

Marcos Gradim Tiveron

**Estudo biomolecular de produtos de *Chlamydophila pneumoniae*,
Mycoplasma pneumoniae e *Borrelia burgdorferi* na etiopatogenia da
degeneração mixomatosa da valva mitral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Pablo Maria Alberto
Pomerantzeff

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tiveron, Marcos Gradim

Estudo biomolecular de produtos de *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* na etiopatogenia da degeneração mixotamposa da valva mitral / Marcos Gradim Tiveron. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Pablo Maria Alberto Pomerantzeff.

Descritores: 1.Valva mitral 2.*Borrelia burgdorferi* 3.*Mycoplasma pneumoniae*
4.*Chlamydomphila pneumoniae* 5.Metaloproteinase 9 da matriz/metabolismo
6.Mixoma/patologia 7.Mixoma/metabolismo 8.Prolapso da valva mitral
9.Insuficiência da valva mitral

USP/FM/DBD-374/15

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, João Luiz Tiveron e Célia Regina Gradim Tiveron, a minha esposa Rejane e aos meus filhos Vitor e Manuela. Pessoas importantíssimas na minha vida e que me forneceram o combustível necessário para cumprir esta jornada. São minha origem, meu presente e meu futuro.

Aos meus avós, que sempre me incentivaram a seguir uma vida de estudos para me formar médico e cirurgião.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Pablo Maria Alberto Pomerantzeff, pela recepção, pelos conselhos, pelo apoio, por me ensinar os detalhes da cirurgia cardíaca e por acreditar em meu trabalho. Minha admiração pela pessoa e pelo cirurgião que o senhor é, começou na primeira semana da residência e perdura até os dias de hoje.

Muito obrigado por me orientar nesta tese.

À Profa. Dra. Maria De Lourdes Higuchi, pela essencial co-orientação, pela paciência de me ensinar e me explicar as minúcias da histologia e da microbiologia. Através do seu imenso conhecimento esta tese saiu do papel e nos trouxe resultados.

Agradecimientos

À Deus, que sempre me trouxe saúde, iluminou e protegeu meu caminho. Agradeço por ter me dado a sabedoria necessária para tomar as decisões corretas e para seguir pelos caminhos certos na vida. Agradeço por guiar minhas mãos durante minhas cirurgias.

À Nossa Senhora Aparecida, agradeço pela força e pela saúde. Obrigado pela proteção durante minhas viagens e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu pai, meu grande professor. Que com suas poucas palavras, mas seus grandes gestos me ensinou os valores da vida e me mostrou o dom da medicina. Você é o meu grande ídolo. Muito obrigado.

À minha mãe. Muito obrigado por seu amor incondicional, pela educação, pelos conselhos, proteção e pelo imenso apoio nestes anos da minha vida. Você é muito especial para mim.

À minha esposa Rejane. Agradeço pela sua companhia e pelo seu amor. Sem você eu não teria conseguido iniciar e terminar este trabalho. Com sua força e coragem você me deu tranquilidade para me ausentar durante minhas vindas a São Paulo. Me incentiva e me apoia sempre que preciso. Obrigado.

Aos meus irmãos Fábio e Thaís. Obrigado pelas palavras de incentivo e pela presença de vocês em minha vida. Nossa união é a nossa força.

Ao meu sogro, Reginaldo. Obrigado por ser uma excelente referência na vida e no academicismo. À minha sogra, Angela, pela sua preciosa ajuda quando estive fora de casa e pelas palavras de incentivo. Agradeço a vocês por permitirem que eu fizesse parte de vossa família.

Ao Dr. Rubens Tofano de Barros, meu mentor na cirurgia cardíaca. Obrigado pelos ensinamentos, pelo apoio, pelo incentivo à seguir com meu sonho de me tornar cirurgião cardíaco e por ter me dado a oportunidade de retornar à Marília.

À banca de qualificação, Prof. Dr. Luís Alberto Oliveira Dallan, Prof. Dr. Flávio Tarasouth e Dr. Carlos Manuel de Almeida Brandão. Obrigado pelas sugestões e críticas construtivas, pois sem dúvida melhoraram a qualidade científica da tese.

Aos Professores Noedir Groppo Stolf, Fábio Biscegli Jatene, Luiz Boro Puig, Carlos Manuel de Almeida Brandão, Fábio Antônio Gaiotto, Luis Alberto Oliveira Dallan, Luiz Augusto Ferreira Lisboa, Alexandre Ciappina Hueb, Ricardo Ribeiro Dias e Marcelo Biscegli Jatene. Obrigado pela amizade, pelo incentivo a pesquisa e por terem feito parte da minha formação cirúrgica. Em cada cirurgia que faço lembro de alguma lição passada por vocês.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira. Agradeço pela acessibilidade e amizade que permitiram importantes orientações e sugestões para a construção da tese.

Ao Prof. Dr. Alfredo Inácio Fiorelli e ao Dr. Omar Asdrúbal Vilca Mejía, pelo incentivo à pesquisa e escrita de trabalhos científicos. Obrigado pela amizade e pela ajuda na elaboração de artigos científicos.

À Marcia Martins Reis, minha imensa gratidão pela sua importante ajuda na condução deste trabalho. À equipe do Laboratório de Patologia Cardíaca, Suely, Joyce, Renata e Shérrira. Obrigado pelo apoio na preparação e análise das lâminas. À Jaqueline, obrigado pela preciosa ajuda com a microscopia eletrônica.

