromes de choque tóxico e inibe a imunopatologia observada durante a infecção por uma grande variedade de patógenos. De fato, foi observado que o vírus Epstein-Barr (EBV) expressa uma proteína homóloga à IL-10, com atividades imunomodulatórias semelhantes. Essa proteína fornece ao vírus a habilidade de inibir a imunidade do hospedeiro; existe a possibilidade de que o EBV tenha adquirido um gene similar à IL-10 durante sua evolução. (71,90)

A IL-10 inibe respostas inflamatórias tanto da resposta imune inata quanto da resposta adaptativa, sendo, portanto, uma citocina central para a resolução da inflamação. Essa ação previne lesões teciduais advindas de respostas inflamatórias excessivas. (89,91)

Os principais efeitos biológicos de IL-10 parecem ser exercidos sobre os macrófagos e células dendríticas. A IL-10 inibe a expressão de moléculas do MHC de classe II e de

coestimuladores por estas células imunes, resultando em uma inibição potente da apresentação de antígenos. Também é consequência dessa ação, a redução da ativação de células T e o encerramento de reações imunológicas mediadas por células. (92,93) Além disso, a IL-10 é capaz de inibir a diferenciação de monócitos precursores em células dendríticas e macrófagos, reduzindo também a maturação destas células e permitindo assim um mecanismo de auto-regulação destas populações celulares. (91,92)

Outra ação importante da IL-10 é a inibição da produção de várias citocinas e mediadores inflamatórios pelos macrófagos e células dendríticas, dentre eles IL-1, IL-6, IL-12, TNF e muitas quimiocinas. A IL-10 pode também exercer sua ação inibitória por meio do estímulo da liberação de mediadores anti-inflamatórios, como o antagonista do receptor de IL-1, produzido por macrófagos. (89)

A inibição da produção de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos implica em atividades imunoregulatórias da IL-10 sobre as respostas Th1 e Th2. A IL-10 inibe a produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos ativados. Como a IL-12 é um estímulo crítico para a secreção de IFN- γ , que participa de reações imunológicas direcionadas contra microorganismos intracelulares, a IL-10 atua suprimindo estas reações. A IL-10 também reduz a produção de IL-4 e IL-5, inibindo as ações do subtipo de linfócito Th2, responsável pela defesa contra helmintos. (57,92)

É importante destacar que os próprios subtipos celulares Th1 e Th2 produzem IL-10; nesse contexto, essa citocina funciona como regulador de *feedback* negativo. Conforme previamente mencionado, as células Th1 apresentam papel fundamental na resposta imune contra patógenos intracelulares. Estudos experimentais realizados com camundongos deficientes em IL-10 infectados por *Toxoplasma gondii* mostraram que a ausência da ação controladora de IL-10 resulta em exacerbação da resposta Th1, sendo que a imunopatologia gerada é letal para os animais, mesmo com a obtenção da restrição do crescimento do parasita. (90,94)

A supressão da ação da IL-10 no contexto das respostas contra infecções por helmintos, lideradas pelo subtipo celular Th2, também pode gerar doenças. (90,94) As citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, secretadas pelos linfócitos Th2, se não controladas, podem iniciar, amplificar e prolongar respostas alérgicas por meio do aumento da produção da

imunoglobulina E (IgE), além de acionar o recrutamento, expansão e diferenciação de eosinófilos e mastócitos. (94)

O subtipo de linfócitos Th17 promove a inflamação e media a defesa contra fungos e bactérias extracelulares. Muitos grupos de pesquisadores mostraram recentemente que os linfócitos Th17 também produzem IL-10, representando uma importante fonte desta citocina durante doenças infecciosas. Estudos recentes demonstraram que a IL-10 produzida pelas células Th-17 pode refinar as respostas mediadas por esse subtipo de linfócito, direcionando-as para patógenos específicos. Esses estudos também revelaram que a inibição da secreção de IL-10 por essas células ocasiona condições patológicas auto-inflamatórias, denotando mais uma vez a importância dessa citocina para a imunoregulação. (91,92,94)

A IL-10 está também envolvida com mecanismos regulatórios implicados na tolerância a antígenos-próprios (“*self-antigens*”) e a antígenos não-próprios. Camundongos *knockout* com ausência de IL-10 desenvolvem colite, provavelmente secundária à ação descontrolada de macrófagos ativados que reagem contra microorganismos entéricos. (91,94)

É importante notar que a IL-10 pode também exercer ações positivas sobre o sistema imune, e não apenas ações supressoras. As atividades estimulatórias de IL-10 parecem ser dose-dependente. A IL-10 pode contribuir para a estimulação das células B, além de participar da ativação desta célula e prolongar sua sobrevivência. A IL-10 também é capaz de coestimular a proliferação das células NK e a produção de citocinas, além de estimular a proliferação de alguns subtipos de linfócitos CD8+. (92)

Conforme evidenciado, a IL-10 exerce atividades reguladoras de extrema importância para o desenvolvimento de uma resposta imunológica adequada. As ações dessa citocina limitam respostas excessivas e previnem a autoimunidade. Assim, a manipulação da IL-10 com objetivos terapêuticos mostrou-se promissora, sendo objeto de análise de diversos estudos. Trata-se de proposta desafiadora, considerando-se a natureza pleiotrópica desta citocina. O bloqueio da IL-10 leva ao risco da autoimunidade, enquanto a excessiva indução da expressão dessa citocina pode conduzir à imunossupressão. (91,94)

2.3 Endocardite infecciosa e citocinas

2.3.1 Citocinas envolvidas com a resposta inflamatória e fisiopatologia da endocardite infecciosa

A EI permanece como doença caracterizada por alta mortalidade, apesar dos avanços obtidos nos cuidados à saúde. A incidência da EI também não diminuiu, em virtude principalmente da mudança progressiva dos fatores de risco, ampliando a população susceptível ao desenvolvimento da doença. (2)

Esse panorama coloca a EI como objeto constante de estudo pela comunidade científica, na tentativa de melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia da doença. O papel das citocinas e da inflamação no contexto da EI têm sido recentemente estudados, e os resultados dessas pesquisas forneceram subsídios para o entendimento das consequências do encontro entre o microorganismo circulante e o endotélio valvar. (95)

Estudo *in vitro* publicado na década de 90 evidenciou pela primeira vez, o aumento da produção de TNF- α e IL-1 β por monócitos provenientes de pacientes com endocardite por *C.burnetti*. Esse estudo também revelou a correlação entre essas citocinas e a atividade da doença: a liberação de TNF- α e IL-1 β foi significativamente maior em monócitos de pacientes com diagnóstico de EI há menos de seis meses, quando comparada à liberação observada em pacientes com endocardite estabelecida há mais de um ano. (95,96)

Alguns anos após, outros estudos evidenciaram associação entre infecção por estreptococos, importantes agentes causadores de EI, e níveis aumentados de citocinas. Ainda na década de 90, um estudo envolvendo experimentos *in vivo* e *in vitro* evidenciou que, quando injetado em camundongos, o *S.mutans* induz formação de um infiltrado inflamatório denso, correspondente ao perfil de citocinas induzido por meio da estimulação *in vitro* de células humanas mononucleares pelo mesmo patógeno. O *S.mutans* mostrou-se capaz de promover resposta imune do tipo Th1 por meio da

estimulação da expressão de IL-12, INF- γ e TNF- α . Os pesquisadores concluíram que a produção exuberante de citocinas estimulada por *S.mutans* poderia contribuir para o processo patológico da infecção, pois estes mediadores teriam capacidade de aumentar a expressão de quimiocinas e o recrutamento de células inflamatórias. (97)

A endocardite por *S.mutans* foi objeto de outro estudo que também utilizou experimentos *in vitro* e *in vivo*. Ambos constataram aumento da produção de IL-6 na infecção por esse patógeno, induzida por glucosiltransferases, uma família de enzimas encontradas em várias (porém não todas) as espécies de *S.viridans*. (98) Curiosamente, estudo clínico realizado poucos anos antes, evidenciou níveis séricos elevados de IL-6 em pacientes com EI durante a fase aguda da infecção. Esses pacientes apresentavam EI causada por espécies de *S. viridans* que expressavam glucosiltransferases. (99)

A produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α foi observada após a exposição *in vitro* de monócitos humanos a material proveniente de placas de cultura de *S.sanguis* (100) Recentemente, outros estudos *in vitro* confirmaram o aumento da expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão na EI causada por espécies de *S.viridans*, relacionando a produção desses mediadores a processos inflamatórios e à formação da vegetação. (101,102)

A infecção por *S.galloyticus galloyticus*, previamente conhecido como *S.bovis* biotipo I, também foi relacionada ao aumento da produção de citocinas na endocardite. Este patógeno oportunista ganhou importância na prática clínica após a descoberta de sua relação com doenças malignas colônicas. Experimento *in vitro* revelou que a infecção por *S.galloyticus galloyticus* ativa células epiteliais e endoteliais humanas para a secreção de IL-8, além de induzir a produção de TNF- α por monócitos humanos. A habilidade desse patógeno em estimular a produção de citocinas parece contribuir para sua patogenicidade. (103)

Modelos experimentais de EI utilizando animais apresentam importância histórica na construção do conhecimento sobre a etiopatogenia da EI, assim como os estudos *in vitro*. Estudo publicado em 1984, no qual foram utilizados coelhos com endocardite causada experimentalmente por *E.faecalis*, demonstrou que a ativação da coagulação, que em última análise leva à formação da vegetação, ocorre por meio do aumento da

expressão do fator tecidual por monócitos e outras células locais em valvas infectadas. O fator tecidual, uma glicoproteína transmembrana, é o mais importante fator envolvido no início da via extrínseca da coagulação. (104)

Esses conhecimentos foram complementados por estudo *in vitro* realizado posteriormente, que mostrou a expressão de altos níveis de fator tecidual em monócitos aderentes a matriz de fibrina infectada por *S.sanguis* (reprodução da superfície da vegetação que ocorre *in vivo*). Esse achado foi acompanhado do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e da citocina reguladora IL-10, envolvidas com a produção de FT pelos monócitos. (105)

Estudos envolvendo modelos animais também têm sido importantes para a elucidação dos mecanismos relacionados à patogenia do principal microorganismo causador de EI na atualidade: *S.aureus*. Estudo recente, no qual foi utilizado um modelo murino de bacteriemia por *S.aureus*, demonstrando que animais infectados por cepas que expressavam proteína de adesão extracelular apresentavam importante perda de peso, revelando maior gravidade da infecção. A proteína de adesão extracelular apresenta atividades pró-inflamatórias, dentre elas o estímulo à liberação de TNF- α . Por sua vez, TNF- α aumenta a expressão de vários receptores na superfície das células endoteliais, facilitando a adesão do *S.aureus* e, conseqüentemente, a infecção por este patógeno. (106)

O papel patogênico de *S.aureus* foi alvo de outro estudo atual, e, novamente, a ação das citocinas envolvidas com a resposta inflamatória foi implicada. Cepas de *Lactococcus lactis* recombinantes, expressando proteínas de superfície de *S.aureus*, foram inoculadas em ratos, de maneira contínua e em pequenas quantidades. Tal forma de inoculação procurou reproduzir a bacteriemia transitória e de baixo grau que provavelmente ocasiona a EI por *S.aureus* em seres humanos. Foi demonstrado que a propriedade de adesão ao fibrinogênio e à fibronectina foi fator determinante da patogenicidade da cepa infectante. Essa pesquisa evidenciou também que adesão ao fibrinogênio e à fibronectina favorece a produção de IL-1 e IL-6, demonstrando a participação dessas citocinas na resposta inflamatória na endocardite por *S.aureus*. (13)

Finalmente, em estudo recente, utilizou-se análise imuno-histoquímica para avaliar a expressão local de IL-1 β e IL-8 em tecido cardíaco de porcos. Foram produzidos experimentalmente modelos de endocardite trombótica não-bacteriana, EI por *S. aureus* e sepse por *S. aureus* sem endocardite; esses modelos foram comparados a controles. Foi observado que porcos com EI apresentavam expressão local moderada a alta de IL-1 β e expressão alta de IL-8. A IL-1 β é uma importante citocina da resposta de fase aguda, apresentando atividades pró-coagulantes e promotoras da inflamação. A IL-8 é uma citocina quimioatraente para neutrófilos, participando também da ativação destas células. Além disso, foi também constatada a expressão leve de IL-1 β e IL-8 em porcos com trombo endocárdico estéril, indicando que danos mecânicos ao endocárdio são suficientes para induzir a expressão local de citocinas. Estes resultados colocam as citocinas IL-1 β e IL-8 como importantes contribuintes para a patogênese da EI. (107)

Conclui-se, conforme evidenciado por diversos estudos, que as citocinas envolvidas com a resposta inflamatória apresentam papel fundamental na etiopatogenia da EI, contribuindo não apenas para a defesa imune, mas participando de processos como a formação da vegetação e mesmo o surgimento de lesões valvares. Estudos adicionais são necessários, entretanto, para esclarecer os complexos mecanismos envolvendo as citocinas e a patogênese da EI.

2.3.2 Citocinas como ferramentas para diagnóstico e prognóstico da EI e como marcadoras da atividade da doença

O envolvimento das citocinas na patogênese da EI e a íntima relação desses mediadores com a atividade inflamatória levaram naturalmente à investigação do potencial das citocinas como marcadores da atividade da doença. O papel das citocinas envolvidas com a resposta inflamatória no diagnóstico e avaliação do prognóstico da EI tem sido alvo de pesquisas pela comunidade científica, embora ainda não haja grande número de estudos explorando este tema.

A busca de ferramentas auxiliares para o diagnóstico de EI torna-se particularmente atraente diante do desafio frequente do reconhecimento da doença em tempo hábil.

Apesar do avanço dos métodos diagnósticos, o perfil clínico dos pacientes tem sofrido alterações nas últimas décadas. Além disso, a porcentagem de pacientes com EI e hemoculturas negativas tem crescido; uma das razões apontadas para este fato seria o uso crescente de antibióticos de largo espectro. (108)

Conforme mencionado previamente, a EI permanece como doença caracterizada por altos índices de mortalidade. Assim, a procura por potenciais marcadores de prognóstico, que permitissem o monitoramento da evolução da doença e da resposta ao tratamento, também assume especial relevância nesse contexto.

Um dos primeiros estudos investigando o perfil de citocinas na EI foi publicado no início da década de 90. Esse estudo avaliou os níveis séricos de TNF- α , IL-6 e receptores solúveis de TNF em 10 pacientes com EI causada por estreptococos e enterococos. As amostras de sangue foram colhidas até 36 h da admissão, dois a três dias após e, então, semanalmente até a alta hospitalar ou óbito. A idade média dos pacientes do estudo foi 60 anos, já refletindo a tendência epidemiológica do aumento da faixa etária dos pacientes acometidos por EI. Apenas um dos pacientes apresentava EI de valva protética e três pacientes apresentavam ou desenvolveram complicações precoces da doença, como insuficiência cardíaca aguda. Níveis séricos de TNF- α , IL-6 e receptores solúveis de TNF foram também dosados em dois grupos controle: o primeiro constituído por 17 pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* e o segundo formado por 12 voluntários saudáveis. (109)

Os resultados daquele estudo foram bastante interessantes: os níveis de TNF- α foram surpreendentemente baixos nos pacientes com EI à admissão, exceto nos três pacientes que apresentavam complicações precoces. As concentrações de TNF- α permaneceram baixas ao longo do tempo, exceto em um paciente que desenvolveu abscesso esplênico. Os valores de TNF- α não se correlacionaram com dados clínicos (como duração dos sintomas antes do diagnóstico) ou laboratoriais (como contagem global de leucócitos, nível de IL-6) avaliados, tampouco com o tamanho da vegetação. Os níveis séricos de IL-6 mostraram-se levemente elevados nos pacientes com EI à admissão em relação aos controles saudáveis, sem, contudo, haver uma tendência clara à normalização durante o período de observação. Os valores de receptores solúveis de TNF foram

significativamente elevados nos pacientes com EI quando comparados aos valores dos controles saudáveis. (109)

Quando os pacientes com malária foram utilizados como grupo controle, foram constatados altos níveis de TNF- α em relação aos pacientes com EI, enquanto os níveis de receptores solúveis de TNF foram apenas levemente mais elevados. Além disso, a razão entre os níveis de receptores solúveis de TNF e níveis de TNF- α à admissão foi significativamente maior em pacientes com EI. (109)

Diante desses resultados, os autores esclarecem que os receptores solúveis de TNF podem funcionalmente inativar o TNF- α circulante. A malária por *P.falciparum* é doença aguda, caracterizada pela produção acentuada de TNF- α ; o excesso dessa citocina pode não ser contrabalanceado pelos receptores solúveis a tempo de abolir as consequências tóxicas de TNF- α . Já os casos de EI incluídos no estudo apresentavam em sua maioria lenta evolução, o que permitiria, conforme explicam os autores, a regulação da ação de TNF- α pelos receptores solúveis. Assim, segundo o estudo, a razão entre os níveis de receptores solúveis de TNF e níveis de TNF- α poderia ser um indicador da gravidade da doença e talvez de sua natureza aguda ou crônica. (109)

Estudos abordando a febre Q forneceram informações importantes para o conhecimento das ações das citocinas no contexto da EI. A febre Q é uma zoonose causada pelo patógeno intracelular obrigatório *C.burnetti*, podendo apresentar-se como doença aguda ou crônica. A endocardite é a forma mais grave e usual de febre Q crônica, sendo seu diagnóstico difícil devido à rara presença de vegetações e à negatividade das hemoculturas. (96)

Conforme mencionado previamente, em estudo *in vitro* publicado na década de 90 descreveu-se pela primeira vez, aumento da produção de TNF- α e IL-1 β por monócitos provenientes de pacientes com endocardite por *C.burnetti*. Foi também evidenciada por este estudo correlação entre essas citocinas e a atividade da doença. Monócitos provenientes de pacientes com diagnóstico de EI há menos de seis meses apresentavam liberação de TNF- α e IL-1 β significativamente maiores do que aquela observada em monócitos advindos de pacientes com endocardite estabelecida há mais de um ano. (96)

Em outro estudo, realizado alguns anos depois, foram dosadas as citocinas TNF e IL-6 em amostras de sangue de 23 pacientes com endocardite por *C.burnetti*, 13 pacientes com febre Q aguda e 10 controles saudáveis. Foi evidenciada elevação estatisticamente significativa de TNF e IL-6 tanto na febre Q aguda quanto na endocardite em relação aos controles saudáveis. (110)

A citocina IL-10, caracterizada por propriedades reguladoras da atividade inflamatória, foi também pesquisada no contexto da endocardite por *C.burnetti*. O desenvolvimento da febre Q crônica está usualmente associado a situações clínicas envolvendo maior produção de citocinas supressoras da resposta imune, como na imunodeficiência pelo vírus HIV. (111)

Estudo realizado em 1996 demonstrou aumento da produção de IL-10 por células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) provenientes de 25 pacientes com endocardite por *C.burnetti*, quando comparada à produção de IL-10 por PBMC de controles saudáveis. Além disso, este estudo mostrou que os níveis de IL-10 permaneceram elevados em pacientes propensos a relapsos da doença, enquanto os níveis de anticorpos específicos declinaram. Os autores concluíram que a IL-10 poderia ser um parâmetro preditivo da evolução, mais sensível que os anticorpos. (111)

Mais recentemente, em 2007, outro estudo confirmou aumento da produção de IL-10 e também de TNF na EI por *C.burnetti*, demonstrando que a elevação dessas citocinas está associada com risco de desenvolvimento de febre Q crônica em pacientes com valvulopatia. Nesse estudo, porém, o TNF mostrou-se um melhor marcador da evolução crônica da doença do que a IL-10. Os autores acreditam que a IL-10 seja um melhor marcador da evolução da febre Q quando as lesões valvares já estão estabelecidas, enquanto o TNF reflete a evolução da doença quando as lesões estão se desenvolvendo. (112)

Uma maneira alternativa de pesquisar associação entre citocinas e EI seria a identificação desses mediadores em tecidos valvares infectados. Em estudo publicado em 2002, utilizou-se este princípio. Nesse estudo, a presença de IL-8 e TNF- α foi avaliada por meio de análise imuno-histoquímica de tecido proveniente de válvulas de seis pacientes com EI submetidos a cirurgia valvar na fase ativa da infecção. A idade

média dos pacientes foi 63 anos e os germes causadores predominantes foram estafilococos. Foi observado que as células positivas para IL-8 eram mais numerosas em pacientes com menor tempo de terapia antibiótica antes da cirurgia; o tecido valvar desses pacientes também apresentava sinais importantes de inflamação aguda, presença de bactérias e poucos sinais de resolução da infecção. A quantidade de TNF- α foi semelhante entre as células de pacientes com doença aguda e subaguda, resultado que os autores consideraram difícil de explicar. (113)

Aquele estudo, embora pequeno e incluindo pacientes mais graves, evidenciou presença de células positivas para IL-8 e TNF- α no interior da vegetação durante a fase ativa da EI. Além disso, a presença de células positivas para IL-8 no tecido valvar correlacionou-se com infecções mais ativas. Embora estudos maiores e controlados sejam necessários, esse resultado sugere que a presença de células positivas para IL-8 no tecido valvar poderia ser um marcador da agressividade da doença e auxiliar na determinação da duração da terapia antimicrobiana pós-operatória, ponto ainda nem sempre consensual no tratamento da EI. (113)

A partir de 2000, outros estudos envolvendo a dosagem sérica de citocinas somaram-se aos já existentes reforçando o possível papel destes mediadores como auxiliares para diagnóstico e definição do prognóstico da EI. Em estudo publicado no início daquela década, investigou-se os níveis séricos de IL-1 α , IL-6 e TNF- α em 40 pacientes com valvulopatia reumática e EI. As dosagens foram realizadas em três ocasiões durante o tratamento antimicrobiano, com intervalos de sete dias. Foram também dosadas as mesmas citocinas em dois grupos controle, sendo que o primeiro incluiu 15 pacientes com valvulopatia reumática sem EI e o segundo foi constituído por 15 pacientes com infecção ativa do trato urinário (ITU). (99)

As dosagens de IL-1 α e TNF- α não se mostraram elevadas nos casos ou nos controles. Entretanto, houve elevação dos níveis séricos de IL-6 em todas as dosagens sequenciais nos pacientes com EI, com tendência de redução ao longo do tratamento. A elevação de IL-6 não foi observada nos controles não infectados, enquanto que nos pacientes com ITU foi constatada elevação leve, porém sem significância estatística, da IL-6. Diante desses resultados, os autores apontam os níveis séricos de IL-6 como possíveis

ferramentas para o diagnóstico e monitoramento do tratamento da EI, principalmente nos casos em que as hemoculturas são negativas. (99)

O valor da dosagem sérica de IL-6 como contribuinte para o diagnóstico de EI foi também explorado por estudo publicado em 2002. Esse estudo incluiu 47 pacientes com EI de valvas nativas aórtica, mitral ou tricúspide, sendo a disfunção valvar pré-existente o principal fator predisponente. Assim como no estudo previamente mencionado, os patógenos causadores mais prevalentes foram estafilococos. Esses pacientes foram submetidos a coletas de amostras de sangue para dosagem de IL-6, receptores solúveis de IL-2 (IL-2R), valor global de leucócitos e proteína-C-reativa. As coletas foram realizadas à admissão e após um, três e quatro semanas de tratamento. (114)

Os pacientes foram estratificados em dois grupos conforme o resultado das hemoculturas: positiva ou negativa. Foram isolados microorganismos em 20 pacientes (43%), porém sem diferença entre a idade média ou acometimento valvar entre os dois grupos. Foram constatadas concentrações séricas elevadas de IL-6 e IL-2R nos pacientes com EI à admissão e nas dosagens sequenciais, independentemente da positividade ou não das hemoculturas. Em contraste, os valores de leucócitos totais e proteína-C-reativa estavam maiores nos pacientes com hemoculturas positivas em relação aos pacientes com hemoculturas negativas. Merece também destaque o fato de que as concentrações de IL-6 e IL-2R reduziram-se continuamente ao longo do tratamento, achado não observado nas dosagens de leucócitos totais e proteína-C-reativa. (114)

Considerando-se estes resultados, os autores sugerem que a elevação de IL-6 e IL-2R no curso da terapia para EI poderia sinalizar a necessidade de modificação da estratégia antimicrobiana. Ressaltam também a importância da dosagem sérica de IL-6 como elemento diagnóstico e com valor preditivo da evolução na EI. (114)

Em outro estudo relevante, publicado em 2007, foram determinadas as dosagens séricas de IL-1 β , IL-6, TNF- α , procalcitonina, proteína ligante de lipopolissacarídeos e proteína-C-reativa em 63 pacientes com EI definitiva segundo os critérios de Duke. As amostras de sangue foram colhidas em até dois dias após o estabelecimento do diagnóstico. A maior parte dos casos de EI foi causada por estafilococos, confirmando a

maior prevalência destes patógenos como agentes etiológicos da doença. Foram também colhidas amostras de sangue de 71 controles sem infecção, sendo que em 44 delas foi realizada dosagem de IL-1 β , IL-6, TNF- α . (115)

Após as análises, observou-se que, entre as citocinas dosadas, a IL-6 apresentou os maiores valores em relação aos controles, além da maior significância estatística ($p < 0,0001$). Não foi constatada relação entre os níveis de IL-6 e proteína-C-reativa, microorganismo causador, achados ecocardiográficos ou desfechos. Os níveis de proteína-C-reativa mostraram-se também elevados em relação aos controles ($p < 0,0001$). Os autores concluíram que a dosagem sérica de IL-6 apresentou, dentre os outros possíveis marcadores testados, características mais favoráveis para utilização como teste diagnóstico na EI. (115)

Em estudo recente, publicado em 2013, também foi destacado o potencial das citocinas inflamatórias, entre elas novamente a IL-6, como potenciais marcadores diagnósticos e prognósticos na EI. Esse estudo incluiu 26 pacientes com EI tardia de válvula protética, que necessitaram de cirurgia valvar. Mais uma vez, os microorganismos causadores mais frequentes foram os estafilococos. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ e GMCSF foram dosadas em amostras de sangue colhidas dos pacientes com EI em até 24 horas após a admissão. (108)

A principal causa de indicação de tratamento cirúrgico nesse estudo foi insuficiência cardíaca. Oito pacientes faleceram em até 30 dias após a cirurgia; esta taxa de mortalidade (30,8%) é semelhante àquela relatada na literatura. Após as análises, constatou-se que os níveis séricos de IL-6, IL-8 e IFN- γ foram maiores em não sobreviventes do que em sobreviventes ($p < 0,05$). É importante mencionar que os níveis dessas citocinas correlacionaram-se entre si, indicando que são produzidas de modo rápido e simultâneo em resposta à infecção. Assim, níveis elevados de IL-6, IL-8 e IFN- γ poderiam refletir controle inadequado da infecção já nos momentos iniciais da doença, em não sobreviventes, ajudando a identificar os pacientes de maior risco para os quais seria necessário individualizar o tratamento. (108)

Em estudo anterior desenvolvido por nosso grupo e também publicado em 2013, foi realizada dosagem sérica de citocinas inflamatórias em 45 pacientes com diagnóstico de

EI. As amostras de sangue foram colhidas em até 72 horas após a admissão; as seguintes citocinas foram analisadas: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α . Essas mesmas citocinas foram também dosadas em amostras de sangue provenientes de 10 controles saudáveis. A idade média dos pacientes com EI foi 42 \pm 16 anos e os principais microorganismos causadores foram os estafilococos, seguidos por estreptococos.

As análises das amostras evidenciaram que os pacientes com EI apresentavam elevação das concentrações séricas das citocinas avaliadas em relação aos controles saudáveis. Esse aumento foi significativo para todas as citocinas avaliadas, porém sem diferença das dosagens entre os pacientes com hemoculturas positivas ou negativas. (116)

Considerando-se o microorganismo causador, foi observado que os pacientes com EI por estafilococos apresentaram concentrações mais elevadas de IL-12 e IL-1 β em relação aos controles saudáveis ($p=0,023$ e $p=0,019$, respectivamente). Foi também encontrada correlação positiva entre as dosagens séricas de IL-10 e o tamanho da vegetação ($r=0,44$; $p=0,016$). Entretanto, diferentemente do estudo previamente citado, publicado no mesmo ano, não foi encontrada associação entre as concentrações de citocinas e a ocorrência de óbito intra-hospitalar ou necessidade de cirurgia valvar. (116)

Metodologia diferente foi adotada em outro estudo, publicado em 2006, para avaliar o valor de marcadores inflamatórios no diagnóstico da EI. Nesse estudo foram investigados 270 casos consecutivos de EI, classificando-os, conforme os critérios de Duke, em casos de EI definitiva, possível ou rejeitada. Foram dosados para todos os pacientes os níveis séricos de proteína-C-reativa, velocidade de hemossedimentação eritrocitária (VHS), fator reumatóide e TNF. Após a classificação, 56 casos foram considerados como portadores de EI definitiva, sendo que em 214, essa hipótese diagnóstica foi rejeitada. (117)

A maior parte dos casos de EI foi causada por estreptococos, diferentemente da maior parte dos estudos atuais. Entre todos os marcadores testados, apenas o fator reumatóide apresentou concentrações séricas elevadas nos pacientes com EI definitiva em relação aos pacientes com EI rejeitada. O fator reumatóide já está incluído como critério menor nos critérios de Duke. Os autores mencionam, entretanto, que outros marcadores

inflamatórios não analisados no estudo poderiam ser também relevantes para o diagnóstico na suspeita de EI. (117)

A elevação de citocinas inflamatórias na EI pode estar relacionada a uma das complicações mais temidas da doença, o aneurisma micótico, embora essa hipótese tenha sido relatada apenas na forma de caso clínico. Médicos de hospital pediátrico em Tokyo, no Japão, publicaram, em 2005, um caso de EI complicada pela presença de aneurisma micótico em uma criança de 12 anos com síndrome de Down e insuficiência mitral. (118) Foram constatadas dosagens séricas elevadas de IL-6, TNF- α , receptor solúvel de TNF tipo 1 e selectina E solúvel em amostras de sangue coletadas da paciente com EI. Níveis aumentados de IL-6, TNF- α e receptor solúvel de TNF tipo 1 foram também observados no líquido desta paciente.

Considerando-se as ações pró-inflamatórias das citocinas avaliadas e estudos prévios demonstrando o papel das citocinas na patogênese de lesões endoteliais em outras doenças, como na doença de Kawasaki, os autores concluíram que as citocinas, associadas a alterações na formação das artérias presentes na trissomia do cromossomo 21, provavelmente contribuíram para a produção do aneurisma micótico. (118)

Diante de todos os estudos citados, percebe-se a potencialidade das citocinas envolvidas com a resposta inflamatória para a avaliação da atividade da resposta imune nos pacientes com EI. Os resultados desses estudos são promissores, embora haja diferenças entre eles em termos de população avaliada, metodologia empregada, existência ou não de grupos controle para comparação, entre outras. Assim torna-se evidente a necessidade de mais estudos para a confirmação do potencial clínico das citocinas como marcadores diagnósticos e prognósticos da EI.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil de citocinas envolvidas com a resposta inflamatória (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α) em pacientes com EI.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações séricas das citocinas envolvidas com a resposta inflamatória (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α) em pacientes com EI, pacientes com outras infecções ativas e em indivíduos saudáveis;

- Comparar a dosagem sérica de citocinas envolvidas com a resposta inflamatória (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α) entre pacientes com EI, pacientes com outras infecções ativas e indivíduos saudáveis;

- Identificar na população geral estudada (pacientes com EI ou outras infecções e os indivíduos saudáveis) os altos e baixos produtores das citocinas envolvidas com a resposta inflamatória avaliadas;

- Identificar, no grupo de pacientes com EI, os altos e baixos produtores das diversas citocinas e relacionar os resultados com a etiologia da EI.

4 MÉTODO

Este estudo corresponde ao subprojeto de uma linha de pesquisa já em desenvolvimento há 10 anos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, que visa traçar o perfil clínico e laboratorial dos pacientes com EI admitidos nesta instituição.

4.1 Definições

4.1.1 Definição de endocardite infecciosa

Considerou-se EI a infecção microbiana da superfície endotelial do coração, podendo acometer valvas cardíacas, defeitos septais, cordões tendíneos e endocárdio mural. Outros sítios possíveis de infecção são dispositivos e materiais cirúrgicos intracardíacos. Foram também consideradas como EI as infecções de *shunts* arteriovenosos, *shunts* arterioarteriais ou coarctação de aorta pois, apesar de corresponderem a endarterites, essas infecções são clínica e patologicamente semelhantes à EI. (3)

4.1.2 Definição de EI definitiva, possível e rejeitada

Segundo os critérios de Duke, considera-se definitivo o diagnóstico de EI quando estão presentes dois critérios clínicos maiores, ou um critério maior e três menores, ou cinco critérios menores. Também considera-se a presença de EI definitiva quando atende-se algum dos critérios patológicos. O diagnóstico de EI é classificado como possível se são observados apenas um critério maior e um critério menor ou se são encontrados apenas três critérios menores. Finalmente, a hipótese de EI é rejeitada quando existe um diagnóstico alternativo firmemente estabelecido, ou quando a síndrome febril resolve-se com quatro dias ou menos após início da antibioticoterapia. (1)

4.1.3 Definição de intercorrências de EI durante a internação

Baseando-se na diretriz mais recente sobre EI, (2) definimos para fins deste estudo as seguintes complicações como intercorrências da EI durante a internação hospitalar: desenvolvimento ou agravamento da insuficiência cardíaca (IC) durante o tratamento, infecção não controlada e eventos embólicos. A IC pode ser causada por insuficiência aórtica ou mitral grave, fístula intracardíaca ou, mais raramente, obstrução valvar, quando uma grande vegetação obstrui parcialmente o orifício valvar. A extensão perivalvar da infecção é a causa mais frequente de infecção não controlada e inclui a formação de abscessos, pseudoaneurismas e fístulas. Outra causa de infecção não controlada é a infecção por microorganismos de difícil tratamento, como fungos e bactérias multirresistentes. Casos de infecção não controlada são usualmente caracterizados por persistência de febre por mais de sete a 10 dias apesar do tratamento antimicrobiano específico. Eventos embólicos são complicações frequentes relacionadas à embolização de fragmentos ou mesmo de toda a vegetação cardíaca. O cérebro e o baço são os sítios mais frequentes de embolismo na EI de câmaras esquerdas, enquanto êmbolos pulmonares são mais comuns em EI de câmaras direitas. Consideraremos como intercorrências os eventos embólicos com repercussões clínicas, pois sabe-se que estes eventos podem ser silenciosos em até 20% dos pacientes com EI. (2)

4.2 Delineamento do estudo

Trata-se de estudo do tipo coorte, envolvendo três grupos distintos de indivíduos. O primeiro grupo foi constituído por pacientes com diagnóstico de EI definitiva internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais no período de setembro de 2005 a maio de 2013 e por pacientes com diagnóstico de EI definitiva internados no Hospital São Francisco e na Santa Casa de Belo Horizonte no período de março de 2012 a maio de 2013. O segundo grupo foi composto por indivíduos saudáveis (controles saudáveis) e o terceiro grupo por pacientes com outras infecções ativas, abrangendo pacientes acometidos por síndromes febris de origem

infecciosa, cuja causa seja diferente de EI, e pacientes com suspeita clínica não confirmada de EI (controles doentes).

4.3 Critérios de inclusão

Grupo de pacientes com EI

- Idade igual ou superior a 15 anos;
- Diagnóstico de EI definitiva, segundo os critérios de Duke;
- EI antes do início de tratamento antibiótico ou dentro da primeira semana de antibioticoterapia específica para EI com evidências de infecção ativa;
- Consentimento para participar do estudo, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

Grupo de controles saudáveis

- Idade igual ou superior a 15 anos;
- Ausência de infecção ou inflamação ativas no momento da coleta da amostra de sangue e nos últimos sete dias;
- Ausência de doenças inflamatórias, infecciosas ou imunossupressoras (obs: foram incluídos os pacientes hipertensos com bom controle pressórico);
- Não ter sido submetido à cirurgia e não ter recebido vacinas nos últimos sete dias (conforme questionário em anexo [Apêndice D]);
- Ter assinado o TCLE (Apêndice B).

Grupo de controles doentes

- Idade igual ou superior a 15 anos;
- Acometimento por outras infecções ativas (síndromes febris de origem infecciosa, cuja causa seja diferente de EI ou paciente com suspeita de EI não confirmada);
- Ter assinado o TCLE (Apêndice C).

4.4 Critérios de exclusão

Grupo de pacientes com EI

- Realização de cirurgia valvar em até sete dias antes da primeira coleta de amostra de sangue para dosagem de citocinas;
- Óbito antes da coleta da primeira amostra de sangue.

4.5 Recrutamento

O recrutamento dos pacientes com diagnóstico de EI definitiva foi realizado por busca ativa periódica nos hospitais participantes (Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Hospital São Francisco de Assis e Santa Casa de Belo Horizonte). Foram também divulgados por meio de cartazes afixados em pontos estratégicos desses hospitais os telefones de contato dos pesquisadores responsáveis para que a existência de casos de EI, suspeita ou definitiva, fosse comunicada.

Os pacientes com diagnóstico de EI definitiva que preenchiam os critérios de inclusão eram convidados a participar do estudo. Os pesquisadores esclareciam o paciente e os acompanhantes sobre o estudo, e, caso houvesse concordância com a participação, o paciente ou seu responsável preenchiam o TCLE (Apêndice A). A seguir, os pesquisadores colhiam informações para completar o protocolo de dados, como identificação e história clínica (Apêndice E).

Os pesquisadores prosseguiram o acompanhamento do paciente pelo menos duas vezes por semana até a alta hospitalar ou óbito. As informações sobre evolução e tratamento eram registradas no protocolo de dados, já mencionado (Apêndice E). Além da evolução clínica e da presença de complicações, eram também anotados os exames laboratoriais ao diagnóstico e durante a evolução semanal, o resultado de hemoculturas e do(s) ecocardiograma(s) realizados.

O seguimento tardio foi realizado com seis meses a um ano após a alta hospitalar, pessoalmente ou por telefone, com o objetivo de avaliar a mortalidade e a presença de intercorrências (por exemplo, necessidade de cirurgia ou ocorrência de acidente vascular encefálico) nessas datas.

Os pacientes com EI definitiva incluídos no estudo foram submetidos a propedêutica de rotina dos hospitais onde estavam internados. Essa propedêutica incluía exame clínico completo; coleta de amostras de sangue para a realização de hemoculturas, hemograma, avaliação da função renal, ionograma; e realização de ETT ou ETE, segundo critério clínico. Estes exames foram repetidos de acordo com a rotina de cada serviço. Exames como radiografias e tomografias computadorizadas, bem como outros exames complementares, foram realizados conforme indicação clínica e julgamento da equipe médica assistente.

Além dos exames laboratoriais da propedêutica de rotina, foram também colhidas amostras de sangue para dosagem de citocinas envolvidas com a resposta inflamatória. A primeira coleta nos pacientes com EI definitiva foi realizada antes do início da administração dos antimicrobianos ou dentro de sete dias do uso de terapia antimicrobiana específica na vigência de evidências clínicas e/ou laboratoriais de infecção ativa (por exemplo, febre, leucocitose). A segunda coleta foi realizada de duas a três semanas após o início do tratamento e a última coleta foi feita no dia ou alguns dias antes da alta hospitalar. A duração do tratamento antimicrobiano da EI é em geral de quatro a seis semanas. Assim, a sequência das coletas pretendia obter a dosagem sérica das citocinas ao início, meio e fim do tratamento. Coletas adicionais foram realizadas na vigência de intercorrências durante a internação (definidas previamente).

O recrutamento dos voluntários saudáveis foi realizado por meio de busca ativa entre os funcionários do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Os funcionários que preenchiam os critérios de inclusão eram convidados a participar do estudo. Após receberem informações sobre a pesquisa e caso consentissem em assinar o TCLE (Apêndice B), eram submetidos à coleta de uma amostra de sangue para dosagem das citocinas.

O recrutamento dos controles doentes ocorreu por dois caminhos. O primeiro caminho envolvia a equipe médica assistente dos serviços hospitalares participantes do estudo. Essa equipe comunicava aos pesquisadores a existência de casos suspeitos ou definitivos de EI. Os pacientes com suspeita de EI que preenchessem os critérios de inclusão eram convidados a participar do estudo e, após os esclarecimentos necessários, assinavam o TCLE (Apêndice C) caso concordassem com a participação. Esses pacientes eram submetidos à coleta de amostra de sangue para dosagem de citocinas. Havendo confirmação da EI definitiva, as coletas prosseguiram conforme a sequência previamente mencionada. Caso a suspeita fosse descartada, estes pacientes eram incluídos como controles doentes e novas amostras não eram coletadas.

O segundo caminho compreendeu a busca ativa dos pesquisadores nos serviços hospitalares participantes por pacientes com síndromes febris não causadas por EI e que preenchessem os critérios de inclusão. Estes pacientes eram esclarecidos quanto ao estudo e convidados a participar. Caso aceitassem, assinavam o TCLE (Apêndice C) e eram submetidos à coleta de uma amostra de sangue para dosagem de citocinas.

É importante mencionar que, tanto para o grupo de controles doentes quanto para o grupo de controles saudáveis, foram selecionados indivíduos com idade semelhante e mesmo sexo dos pacientes com EI definitiva, para assegurar que não houvesse diferença estatística entre os grupos em relação a essas variáveis.

4.6 Dosagem das citocinas

As amostras de sangue periférico foram coletadas dos pacientes com EI definitiva no início, meio e fim do tratamento, conforme mencionado previamente. Coletas adicionais foram realizadas na vigência de intercorrências durante a internação. As amostras dos controles doentes e saudáveis foram colhidas no momento da inclusão destes indivíduos no estudo. Procurou-se realizar a inclusão de controles de maneira que houvesse o menor intervalo de tempo possível entre a coleta das amostras de controles saudáveis e doentes e a coleta dos casos de EI correspondentes (mesmo sexo e idade aproximada). Este intervalo não foi superior a 12 meses. Considerando os controles doentes e os casos

de EI definitiva, sempre que possível a coleta era realizada concomitantemente com a coleta de sangue rotineiramente realizada nesse grupo de pacientes durante a internação.

A coleta das amostras de sangue foi realizada por profissionais treinados, atendendo às normas de anti-sepsia e controle de infecção. Foram utilizados materiais estéreis e descartáveis. Os recipientes a vácuo utilizados para as coletas foram tubos plásticos empregados rotineiramente pela equipe do Laboratório do Hospital das Clínicas da UFMG (*VACUETTE® Serum Clot Activator Tubes; Greiner Bio-One, Germany*).

Após a coleta, as amostras eram encaminhadas em até 60 minutos ao Laboratório do Hospital das Clínicas da UFMG, onde realizava-se a centrifugação. As amostras eram centrifugadas a uma velocidade padronizada de 3500 rotações por minuto por 15 minutos para a separação do soro. O soro era a seguir transferido a *ependorfs* plásticos estéreis previamente identificados e armazenado em freezer com temperatura de -20°C. As amostras eram então transferidas ao Laboratório de Biomarcadores do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas) para a dosagem das citocinas.

Os níveis plasmáticos das citocinas envolvidas com a resposta inflamatória (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-8, IL-12 e IL-10) dos soros dos indivíduos selecionados para essa pesquisa foram quantificados utilizando-se o kit comercial *Cytometric Bead Array (CBA)* (*Becton Dickinson, Pharmingen, San Diego, EUA*), segundo os princípios gerais da técnica (119) e de acordo com as instruções do fabricante

A citometria de fluxo por CBA emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas e recobertas com anticorpos específicos para as citocinas e quimiocinas humanas, que são detectadas no canal FL3 ou FL4. Essa técnica permite a avaliação simultânea de vários biomarcadores no mesmo ensaio, empregando-se pequenos volumes de amostra (25 μ l).

Alíquotas de soros e alíquotas dos padrões de biomarcadores humanos foram submetidas à diluição seriada com tampão diluente G (reagente específico do kit CBA). Após a preparação das amostras e padrões, essas alíquotas (25 μ l) foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (*Falcon N° 2052*). A cada tubo foi adicionado 15 μ L da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos

monoclonais antibiomarcadores específicos anti-IL-1 β , IL-6, TNF, IL-8, IL-12 e IL-10 (*Human Inflammation CBA Kit*), que foram reincubados por 90 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L da solução F (“*Wash buffer*”, reagente presente no kit CBA), centrifugadas a 600 x g por 7 minutos a 18°C e, o sobrenadante cuidadosamente descartado. As esferas foram, então, re-incubadas na presença 20 μ L do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais antibiomarcadores humanos conjugados com ficoeritrina (PE) por 90 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com 500 μ L da solução F tampão de lavagem, centrifugadas a 600 x g por 7 minutos a 18°C e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250 μ L de reagente F e os dados imediatamente adquiridos e analisados no citômetro de fluxo (*FACSalibur*®, BD®, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

Após a realização das dosagens, estabeleceu-se a mediana global dos valores de cada citocina para toda a população estudada, incluindo os controles saudáveis. A seguir, a porcentagem de indivíduos que apresentavam altos níveis de citocinas foi calculado considerando-se cada citocina. Assim, foi possível identificar os baixos e altos produtores das citocinas avaliadas. Gráficos de “radar” foram construídos para representar o perfil das citocinas para os grupos estudados. Nesses gráficos, cada eixo representa a porcentagem de indivíduos apresentando concentrações elevadas de determinada citocina. Todos os testes foram realizados por meio do programa estatístico *GraphPad Prism version 5.0* (San Diego, CA).

4.7 Local do desenvolvimento do estudo

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da UFMG, na Santa Casa de Belo Horizonte e no Hospital São Francisco de Assis. Estes hospitais possuem enfermaria de Clínica Médica e de Cardiologia, representando centros terciários para os quais frequentemente são referenciados os casos de EI. É importante ressaltar que 93% dos

pacientes com IE incluídos no estudo foram admitidos no Hospital das Clínicas da UFMG, enquanto três pacientes (3.5%) foram admitidos na Santa Casa de Belo Horizonte e três pacientes (3.5%) no Hospital São Francisco de Assis.

Parte do estudo desenvolveu-se também na Faculdade de Medicina da UFMG, local de armazenamento temporário das amostras e de recrutamento de uma parcela dos controles saudáveis. Os seguintes serviços também foram pontos de apoio para a realização do estudo: Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG e Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas).

4.8. Cálculo do tamanho amostral

Conforme visto na revisão prévia, ainda não há na literatura grande número de estudos explorando as citocinas como ferramentas para diagnóstico e prognóstico da EI e como marcadoras da atividade da doença. Ainda menos numerosos são os estudos que incluíram controles com infecções que não a EI. Quando existentes, utilizam grupo controle doente com apenas um tipo de infecção. Assim, dentre esses estudos, investigação relativamente recente na qual se comparou a dosagem de algumas citocinas envolvidas com a resposta inflamatória (IL-6, TNF- α , IL-1 α) em pacientes com EI e em pacientes com infecção do trato urinário (ITU) foi escolhida para a base do cálculo do tamanho amostral (99). A escolha dessa publicação fundamentou-se na utilização de um grupo controle doente, na existência de resultado estatisticamente significativo (considerando a IL-6) e no desenho semelhante ao estudo proposto na presente pesquisa.

A utilização da ferramenta estatística software G*Power 3.1.6 permitiu o cálculo de uma amostra mínima de 40 pacientes com EI e 20 controles doentes, necessária para se obter o poder de 95% e erro alfa bicaudal de 0,05 na detecção de diferença estatisticamente significativa na dosagem da IL-6 entre os dois grupos. Foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras independentes (dados não paramétricos).

Considerando-se que o grupo de controles doentes do estudo utilizado para a base do cálculo amostral era constituído apenas por um tipo de infecção (ITU) e que os pacientes do grupo de controles doentes da presente pesquisa apresentavam outros tipos de infecção, os pesquisadores optaram por aumentar a amostra estudada, considerando tanto os casos de EI como o número de controles.

4.9 Análise estatística

As informações coletadas por meio dos protocolos (clínicas e laboratoriais) e os resultados das dosagens das citocinas envolvidas com a resposta inflamatória foram digitadas em banco de dados desenvolvido no *software* estatístico SPSS (versão 13.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Este mesmo *software* foi utilizado para as análises estatísticas.

Os resultados da análise descritiva para as variáveis quantitativas foram obtidos utilizando medidas de tendência central (média para dados paramétricos e mediana para dados não paramétricos) e de dispersão (desvio padrão para dados paramétricos e intervalo interquartilico para dados não paramétricos). Os resultados da análise descritiva para as variáveis qualitativas foram obtidos por meio do uso de frequências e porcentagens.

A comparação dos três grupos analisados (casos de EI, controles doentes e controles saudáveis) considerando as variáveis qualitativas descritivas com distribuição gaussiana foi realizada pelo teste qui-quadrado (χ^2). A comparação entre os três grupos mencionados considerando as variáveis quantitativas descritivas com distribuição não gaussiana foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis.

A comparação entre os resultados das dosagens de citocinas entre os três grupos estudados (casos de EI, controles doentes e controles saudáveis) também foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis, por tratarem-se de dados não-paramétricos. Esta análise foi seguida do pós-teste de Dunns.

4.10 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer nº ETIC 412/06), pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Belo Horizonte (Registro CEP: 013/2012) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital São Francisco de Assis (Registro CEP: 01/2012).

4.11 Pesquisa e normalização bibliográfica

A pesquisa bibliográfica foi realizada por meio de ferramentas de busca utilizando-se palavras chave. A base de dados consultada foi o portal de literatura biomédica Medline, disponível na internet e organizado pela *National Library of Medicine* (EUA). Os artigos incluídos como referências bibliográficas foram escolhidos após pesquisa de publicações indexadas nas áreas de interesse, dos anos 1984 a janeiro de 2014. Foram também utilizados para a bibliografia livros de referência sobre os temas estudados.

As referências foram organizadas e formatadas de acordo com as orientações do *International Committee of Medical Journal*. (120)

5 RESULTADOS

5.1 Artigo científico

Cytokine Signatures in Infective Endocarditis

Izabella Rodrigues de Araújo, MD¹; Teresa Cristina Abreu Ferrari, MD, PhD¹; Andréa Teixeira de Carvalho²; Ana Carolina Campi Azevedo²; Luan Vieira Rodrigues¹; Thais Lins de Souza Barros¹; Maria do Carmo Pereira Nunes, MD, PhD¹

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

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

Department of Internal Medicine, School of Medicine of the Federal University of 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

Introduction

Infective endocarditis (IE) remains a severe disease associated with a high mortality rate despite recent advances in its diagnosis and treatment [1,2]. Rapid diagnosis is essential to institute effective treatment, mainly in staphylococcal IE, which is characterized by a more severe course and worse outcome [3].

IE is currently diagnosed according to the Duke criteria, a worldwide used system based on clinical features, echocardiography and blood culture findings [1,2]. However, the presentation of IE has changed throughout the world, with a reduction in the classic clinical findings traditionally associated with this condition, which can make its

diagnosis difficult [1,2,4]. Echocardiography plays a fundamental role in the diagnosis of IE, but it should be interpreted taking into account the clinical features [1,5]. Although blood cultures are valuable tools, the identification of microorganisms at the time of hospital admission has decreased in the past few decades [3,6]. Furthermore, blood cultures pose an inherent delay, which may contribute to the delay in the diagnosis of IE. Therefore, additional diagnostic criteria for IE would be of great importance. Considering the infective-inflammatory nature of IE, serum inflammatory markers may contribute to the diagnosis and management of this condition [3,7,8].

Cytokines are small peptides produced when sensitized lymphocytes come directly into contact with an antigen. Their activities are closely connected with the induction and effector phases of all immune and inflammatory responses [9]. Several studies have shown elevation of proinflammatory cytokines in the serum of IE patients compared to health subjects [8,10-13]. However, few studies have compared the serum concentrations of inflammatory cytokines in patients with IE and controls with non-IE infections [10,14,15].

Therefore, the aim of the present study was to determine serum cytokine concentrations in patients with IE and to compare the levels of these inflammatory markers with those observed in both healthy subjects and a group of patients with non-IE infections, in order to explore the profile of cytokines in different infectious processes.

Materials and methods

Eighty-one patients with definite IE according to Duke's Criteria who were admitted to University Hospital, Federal University of Minas Gerais, between January 2005 and May 2013 were enrolled in the study. This institution is a tertiary health care center in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The study was approved by the institutional review committee and written informed consent was obtained from all participants before the sample collection.

Upon admission the patients underwent careful clinical examination and a routine laboratory investigation was recorded. This investigation comprised: blood cultures, complete blood count, serum C-reactive protein levels, serum chemistry and urine

analysis. Transthoracic (TTE) and/or transesophageal echocardiography (TEE) were performed, as clinically indicated, to investigate: vegetation, abscess, new dehiscence, and new moderate or severe valvular regurgitation [16], in addition to preexisting cardiac lesions. Serum samples of all patients were obtained within the first week of admission to assess the concentrations of several inflammatory cytokines.

In order to compare serum concentrations of the cytokines, two control groups were selected. The first group consisted of 34 healthy volunteers, and the second group comprised 30 patients with non-IE infections. These individuals were matched to the IE patients by age and gender. Serum samples of these patients were obtained by the time of their enrollment into the study.

Serum samples from the patients with IE and from the controls were analyzed for the following markers: interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Cytokine concentrations were measured by cytometric bead array (CBA).

Cytometric Bead Array Assay

The analysis by flow cytometry is a methodology which allows the simultaneous measurement of multiple biomarkers in a single sample [17-19]. The CBA immunoassay kit (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) was used for the quantitative determination of the cytokines levels, following the instructions of the manufacturer as previously described [18].

The CBA kit uses 7.5 μ m polystyrene microbeads, consisting of six distinct populations, unique on their type-3 fluorescence intensity (FL-3) each coupled to monoclonal antibody (MoAb) against one of the six biomarkers IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α (inflammation kit) to capture a given cytokine. A second fluorescently labeled phycoerythrin (PE)-anti-cytokine antibody was added, and the concentrations of the individual cytokines were indicated by their fluorescent intensity. Data were acquired using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA). BD CBA software

(Becton Dickinson, USA) was used for sample analysis. The results were based on standard concentration curves and expressed as pg/ml.

Statistical analysis

Categorical data were presented as numbers and percentages, continuous data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or median and interquartile range, as appropriate.

Serum cytokines concentrations were compared using Kruskal-Wallis test. Post hoc analysis was performed with Dunn's multiple comparison test. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$. The analyses were performed using SPSS statistical software (version 18.0; SPSS, Chicago, IL).

The cytokine profile was assessed to identify low and high cytokine producers. Briefly, after the establishment of the global median IE/ controls values, the percentage of individuals showing high cytokine levels was calculated for each cytokine. Radars charts were further used to summarize the cytokine signatures. Each axis represents the frequency (%) of individuals showing high cytokine concentrations. All tests were provided by GraphPad Prism version 5.0 (San Diego, CA).

Results

Clinical features

Mean age of IE patients was 47 ± 17 years (range, 15 - 80 years), and 40 (49%) individuals were male. Characteristics of the study population are shown in Table 1. The most common underlying heart disease was the presence of valvular prosthesis (33.3%), followed by intracardiac devices such as pacemaker and implantable cardioverter-defibrillator (21.3%). Rheumatic valvular disease was present in 39.7% of the patients with IE. The mitral valve was the most frequently involved, affecting 34.6%

of cases. The portal of entry and source of the bacteremia was identified in 31 patients (38.8%), and dental procedures were the main source of bacteremia (18%).

IE clinical manifestations at presentation included fever (82.3%), anorexia (69.6%), weight loss (65.4%), night sweats (45%), and myalgia (15.8%). Neurological complications were present in 11 patients (13.9%); seven of them were ischemic events. Embolic events also occurred in other sites, being the lung and kidneys the most frequent ones (three cases each), followed by the spleen (two cases).

A systolic murmur was observed in 67 patients (83.3%) during physical examination. The so called classic signs of IE were rarely found and included: Janeway lesions (three cases) and petechiae (five cases). Splenomegaly was found in 13 patients (16.7%).

In-hospital follow-up

Fifty patients (61.6%) developed manifestations of heart failure (HF) during the course of the disease and in 11.4% of them this disorder evolved to refractory HF. Early surgery was performed in 46 (56.8%) cases; HF was the predominant indication for surgery (29.6%), followed by uncontrolled infection (14.8%) and need for device extraction (12.3%). Cardiac complications (perivalvular abscess, chordal rupture, leaflet rupture) were registered in 23 cases (28.6%) whereas neurological complications occurred in six patients (7.8%). Systemic embolic events were detected in five patients (6.8%), while persistent fever (> 10 days) was observed in 10 patients (12.9%). Twenty patients (24.7%) died.

Laboratorial data

Infective microorganisms were isolated from 38 IE patients (46.8%). The main causative microorganisms were staphylococci (19.7%), streptococci (12.3%), and enterococci (7.4%). Community-acquired methicillin-resistant *S.aureus* was found in six patients (7.4%) and coagulase-negative staphylococci in 12.3%. Culture-negative endocarditis occurred in 44 patients (54%), and 25 of them had received antibiotics prior to the diagnosis of IE in the previous month, 43% of them in the last two weeks.

Anemia was present in 86% of the patients, and white blood cell count (WBC) was elevated in 65.4%. C-reactive-protein was constantly elevated (mean 111 ± 96 mg/l). Hematuria (32.1%), proteinuria (25.9%) and positive rheumatoid factor (14.8%) were other laboratorial findings in these patients population at the diagnosis of IE.

Echocardiography was performed in all patients; TTE was performed in 13 patients (16.5%) and TEE in 83.5%. Vegetations were found in 70 patients (87.3%), with variable length, ranging from 2mm to 58mm (median 11mm; 25, 50 and 75 percentiles: 8mm, 11mm and 17.2 mm, respectively). Echocardiographic features of the patients are shown in Table 1.

Control groups

Thirty-four healthy volunteers were included in the first control group. Mean age was 49.4 ± 18.7 years (range 18-82 years), and 17 (50%) individuals were male. The second control group consisted of 30 patients with active non-IE infections, including pyelonephritis, pneumonia, catheter-related sepsis, dengue (a tropical virus infectious disease). Mean age of this second control group was 50.4 ± 21.8 years (range 18-85 years), and 16 (53.3%) were male.

There were no significant differences among the three groups regarding age ($p=0.693$) and sex distribution ($p=0.933$).

Cytokines

The results of serum concentrations of the inflammatory cytokines (IL- 1β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α) from the patients with IE and from the controls are given in Figure 1.

Except for IL-12, the patients with IE had significantly higher serum concentrations of the inflammatory mediators than the healthy donors. Median IL- 1β , TNF- α and IL-12 serum levels were significantly higher in the IE patients than in the patients with non-IE

infections. When the median serum concentrations of the inflammatory cytokines were compared between the two control groups, a significant statistical difference was found only for IL-6 and IL-8, which were higher in group of patients with non-IE infections.

Another way of representing the results of the serum concentrations of the inflammatory cytokines is pointing out the higher producers of these immunological biomarkers in the three study groups. The results are shown in Figure 2. These data complete and illustrate the information given in Figure 1. The IE group consists of high producers of all cytokines analyzed. The control group of patients with infections other than IE showed an elevated prevalence of high producers of IL-6 and IL-8 and a moderate prevalence of high producers of IL-10. When the IE group and the group of other infections were compared, a more elevated prevalence of high producers of IL-1 β , TNF- α and IL-12 was observed in the IE group.

In order to assess the levels of the cytokines in the patients in IE group according to the infecting microorganism, the patients were stratified in three subgroups: staphylococcal IE, non-staphylococcal IE and culture-negative IE. The results are given in Figure 3. Serum concentrations of TNF- α and IL-12 were significantly higher in staphylococcal IE subgroup than in the non-staphylococcal IE group. When the prevalence of higher producers of the immunological biomarkers among the IE subgroups was investigated (Figure 4), an elevated prevalence of higher producers of IL-1 β , TNF- α and IL-12 was observed only in the staphylococcal IE subgroup. In addition, according to Figure 4, the prevalence of higher producers of IL-10, an immunoregulatory cytokine, was lower in the staphylococcal IE subgroup.

Discussion

This study assessed the profile of inflammatory cytokines in IE, non-IE infections and healthy individuals. Our findings show that patients with IE presented with significantly higher serum concentrations of IL-1 β , TNF- α and IL-12 than in matched-controls with non-IE infections. Additionally, patients with IE had higher serum concentrations of the inflammatory mediators than healthy volunteers' serum, except for IL-12. When IE patients were stratified according to the infecting microorganism, we found higher serum concentrations of TNF- α and IL-12 in staphylococcal IE than in the non-

staphylococcal IE patients, and an elevated prevalence of higher producers of IL-1 β , TNF- α and IL-12 was observed only in staphylococcal subgroup.

Early diagnosis of IE is important for clinical outcome as late diagnosis is related to increase in mortality. Diagnosis is based on clinical features, echocardiography and blood culture findings. However, clinical profile of IE patients has changed in the last decades [2,20] and the percentage negative blood cultures has significantly increased [3,6]. Although echocardiography has fundamental importance in diagnosis, its sensitivity can be lower in some contexts (intracardiac devices, preexisting severe lesions, very small vegetations, non-vegetant IE) [1]. Therefore, the importance of additional diagnostic criteria for IE is evident. Measurement of inflammatory cytokines could contribute to the diagnosis of IE.

The term cytokine describes a functional class of small protein mediators which participates in the induction and effector phases of all immune and inflammatory responses [9]. Once released, proinflammatory cytokines lead to an ensuing activation of the innate or the adaptive immune response, characterized by the further production of immunoregulatory or effector cytokines [21].

Several cytokines are essential for initiating and maintaining the inflammatory response by recruiting leukocytes to the sites of infection [3,4,7,10,22].

Previous studies support that proinflammatory cytokines are elevated in the serum from IE patients compared to healthy subjects [8,10,12,13,23], which was also confirmed in the present study. However, IL-12 levels were similar between IE patients and controls. IL-12 participates in the regulation of innate response and adaptive immunity [24]. This cytokine may have a central role in the development and progression of cell-mediated autoimmune diseases, as well in the maintenance of inflammation in atherosclerotic disease [25]. Although patients with active infections or autoimmune diseases were not included among the healthy subjects, the existence of undiagnosed disorders cannot be completely ruled out. In addition, mean age of the healthy volunteers was higher in comparison to the other groups, and asymptomatic chronic diseases might be present. These facts could also explain why only serum concentrations of IL-6 and IL-8 were

significantly higher when the group of patients with non-IE infections was compared to the healthy controls.

Differently from our study, Kern *et al* [10] found low or undetectable levels of TNF- α in the sera of patients with IE. Similarly, Rawczynska-Englert *et al* [14] observed undetectable serum levels of IL-1 α . These results might be explained by different kinetics of particular cytokines, for example, renal clearance, half-life and total amount [14]. Another possible reason could be a down regulation of the immune cells during persistent stimulation; however, this issue requires further investigation [13,14]. Finally, the differences in serum cytokines detection observed between these studies and ours may be, at least partially, due to the higher sensitivity of the technique employed in our investigation.

In the present study, the serum concentrations of inflammatory cytokines in patients with IE were compared to those of patients with non-IE infections. Few studies have conducted this investigation [10,14,15]. Rawczynska-Englert *et al* [14] measured the levels of IL-1 α , IL-6 and TNF- α in serum from 40 patients with acquired rheumatic valvular heart disease and IE. The serum concentration of the same cytokines was obtained from two control groups including patients with acquired rheumatic valvular heart disease: 15 without infection and 15 with active urinary tract infection (UTI). In all controls without infection the serum IL-6 concentrations were below the calibration range. Serum IL-6 concentrations in the control group with UTI were slightly (but not significantly) elevated. The authors concluded that serum IL-6 levels might suggest ongoing IE and might be used to aid in diagnosis of the disease.

In our study, we included a larger matched-control with active non-IE infections with the purpose of simulating the diagnostic challenge that often occurs in clinical practice. We showed that the median IL-1 β , TNF- α and IL-12 serum levels were significantly higher in IE than non-IE infections patients.

The pathophysiology of IE is closely connected with the inflammatory response. Inflamed endothelia produce cytokines, integrins and tissue factor which, in turn, attract fibronectin, monocytes, and platelets; bacteria attaching to such structures further activate the inflammatory cascade [5]. Therefore, the elevation of potent

proinflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α is not surprising. Previous studies suggest that TNF- α coordinates the cytokine response to injury and acts as a fire alarm [21,26]. Likewise, IL-1 β is a pivotal mediator for the development of acute phase response [21,27]. IL-12 is also an important inflammatory cytokine, which participates in the regulation of innate immune responses [25].

Serum cytokines in staphylococcal IE

When the IE group was stratified according to the etiologic agent, elevated prevalence of higher producers of IL-1 β , TNF- α and IL-12 was observed only in staphylococcal IE subgroup. Similarly, Nunes *et al* [8] found that IL-12 and IL-1 β serum concentrations were higher in patients with IE caused by *S.aureus* compared with streptococcal IE. These findings are in agreement with the observation that pathogens can differ in their abilities to induce inflammatory and immunoregulatory cytokines [7]. In contrast to *Streptococcus*, *S. aureus* is able to colonize damaged endothelium or invade physically intact endothelial cells [5]. It is well known that *S.aureus* is associated with both a higher rate of complications and mortality in IE [3,5,13].

Considering the virulent nature of *S.aureus*, higher serum concentrations of IL-1 β and TNF- α in staphylococcal IE are not surprising, since an exacerbated inflammatory response could be expected and those are potent inflammatory cytokines. Higher serum concentrations of IL-12 are also in agreement with the pathogenesis of staphylococcal IE. IL-12 regulates innate immune responses and promotes the development of a T helper 1 (Th1) adaptive immune response, which is characterized by enhanced mononuclear phagocyte responses [21,24].

In addition, according to our findings (see Figure 4), the inflammatory response in staphylococcal IE may not be properly antagonized by IL-10 production. Inflammatory response successfully eradicates pathogens, but often causes deleterious side-effects. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine which regulates immune response, limiting damage to the host and preventing immunopathology [28,29]. We hypothesize that the lower production of IL-10 in staphylococcal IE could explain, at least in part, the more exacerbated inflammatory response and the higher clinical impact of this infection.

However, it remains uncertain whether initial high IL-12, IL-1 β and TNF- α levels and/or low IL-10 concentrations are associated (or not) with a worse prognosis.

Study limitations

Positive blood cultures remain fundamental tools for diagnosis of IE, belonging to the “major criteria” according to Duke criteria [1]. However, the proportion of culture-negative IE in our study was 54%. Recent studies reported up to 40% of negative blood cultures [3,6]. This high prevalence is believed to be due to previous administration of antimicrobial agents before IE diagnosis and inadequate microbiological techniques. Although a standard blood culture system is used at our institution, we cannot entirely exclude the possibility of some oversights, such as lack of meticulous care in obtaining the blood and prolonged specimen transport time [5].

Our study group included patients from a large tertiary-care center, to which many patients with IE were referred from other hospitals. This fact may have caused selection bias resulting in limitations to the generalization of the results. Furthermore, as previously mentioned, although efforts were employed in order to select completely healthy subjects, the existence of undiagnosed and asymptomatic illness cannot be excluded.

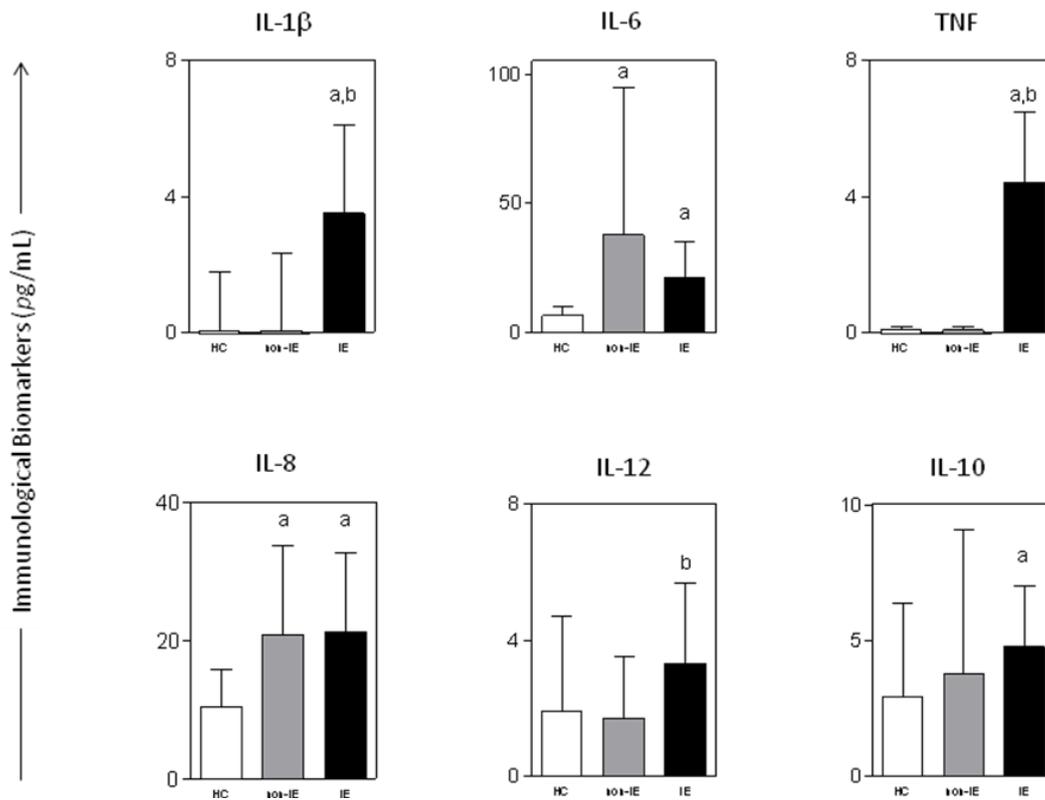
Conclusions

Except for IL-12, inflammatory cytokines were elevated in the IE in comparison to healthy controls. Median IL -1 β , TNF- α and IL-12 serum levels were significantly higher in IE than in non-IE infections. Lower IL-10 production was observed in staphylococcal IE, compared to non-staphylococcal IE. Immune process in IE is very complex and several factors may be involved. Further studies are necessary to define the role of inflammatory cytokines in the diagnosis and prognosis of IE.

Acknowledgements

We thank all the personal of the echocardiography and laboratory for their collaboration throughout the study. This work was also supported by Fiocruz (Rene Rachou Research Center-Minas Gerais-Brazil).

Figure 1. Serum concentrations of inflammatory cytokines in study groups



Legend: a: significant statistical difference ($p < 0.05$) between IE group or non-IE infections group and healthy controls; b: significant statistical difference ($p < 0.05$) between IE group and non-IE infections group ; HC: healthy controls; non-IE: non-IE infections; IE: infective endocarditis

Figure 2- Higher producers of immunological biomarkers

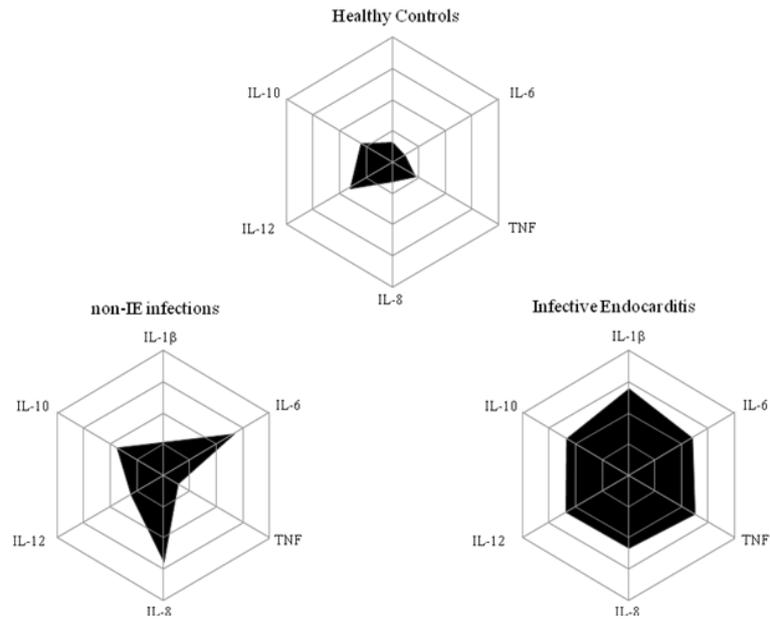
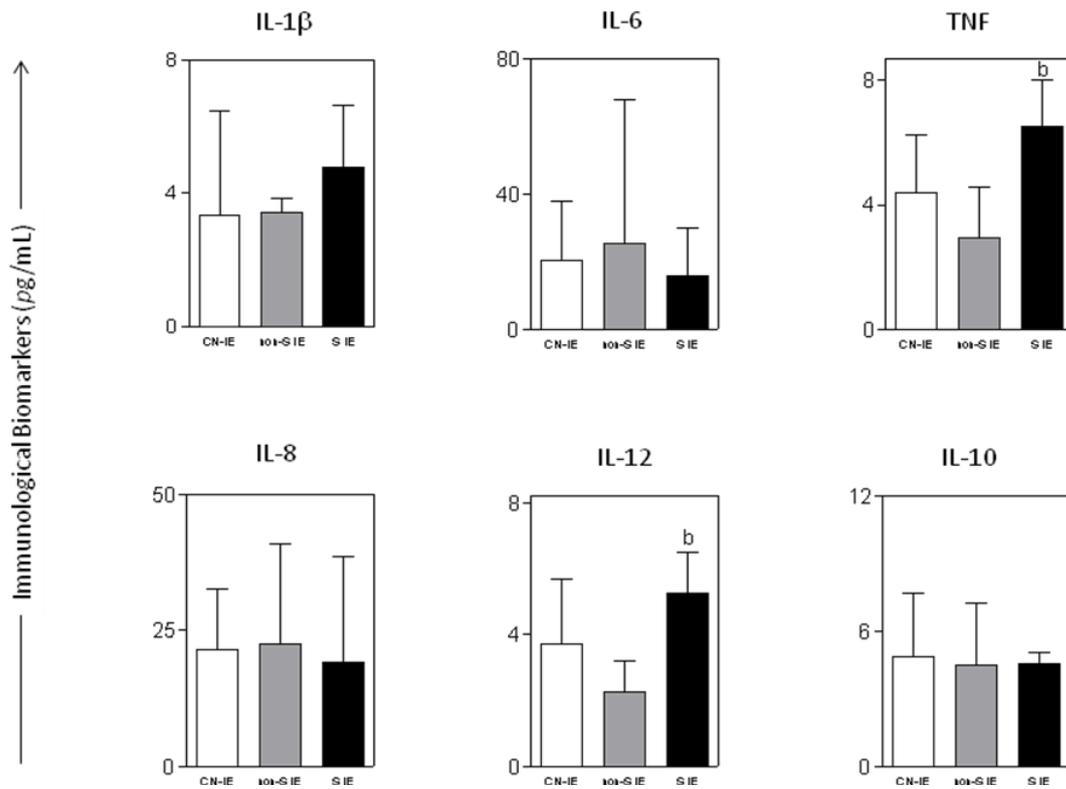
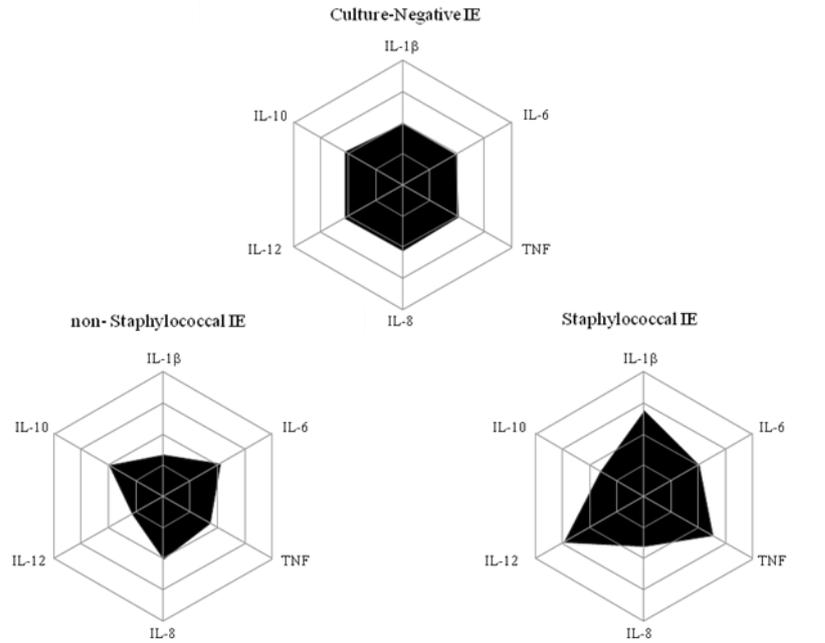


Figure 3- Serum concentrations of inflammatory cytokines in the patients with IE stratified according to the microorganisms



Legend: CN-IE: culture-negative IE; non-S IE: non-staphylococcal IE; S IE: staphylococcal IE; b: significant statistical difference (p < 0.05) between – staphylococcal IE and non-staphylococcal IE

Figure 4- Higher Producers of immunological biomarkers in IE subgroups



TABLES

Table 1: Baseline Characteristics of the Patients with IE

Variables	Value
Rheumatic Disease	32 (39.7)
Intracardiac Devices	22 (27.5)
Prosthetic valve	29 (35.8)
Mechanical prosthetic valve	5 (6.2)
Congenital Heart Disease	12 (15)
Prior IE	6 (7.5)
Degenerative valve disease	9 (11.4)
Diabetes Mellitus	7 (8.8)
Pharmacologic immune suppression	6 (7.5)

Chronic renal failure	10 (12.5)
Central Venous Cateter	6 (7.5)
Hepatic insufficiency	3 (3.8)
Laboratorial data	
Hemoglobin (g/dl)	10.1 ± 2.0
White blood cell count (x10 ³ /l)	13587.2 ± 6.959.5
C-reactive protein	111± 96.1
Etiologic agents	
Streptococci	10 (12.3)
<i>S.aureus</i>	6 (7.4)
coagulase-negative staphylococci	10 (12.3)
Enterococci	6 (7.4)
Echocardiographic findings	
Chordae rupture	7 (9.0)
Leaflet perforation	21 (26.9)
Abscess	10 (12.3)

Data are expressed as the mean value ± SD or number (percentage) of patients.

References

1. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, et al. (2009) Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J* 30(19): 2369-413.
2. Hoen B, Duval X. (2013) Infective endocarditis. *N Engl J Med* 369(8): 1425-1433.
3. Alter P, Hoeschen J, Ritter M, Maisch B. (2002) Usefulness of cytokines interleukin-6 and interleukin-2R concentrations in diagnosing active infective endocarditis involving native valves. *Am J Cardiol* 89(12): 1400-4.
4. Moreillon P, Que YA, Bayer AS. (2002) Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* 16(2): 297-318.
5. Nunes MC, Gelape CL, Ferrari TC. (2010) Profile of infective endocarditis at a tertiary care center in Brazil during a seven-year period: prognostic factors and in-hospital outcome. *Int J Infect Dis* 14(5): e394-8.
6. Tunkel AR, Kaye D. (1992) Endocarditis with negative blood cultures. *N Engl J Med* 326(18): 1215-7.
7. Jiang Y, Magli L, Russo M. (1999) Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. *Infect Immun* 67(5): 2125-30.
8. Nunes MCP, Araújo IR, Carvalho AT, Andrade LA, Resende MHC, Silva JLP, et al. (2013) Do cytokines play a role in predicting some features and outcome in infective endocarditis? *Advances in Infectious Diseases* 3(2): 115-9.
9. Kelso A. (1998) Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol* 76(4): 300-17.
10. Kern WV, Engel A, Schieffer S, Prummer O, Kern P. (1993) Circulating tumor necrosis factor alpha (TNF), soluble TNF receptors, and interleukin-6 in human subacute bacterial endocarditis. *Infect Immun* 61(12): 5413-6.
11. Capo C, Amirayan N, Ghigo E, Raoult D, Mege J. (1999) Circulating cytokine balance and activation markers of leucocytes in Q fever. *Clin Exp Immunol* 115(1): 120-3.
12. Capo C, Zaffran Y, Zugun F, Houpiqian P, Raoult D, Mege JL. (1996) Production of interleukin-10 and transforming growth factor beta by

peripheral blood mononuclear cells in Q fever endocarditis. *Infect Immun* 64(10): 4143-7.

13. Watkin RW, Harper LV, Vernallis AB, Lang S, Lambert PA, Ranasinghe AM, et al. (2007) Pro-inflammatory cytokines IL6, TNF-alpha, IL1beta, procalcitonin, lipopolysaccharide binding protein and C-reactive protein in infective endocarditis. *J Infect* 55(3): 220-5.
14. Rawczynska-Englert I, Hryniewiecki T, Dzierzanowska D. (2000) Evaluation of serum cytokine concentrations in patients with infective endocarditis. *J Heart Valve Dis* 9(5): 705-9.
15. Gouriet F, Bothelo-Nevers E, Coulibaly B, Raoult D, Casalta JP. (2006) Evaluation of sedimentation rate, rheumatoid factor, C-reactive protein, and tumor necrosis factor for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Vaccine Immunol* 13(2): 301.
16. Heinle S, Wilderman N, Harrison JK, Waugh R, Bashore T, Nicely LM, et al. (1994) Value of transthoracic echocardiography in predicting embolic events in active infective endocarditis. Duke Endocarditis Service. *Am J Cardiol* 74(8): 799-801.
17. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LeA, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. (2006) Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 146(1): 124-32.
18. Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai K, Bishop JE, et al. (1999) Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin Chem*. 45(9): 1693-4.
19. Tárnok A, Hamsch J, Chen R, Varro R. (2003) Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clin Chem* 49(6 Pt 1): 1000-2.
20. Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, Béguinot I, Bouvet A, Briançon S, et al. (2002) Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *JAMA* 288(1): 75-81.
21. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. (2013) Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm* . In press
22. Li L, Elliott JF, Mosmann TR. (1994) IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 153(9): 3967-78.

23. Capo C, Zugun F, Stein A, Tardei G, Lepidi H, Raoult D, et al. (1996) Upregulation of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in Q fever endocarditis. *Infect Immun* 64(5): 1638-42.
24. Trinchieri G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3(2): 133-46.
25. Kang BY, Kim TS. (2006) Targeting cytokines of the interleukin-12 family in autoimmunity. *Curr Med Chem* 13(10): 1149-56.
26. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? (2001) *Annu Rev Immunol* 19: 163-96.
27. Sims JE, Smith DE. (2010) The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 10(2): 89-102.
28. O'Garra A, Vieira P. (2007) T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7(6): 425-8.
29. Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. (2013) Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol* 4: 1-13. doi: 10.3389/fimmu.2013.00129

6 LIMITAÇÕES

O presente estudo foi conduzido em instituições hospitalares terciárias. A maior parte dos pacientes incluídos (93%) foi admitida no Hospital das Clínicas da UFMG, centro de referência para o qual são encaminhados com frequência pacientes já com indicação de abordagem cirúrgica devido a complicações da EI. Assim, a amostra foi constituída predominantemente por pacientes graves, o que pode restringir a generalização dos resultados.

O grupo controle formado por indivíduos saudáveis foi selecionado de maneira a assegurar que não houvesse diferença estatística entre os grupos em relação a sexo e idade. Assim, a média de idade desse grupo foi elevada (49.4 ± 18.7), o que torna possível a existência de doenças crônicas ou degenerativas não diagnosticadas, apesar da seleção ter sido realizada por meio de questionário específico (Apêndice D).

Finalmente, a prevalência de hemoculturas negativas foi alta (54%), o que pode ser consequência do uso de antibióticos previamente ao diagnóstico de EI. Este fato pode ser também explicado, pelo menos em parte, pelo emprego de técnicas inadequadas de coleta das amostras, apesar da padronização do sistema de coleta vigente nas instituições participantes.

7 PROPOSIÇÕES

- Há necessidade de estudos multicêntricos, incluindo maior número de pacientes com EI, para melhor definição do perfil de citocinas nessa doença e o potencial desses mediadores como ferramentas auxiliares para o diagnóstico e manejo da EI
- Avaliar a custo-efetividade da utilização das citocinas envolvidas com a resposta inflamatória como biomarcadores de atividade da EI

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo imune na EI é complexo, envolvendo vários componentes da resposta inflamatória que interagem de maneira diversa. A definição do papel das citocinas nesse cenário é um desafio. Embora o presente estudo não tenha explorado de modo direto a utilidade das citocinas envolvidas com a resposta inflamatória para o diagnóstico e manejo da EI, foi possível apresentar o perfil dessas citocinas no contexto da EI, comparando-o com as dosagens séricas desses mediadores em pacientes acometidos por outras infecções e em pacientes saudáveis. Os resultados obtidos fornecem subsídios para pesquisas adicionais, requeridas para melhor esclarecimento da potencialidade das citocinas envolvidas com a resposta inflamatória como biomarcadores na EI.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hoen B, Duval X. Infective endocarditis. *N Engl J Med* 2013;369(8):1425-1433.
2. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J* 2009;30(19):2369-413.
3. Braunwald E, Karchmer AW. Endocardite Infecçiosa. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E, editors. *Braunwald Tratado de Doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Elsevier Editora, 2010: 1713-33.
4. Gupta A, Kaul U, Varma A. Infective endocarditis in an Indian setup: Are we entering the 'modern' era? *Indian J Crit Care Med* 2013;17(3):140-7.
5. Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, Béguinot I, Bouvet A, Briançon S, et al. Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *JAMA* 2002;288(1):75-81.
6. Nunes MC, Gelape CL, Ferrari TC. Profile of infective endocarditis at a tertiary care center in Brazil during a seven-year period: prognostic factors and in-hospital outcome. *Int J Infect Dis* 2010;14(5):e394-8.
7. 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. *Clin Infect Dis* 2012;54(9):1230-9.

8. Bannay A, Hoen B, Duval X, Obadia JF, Selton-Suty C, Le Moing V, et al. The impact of valve surgery on short- and long-term mortality in left-sided infective endocarditis: do differences in methodological approaches explain previous conflicting results? *Eur Heart J* 2011;32(16):2003-15.
9. 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.
10. Chu VH, Woods CW, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Pappas PA, et al. Emergence of coagulase-negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. *Clin Infect Dis* 2008;46(2):232-42.
11. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Bolger AF, Levison ME, et al. Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America. *Circulation* 2005;111(23):e394-434.
12. Fournier PE, Thuny F, Richet H, Lepidi H, Casalta JP, Arzouni JP, et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin Infect Dis* 2010;51(2):131-40.
13. Veloso TR, Chaouch A, Roger T, Giddey M, Vouillamoz J, Majcherczyk P, et al. Use of a human-like low-grade bacteremia model of experimental endocarditis to study the role of *Staphylococcus aureus* adhesins and platelet aggregation in early endocarditis. *Infect Immun* 2013;81(3):697-703.
14. Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 2006;33(6):401-7.

15. 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-Pro prospective Cohort Study. *Arch Intern Med* 2009;169(5):463-73.
16. Thuny F, Di Salvo G, Disalvo G, Belliard O, Avierinos JF, Pergola V, et al. Risk of embolism and death in infective endocarditis: prognostic value of echocardiography: a prospective multicenter study. *Circulation* 2005;112(1):69-75.
17. Thuny F, Avierinos JF, Tribouilloy C, Giorgi R, Casalta JP, Milandre L, et al. Impact of cerebrovascular complications on mortality and neurologic outcome during infective endocarditis: a prospective multicentre study. *Eur Heart J* 2007;28(9):1155-61.
18. Duval X, Iung B, Klein I, Brochet E, Thabut G, Arnoult F, et al. Effect of early cerebral magnetic resonance imaging on clinical decisions in infective endocarditis: a prospective study. *Ann Intern Med* 2010;152(8):497-504.
19. Sachdev M, Peterson GE, Jollis JG. Imaging techniques for diagnosis of infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* 2002;16(2):319-37.
20. Bruun NE, Habib G, Thuny F, Sogaard P. Cardiac imaging in infectious endocarditis. *Eur Heart J* 2013. In press
21. Habib G. Management of infective endocarditis. *Heart* 2006;92(1):124-30.
22. Hill EE, Herijgers P, Claus P, Vanderschueren S, Peetermans WE, Herregods MC. Abscess in infective endocarditis: the value of transesophageal echocardiography and outcome: a 5-year study. *Am Heart J* 2007;154(5):923-8.

23. San Román JA, Vilacosta I, López J, Revilla A, Arnold R, Sevilla T, et al. Role of transthoracic and transesophageal echocardiography in right-sided endocarditis: one echocardiographic modality does not fit all. *J Am Soc Echocardiogr* 2012;25(8):807-14.
24. Herrera CJ, Mehlman DJ, Hartz RS, Talano JV, McPherson DD. Comparison of transesophageal and transthoracic echocardiography for diagnosis of right-sided cardiac lesions. *Am J Cardiol* 1992;70(9):964-6.
25. Greaves K, Mou D, Patel A, Celermajer DS. Clinical criteria and the appropriate use of transthoracic echocardiography for the exclusion of infective endocarditis. *Heart* 2003;89(3):273-5.
26. Lang RM, Tsang W, Weinert L, Mor-Avi V, Chandra S. Valvular heart disease. The value of 3-dimensional echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 2011;58(19):1933-44.
27. Snygg-Martin U, Gustafsson L, Rosengren L, Alsiö A, Ackerholm P, Andersson R, et al. Cerebrovascular complications in patients with left-sided infective endocarditis are common: a prospective study using magnetic resonance imaging and neurochemical brain damage markers. *Clin Infect Dis* 2008;47(1):23-30.
28. Bertagna F, Bisleri G, Motta F, Merli G, Cossalter E, Lucchini S, et al. Possible role of F18-FDG-PET/CT in the diagnosis of endocarditis: preliminary evidence from a review of the literature. *Int J Cardiovasc Imaging* 2012;28(6):1417-25.
29. Saby L, Laas O, Habib G, Cammilleri S, Mancini J, Tessonnier L, et al. Positron emission tomography/computed tomography for diagnosis of prosthetic valve endocarditis: increased valvular 18F-fluorodeoxyglucose uptake as a novel major criterion. *J Am Coll Cardiol* 2013;61(23):2374-82.

30. Ploux S, Riviere A, Amraoui S, Whinnett Z, Barandon L, Lafitte S, et al. Positron emission tomography in patients with suspected pacing system infections may play a critical role in difficult cases. *Heart Rhythm* 2011;8(9):1478-81.
31. Raoult D, Casalta JP, Richet H, Khan M, Bernit E, Rovey C, et al. Contribution of systematic serological testing in diagnosis of infective endocarditis *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5238-42.
32. Delahaye F, Rial MO, de Gevigney G, Ecochard R, Delaye J. A critical appraisal of the quality of the management of infective endocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1999;33(3):788-93.
33. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *Clin Infect Dis* 2005;41(11):1677-80.
34. 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. *Clin Infect Dis* 2000;30(4):633-8.
35. Bayer AS, Lam K, Ginzton L, Norman DC, Chiu CY, Ward JI. *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clinical, serologic, and echocardiographic findings in patients with and without endocarditis. *Arch Intern Med* 1987;147(3):457-62.
36. Bayer AS, Ward JI, Ginzton LE, Shapiro SM. Evaluation of new clinical criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Am J Med* 1994;96(3):211-9.
37. Prendergast BD. Diagnostic criteria and problems in infective endocarditis. *Heart* 2004;90(6):611-3.

38. Sexton DJ, Tenenbaum MJ, Wilson WR, Steckelberg JM, Tice AD, Gilbert D, et al. Ceftriaxone once daily for four weeks compared with ceftriaxone plus gentamicin once daily for two weeks for treatment of endocarditis due to penicillin-susceptible streptococci. Endocarditis Treatment Consortium Group. *Clin Infect Dis* 1998;27(6):1470-4.
39. Olaison L, Schadewitz K, Endocarditis SSoIDQASGf. Enterococcal endocarditis in Sweden, 1995-1999: can shorter therapy with aminoglycosides be used? *Clin Infect Dis* 2002;34(2):159-66.
40. Gavaldà J, Len O, Miró JM, Muñoz P, Montejo M, Alarcón A, et al. Brief communication: treatment of *Enterococcus faecalis* endocarditis with ampicillin plus ceftriaxone. *Ann Intern Med* 2007;146(8):574-9.
41. Cosgrove SE, Vigliani GA, Fowler VG, Abrutyn E, Corey GR, Levine DP, et al. Initial low-dose gentamicin for *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis is nephrotoxic. *Clin Infect Dis* 2009;48(6):713-21.
42. Morris AJ, Drinković D, Pottumarthy S, MacCulloch D, Kerr AR, West T. Bacteriological outcome after valve surgery for active infective endocarditis: implications for duration of treatment after surgery. *Clin Infect Dis* 2005;41(2):187-94.
43. Das I, Saluja T, Steeds R. Use of daptomycin in complicated cases of infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(6):807-12.
44. Fowler VG, Boucher HW, Corey GR, Abrutyn E, Karchmer AW, Rupp ME, et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 2006;355(7):653-65.
45. Kang DH, Kim YJ, Kim SH, Sun BJ, Kim DH, Yun SC, et al. Early surgery versus conventional treatment for infective endocarditis. *N Engl J Med* 2012;366(26):2466-73.

46. Tornos P, Iung B, Permanyer-Miralda G, Baron G, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, et al. Infective endocarditis in Europe: lessons from the Euro heart survey. *Heart* 2005;91(5):571-5.
47. Vilacosta I, Graupner C, San Román JA, Sarriá C, Ronderos R, Fernández C, et al. Risk of embolization after institution of antibiotic therapy for infective endocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(9):1489-95.
48. David TE, Gavra G, Feindel CM, Regesta T, Armstrong S, Maganti MD. Surgical treatment of active infective endocarditis: a continued challenge. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133(1):144-9.
49. Chan KL, Dumesnil JG, Cujec B, Sanfilippo AJ, Jue J, Turek MA, et al. A randomized trial of aspirin on the risk of embolic events in patients with infective endocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(5):775-80.
50. Van der Meer JT, Van Wijk W, Thompson J, Vandembroucke JP, Valkenburg HA, Michel MF. Efficacy of antibiotic prophylaxis for prevention of native-valve endocarditis. *Lancet* 1992;339(8786):135-9.
51. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, et al. Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2007;116(15):1736-54.
52. Roberts GJ. Dentists are innocent! "Everyday" bacteremia is the real culprit: a review and assessment of the evidence that dental surgical procedures are a principal cause of bacterial endocarditis in children. *Pediatr Cardiol* 1999;20(5):317-25.

53. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Citocinas. In: Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, editors. *Imunologia de Kuby*. Porto Alegre: Artmed, 2008: 331-54.
54. Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Propriedades Gerais das Respostas Imunes. In: Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011: 1-14.
55. Kelso A. Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol* 1998;76(4):300-17.
56. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 2007;37 Suppl 1:S34-45.
57. Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Ativação dos linfócitos T. In: Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011: 203-23.
58. Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Migração dos Leucócitos para os Tecidos. In: Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011: 37-53.
59. Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade inata. In: Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011: 55-88.
60. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3(9):745-56.
61. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2010;10(2):89-102.
62. Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* 2003;3(4):269-79.

63. Saenz SA, Noti M, Artis D. Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses. *Trends Immunol* 2010;31(11):407-13.
64. Khaled AR, Durum SK. Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2002;2(11):817-30.
65. Henson PM. Dampening inflammation. *Nat Immunol* 2005;6(12):1179-81.
66. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Imunidade inata. In: Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, editors. *Imunologia de Kuby*. Porto Alegre: Artmed, 2008: 76-97.
67. Geering B, Stoeckle C, Conus S, Simon HU. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol* 2013;34(8):398-409.
68. Du Clos TW. Pentraxins: Structure, Function, and Role in Inflammation. *ISRN Inflamm* 2013. In press.
69. Walczak H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev* 2011;244(1):9-28.
70. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001;19:163-96.
71. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm* 2013. In press.
72. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Ativação e migração de leucócitos. In: Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, editors. *Imunologia de Kuby*. Porto Alegre: Artmed, 2008: 367-77.

73. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519-50.
74. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 2008;223:20-38.
75. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005;23:1-21.
76. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990;8:253-78.
77. Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol* 2012;33(11):571-7.
78. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:199-219.
79. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005;175(6):3463-8.
80. Trinchieri G, Scott P. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. *Res Immunol* 1995;146(7-8):423-31.
81. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:495-521.
82. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(2):133-46.
83. Kang BY, Kim TS. Targeting cytokines of the interleukin-12 family in autoimmunity. *Curr Med Chem* 2006;13(10):1149-56.

84. Baggiolini M. Novel aspects of inflammation: interleukin-8 and related chemotactic cytokines. *Clin Investig* 1993;71(10):812-4.
85. Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med* 2005;33(12 Suppl):466S-467S.
86. Mukaida N, Matsumoto T, Yokoi K, Harada A, Matsushima K. Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-8 (IL-8). *Inflamm Res* 1998;47 Suppl 3:151-7.
87. Kraan MC, Patel DD, Haringman JJ, Smith MD, Weedon H, Ahern MJ, et al. The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). *Arthritis Res* 2001;3(1):65-71.
88. Campbell LM, Maxwell PJ, Waugh DJ. Rationale and Means to Target Pro-Inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)* 2013;6(8):929-59.
89. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-90.
90. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 2007;7(6):425-8.
91. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011;29:71-109.
92. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008;226:205-18.
93. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Tolerância Imunológica e Autoimunidade. In: Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011: 319-43.

94. Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol* 2013;4: 1-13. doi: 10.3389/fimmu.2013.00129.
95. Brown M, Griffin GE. Immune responses in endocarditis. *Heart* 1998;79(1):1-2.
96. Capo C, Zugun F, Stein A, Tardei G, Lepidi H, Raoult D, et al. Upregulation of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in Q fever endocarditis. *Infect Immun*. 1996;64(5):1638-42.
97. Jiang Y, Magli L, Russo M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. *Infect Immun* 1999;67(5):2125-30.
98. Chia JS, Lien HT, Hsueh PR, Chen PM, Sun A, Chen JY. Induction of cytokines by glucosyltransferases of streptococcus mutans. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(4):892-7.
99. Rawczynska-Englert I, Hryniewiecki T, Dzierzanowska D. Evaluation of serum cytokine concentrations in patients with infective endocarditis. *J Heart Valve Dis* 2000;9(5):705-9.
100. Banks J, Poole S, Nair SP, Lewthwaite J, Tabona P, McNab R, et al. Streptococcus sanguis secretes CD14-binding proteins that stimulate cytokine synthesis: a clue to the pathogenesis of infective (bacterial) endocarditis? *Microb Pathog* 2002;32(3):105-16.
101. Yeh CY, Chen JY, Chia JS. Glucosyltransferases of viridans group streptococci modulate interleukin-6 and adhesion molecule expression in endothelial cells and augment monocytic cell adherence. *Infect Immun* 2006;74(2):1273-83.

102. Toledo A, Nagata E, Yoshida Y, Oho T. Streptococcus oralis coaggregation receptor polysaccharides induce inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *Mol Oral Microbiol* 2012;27(4):295-307.
103. Ellmerich S, Djouder N, Scholler M, Klein JP. Production of cytokines by monocytes, epithelial and endothelial cells activated by Streptococcus bovis. *Cytokine* 2000;12(1):26-31.
104. Drake TA, Rodgers GM, Sande MA. Tissue factor is a major stimulus for vegetation formation in enterococcal endocarditis in rabbits. *J Clin Invest* 1984;73(6):1750-3.
105. Veltrop MH, Langermans JA, Thompson J, Bancsi MJ. Interleukin-10 regulates the tissue factor activity of monocytes in an in vitro model of bacterial endocarditis. *Infect Immun* 2001;69(5):3197-202.
106. Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Laabei M, Massey RC. Staphylococcus aureus extracellular adherence protein triggers TNF α release, promoting attachment to endothelial cells via protein A. *PLoS One* 2012;7(8):1-8.
107. Christiansen JG, Jensen HE, Jensen LK, Koch J, Aalbaek B, Nielsen OL, et al. Systemic inflammatory response and local cytokine expression in porcine models of endocarditis. *APMIS* 2013. In press
108. Bustamante J, Arevalo A, Tamayo E, Sarria C, Aguilar-Blanco EM, Heredia M, et al. Cytokine profiles linked to fatal outcome in infective prosthetic valve endocarditis. *APMIS* 2013. In press
109. Kern WV, Engel A, Schieffer S, Prummer O, Kern P. Circulating tumor necrosis factor alpha (TNF), soluble TNF receptors, and interleukin-6 in human subacute bacterial endocarditis. *Infect Immun* 1993;61(12):5413-6.

110. Capo C, Amirayan N, Ghigo E, Raoult D, Mege J. Circulating cytokine balance and activation markers of leucocytes in Q fever. *Clin Exp Immunol* 1999;115(1):120-3.
111. Capo C, Zaffran Y, Zugun F, Houpijian P, Raoult D, Mege JL. Production of interleukin-10 and transforming growth factor beta by peripheral blood mononuclear cells in Q fever endocarditis. *Infect Immun* 1996;64(10):4143-7.
112. Honstette A, Imbert G, Ghigo E, Gouriet F, Capo C, Raoult D, et al. Dysregulation of cytokines in acute Q fever: role of interleukin-10 and tumor necrosis factor in chronic evolution of Q fever. *J Infect Dis* 2003;187(6):956-62.
113. Ekdahl C, Broqvist M, Franzen S, Ljunghusen O, Maller R, Sander B. IL-8 and tumor necrosis factor alpha in heart valves from patients with infective endocarditis. *Scand J Infect Dis* 2002;34(10):759-62.
114. Alter P, Hoeschen J, Ritter M, Maisch B. Usefulness of cytokines interleukin-6 and interleukin-2R concentrations in diagnosing active infective endocarditis involving native valves. *Am J Cardiol* 2002;89(12):1400-4.
115. Watkin RW, Harper LV, Vernallis AB, Lang S, Lambert PA, Ranasinghe AM, et al. Pro-inflammatory cytokines IL6, TNF-alpha, IL1beta, procalcitonin, lipopolysaccharide binding protein and C-reactive protein in infective endocarditis. *J Infect* 2007;55(3):220-5.
116. Nunes MCP, Araújo IR, Carvalho AT, Andrade LA, Resende MHC, Silva JLP, et al. Do cytokines play a role in predicting some features and outcome in infective endocarditis? *Advances in Infectious Diseases* 2013;3(2):115-9.
117. Gouriet F, Bothelo-Nevers E, Coulibaly B, Raoult D, Casalta JP. Evaluation of sedimentation rate, rheumatoid factor, C-reactive protein, and tumor

necrosis factor for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(2):301.

118. Ozawa H, Toba M, Nakamoto M, Noma S, Ichiyama T, Takahashi H. Increased cytokine levels in a cerebral mycotic aneurysm in a child with Down's syndrome. *Brain Dev* 2005;27(6):434-6.
119. Cook EB, Stahl JL, Lowe L, Chen R, Morgan E, Wilson J, et al. Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics. *J Immunol Methods* 2001;254(1-2):109-18.
120. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. International Committee of Medical Journal Editors. *N Engl J Med* 1997;336(4):309-15.

10 APÊNDICES

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

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, como você, 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 pacientes acometidos por endocardite infecciosa no período de 2005 – 2013.

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 Dra. Izabella Rodrigues de Araújo , pelo telefone (31) 9951-5528, Prof^ª Dr^ª Maria do Carmo Pereira Nunes, pelo telefone (31)9951-0773 e Prof^ª Dr^ª 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, independentemente da minha participação ou não nessa pesquisa.

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

Data

DN: _____

RG: _____ CPF: _____ Tel: _____

Endereço:

Assinatura da testemunha (igual à do RG)

Data

Assinatura do médico

Data

Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

Endereço: Unidade Administrativa II (prédio da FUNDEP), 2º andar, sala 2005, BH-MG

CEP 31270-901 Telefone: 3409.4592

APÊNDICE B- Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos saudáveis

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 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 Dra. Izabella Rodrigues de Araújo , pelo telefone (31) 9951-5528, Profª Drª Maria do Carmo Pereira Nunes, pelo telefone (31)9951-0773 e Profª Drª 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, _____, 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.

APÊNDICE C- Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com suspeita não confirmada de EI ou síndromes febris de origem infecciosa, cuja causa seja diferente de EI

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 Dra. Izabella Rodrigues de Araújo , pelo telefone (31) 9951-5528, Prof^ª Dr^ª Maria do Carmo Pereira Nunes, pelo telefone (31)9951-0773 e Prof^ª Dr^ª 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.

APÊNDICE D- Questionário para seleção de controles saudáveis

Questionário Controles Saudáveis

Você, _____, está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa.

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 pacientes acometidos por endocardite infecciosa no período de 2005 – 2013. Serão também analisados dados clínicos e laboratoriais de indivíduos saudáveis, objetivando a comparação com as informações provenientes das análises dos pacientes doentes.

Caso você concorde em participar, solicitamos que você responda às questões a seguir. Estas perguntas permitirão saber se você pode ser classificado como controle saudável. Caso obtenha essa classificação e mantenha sua disposição em ser voluntário no projeto, é necessário que você assine o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo).

Perguntas

- 1) Você tem algum problema de saúde? ____ SIM ____ NÃO
Caso a resposta seja SIM, qual o problema de saúde? _____

Obs: Não poderão ser voluntários pacientes portadores de doenças inflamatórias, infecciosas ou imunossupressoras. Poderão ser voluntários os pacientes hipertensos, sem outras comorbidades descontroladas, com pressão controlada no momento presente

- 2) Você faz uso regular de medicamentos? ____ SIM ____ NÃO

Obs: poderão ser voluntários os pacientes sob uso de medicação para controle da pressão arterial e mulheres em uso de anticoncepcional

- 3) Você está com alguma infecção ou inflamação no momento ou esteve com alguma infecção ou inflamação nos últimos sete dias?
____ SIM ____ NÃO

- 4) Você foi submetido a alguma cirurgia nos últimos sete dias? ____ SIM ____ NÃO

- 5) Você foi submetido a algum tratamento dentário nos últimos sete dias?
____ SIM ____ NÃO

- 6) Você recebeu alguma vacina nos últimos sete dias? ____ SIM ____ NÃO

- 7) Você é tabagista, têm o hábito de beber bebida alcoólica diariamente ou faz uso de drogas ilícitas? _____SIM _____NÃO
- 8) Para mulheres: você está no período menstrual? _____SIM _____NÃO
- 9) Você teve hepatite após os 11 anos de idade? _____SIM _____NÃO
- 10) Você tem comportamento de risco para doenças sexualmente transmissíveis?
_____SIM _____NÃO

APÊNDICE E- Protocolo de coleta de dados

PROTOCOLO DO ESTUDO SOBRE ENDOCARDITE INFECCIOSA

IDENTIFICAÇÃO:

Data da coleta:

____/____/____

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

HISTÓRIA CLÍNICA:

Fatores Predisponentes Cardiovasculares						
Doença Reumática	1- Sim		2- Não		_	
	1- Mitrál	2- Aórtica	3- Mitro-Aórtica	4- Outras	5- Ignorado	_
Prolapso de Valva Mitrál	1- Sim		2- Não		_	
	1- Sem Regurgitação		2- Reg Leve	3- Moderado / Grave		_
Doença Valvar Degenerativa	1- Sim		2- Não		_	
	1- Aórtica		2- Mitrál		_	
Prótese Valvar	1- Sim		2- Não		_	
	1- Biológica		2- Mecânica		_	
	1- Mitrál		2- Aórtica	3- Mitro-Aórtica	4- Tricúspide	_
IM isquêmica	1- Sim		2- Não		_	
Tempo de implante da prótese (meses)					_	
Dispositivos	1- Marcapasso		2- CDI		3- Nenhum	_
Cardiopatia Congênita	1- Sim		2- Não		_	

Fatores Predisponentes Sistêmicos / Comorbidades					
Endocardite prévia	1- Sim		2- Não		_
HIV	1- Sim		2- Não		_
Uso de Droga	1- Sim		2- Não		_
Diabetes Mellitus	1- Sim		2- Não		_
Uso de Imunossupressores	1- Sim		2- Não		_
IRC	1- Sim		2- Não		_

Uso de Cateter Venoso Central	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>
Insuficiência Hepática	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>

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

Manifestações Clínicas					
Febre	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>	
	Duração da Febre Prévia: (Em Semanas)				
	Intensidade:				
Anorexia/Hiporexia	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>	
	Duração:			<input type="checkbox"/>	
Emagrecimento	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>	
	Quantidade de Massa Perdida em Kg:			<input type="checkbox"/>	
	Em Quanto Tempo:			<input type="checkbox"/>	
Sudorese	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>	
Evento Neurológico	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>	
	1-Isquêmico	2-Hemorrágico	3- Outra manifestação	<input type="checkbox"/>	
Evento Embólico	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>	
	1- Baço	2- Rim	3- Extremidade	4- Outros	<input type="checkbox"/>
Manif. Músculo-Esqueléticas	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>	
Manifestações Oculares	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>	
Sopro	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>	
Sinais Periféricos de Endocardite Infecciosa:					
Hemorragia Ungueal	1- Sim	2- Não		<input type="checkbox"/>	
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"/>	
Insuficiência Cardíaca	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"/>
Manifestação Clínica Inicial		1- Sim	2- Não	<input type="checkbox"/>
Qual? (Escrever uma das acima)				
Tempo Entre a Manifestação Clínica Inicial e o Diagnóstico:				
Critérios de Duke:	1- 2 maiores	2-1 maior e 3 menores	3- 5 menores	4-El possível (1>e1< ou 3<)

Exames Laboratoriais ao diagnóstico e durante evolução semanal					
Anemia	1- Sim	2- Não			<input type="checkbox"/>
Anemia (valor)					
Leucocitose	1- Sim	2- Não			<input type="checkbox"/>
Leucocitose global (valor)					
PCR (valor)					
VHS (valor)					
Fator Reumatóide	1- Positivo	2- Negativo			<input type="checkbox"/>
Urina Rotina Alterada	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	Descrever:				
Hemocultura	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					
Antibioticoterapia	1- Sim	2- Não			<input type="checkbox"/>
	Qual?				<input type="checkbox"/>
Cirurgia	1- Sim	2- Não	Data:		<input type="checkbox"/>
Crítérios de Indicação	1- Insuficiência Cardíaca	2- Infecção não Controlada	3- Embolia de Repetição	4- Outras (escrever)	<input type="checkbox"/>
Complicações na cirurgia	1- Morte	2 - Infecção	3 - AVC	4- Outras	<input type="checkbox"/>
Evolução durante internação	Escrever:				

Exame Anátomo-patológico:	Escrever:	
----------------------------------	-----------	--

Evolução Clínica / Complicações Após o Início do Tratamento			
Cardíacas	1- Sim	2- Não	_
Neurológicas	1- Sim	2- Não	_
Êmbolos Sistêmicos	1- Sim	2- Não	_
Febre Prolongada (>10 dias)	1- Sim	2- Não	_
Defervecência	Quantos Dias?		
Complicações intra-hospitalares: escrever			

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

Seguimento do paciente: 6 meses – 1 ano pós-alta			_
Contato:	Data:	Tempo pós-alta (meses)	_
Morte	Data:	Mecanismo:	_
Cirurgia	Sim	Não	_

11 ANEXOS

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

UFMG

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

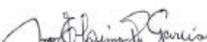
Parecer nº. ETIC 412/06

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

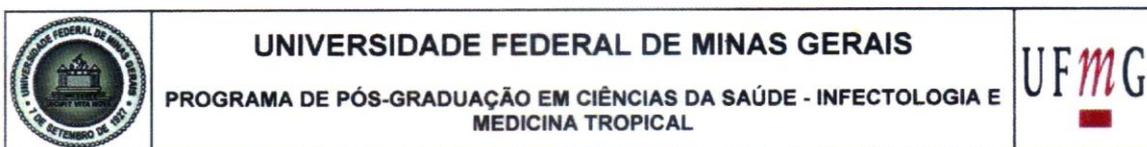
DECISÃO

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

ANEXO B – Cópia da ata da defesa



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA
IZABELLA RODRIGUES DE ARAÚJO**

Realizou-se, no dia 27 de fevereiro de 2014, às 14:00 horas, Sala 022, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **PERFIL DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA ENDOCARDITE INFECCIOSA**, apresentada por **IZABELLA RODRIGUES DE ARAÚJO**, número de registro 2012657111, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em medicina, à seguinte Comissão Examinadora: Prof^a. Maria do Carmo Pereira Nunes - Orientadora (UFMG), Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari - Coorientadora (UFMG), Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior (UFMG), Prof^a. Walderez Ornelas Dutra (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

- Aprovada
 Reprovada

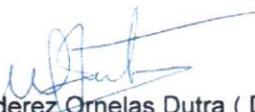
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2014.


Prof^a. Maria do Carmo Pereira Nunes (Doutor)

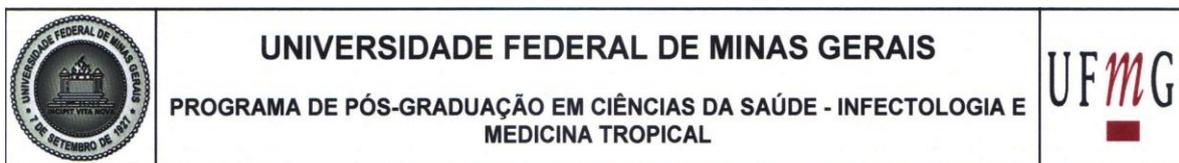

Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari (Doutor)


Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior (Doutor)


Prof^a. Walderez Ornelas Dutra (Doutora)

CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

ANEXO C – Declaração de aprovação



FOLHA DE APROVAÇÃO

PERFIL DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA ENDOCARDITE INFECCIOSA

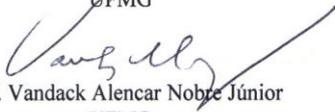
IZABELLA RODRIGUES DE ARAÚJO

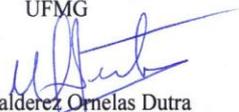
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, como requisito para obtenção do grau de Mestre em medicina, área de concentração INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Aprovada em 27 de fevereiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof.ª Maria do Carmo Pereira Nunes - Orientador
UFMG


Prof.ª Teresa Cristina de Abreu Ferrari - Coorientadora
UFMG


Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior
UFMG


Prof. Walderez Ornelas Dutra
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2014.