À toda equipe do CCCM (Centro de Cirurgia Cardíaca de Marília), Eraldo, Sérgio, Elaine, Helton, Érica, Rafael e Carol, pelo companheirismo e pela força do trabalho em equipe.

À Joana Oleiro, pela paciência em me ajudar a superar os obstáculos deste percurso.

À Adriana Quadros, pela grandiosa colaboração na diagramação da tese.

À toda equipe da pós-graduação, Neusa, Juliana, Valdecira e Mônica, pelas orientações e ajuda para a materialização da tese.

À Faculdade de Medicina da Universidade de Marília (UNIMAR), que me formou médico e me forneceu as primeiras ferramentas para seguir nesta profissão. À Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), que me ensinou os primeiros passos da carreira de cirurgião. Ao Hospital Santa Marcelina - São Paulo, que me formou um cirurgião geral e permitiu que eu alcançasse voos mais altos. Ao InCor-HCFMUSP, que despertou e lapidou meu interesse pela ciência e

me forneceu toda a estrutura teórico-prática para me formar um cirurgião cardíaco.

Ao Dr. Fred Ellinger, que permitiu e me ajudou na coleta das valvas no Serviço de Verificação de Óbito. Aos técnicos do SVO, Wagner e Geraldo, que me auxiliaram nas coletas das valvas. Muito obrigado pela sua preciosa ajuda.

À Creusa Dal Bó, pela excelente revisão estatística.

À FAPESP, por acreditar no projeto e possibilitar o suporte financeiro para aquisição dos materiais.

O sucesso só é alcançado quando se tem perseverança, dedicação, paciência e muito trabalho.

Epigráfe

“Deus marcou o tempo certo para cada coisa... Confie...”

Eclesiastes 3:11

“Nada resiste ao trabalho”

Prof. Dr. Euriclides Jesus Zerbine

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE GRÁFICOS	
RESUMO	
SUMMARY	
1 INTRODUÇÃO	1
2 ASPECTOS GERAIS DA LITERATURA	6
2.1 Anatomia e histologia da valva mitral.....	8
2.2 Aspectos microscópicos da degeneração mixomatosa.....	8
2.3 Desequilíbrio autonômico e alterações genéticas.....	11
2.4 Ação das metaloproteinases.....	12
2.5 Ação de agentes infecciosos.....	13
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Primário.....	18
3.2 Objetivo Secundário.....	18
4 MÉTODOS	19
4.1 Desenho da pesquisa.....	20
4.2 Ambientação da pesquisa.....	20
4.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	21
4.4 Procedimentos cirúrgicos e analíticos.....	22
4.5 Análise estatística dos dados.....	29
5 RESULTADOS	31
5.1 Análise histológica pelo Movat.....	32
5.2 Análise histoquímica do CD20.....	34
5.3 Análise histoquímica do CD45.....	36
5.4 Análise histoquímica do CD68.....	37
5.5 Análise histoquímica da <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	40
5.6 Análise da hibridização <i>in situ</i> da <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	42
5.7 Análise histoquímica da <i>Borrelia burgdorferi</i>	43
5.8 Análise histoquímica do MMP9.....	47
5.9 Análise das correlações entre antígenos bacterianos versus células	50

	inflamatórias versus MMP-9.....	
5.10	Análise da microscopia eletrônica.....	52
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	66
8	ANEXOS	68
8.1	Aprovação da CAPPesq.....	69
8.2	Termo de Consentimento – InCor.....	70
8.3	Termo de Consentimento – SVO.....	73
8.4	Protocolo de Imunohistoquímica.....	76
8.5	Protocolo de Hibridização <i>in situ</i>	77
8.6	Análise histológica pela técnica de H&E.....	78
8.7	Quantificação das análises histológicas da degeneração mixomatosa, das células inflamatórias e dos antígenos bacterianos.....	79
8.8	Protocolo da Microscopia eletrônica.....	87
8.9	Quantificação dos antígenos de <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> e MMP9 na comparação entre o grupo DM e o grupo controle contendo apenas os casos associados à doença cardiovascular.....	88
9	REFERÊNCIAS	89

ATP:	Adenosina Trifosfato
Bb:	Borrelia burgdorferi
CAPPesq:	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Cp:	Chlamydomphila pneumoniae
DM:	Degeneração Mixomatosa
DAB:	3,3' Diamino benzidina
FE:	Fração de Ejeção
FAMEMA:	Faculdade de Medicina de Marília
H&E:	Hematoxilina e Eosina
HC-FMUSP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIS:	Hibridização in situ
InCor:	Instituto do Coração
IM:	Insuficiência Mitral
IC:	Insuficiência Cardíaca
IQ:	Imunohistoquímica
ME:	Microscopia eletrônica
MMP:	Metaloproteinase
Mp:	Mycoplasma pneumoniae
PVM:	Prolapso da Valva Mitral
PCR:	Polymerase Chain Reaction
SVO:	Serviço de Verificação de Óbitos
USP:	Universidade de São Paulo
VE:	Ventrículo Esquerdo
/:	Símbolo correspondente à operação matemática de divisão
%:	Porcentagem
mm:	Milímetros
µm:	Micrômetro

µl:	Microlitros
OC:	Graus Celsius
TA:	Temperatura Ambiente
ng:	Nanogramas
PBS:	Phosphate Buffer Sulphate

	Pag.
Figura 1. Visão macroscópica da valva mitral com degeneração mixomatosa.....	3
Figura 2 Diagrama da patogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral.....	4
Figura 3 Histologia da valva mitral normal e com degeneração mixomatosa.....	9
Figura 4 Identificação de célula valvar intersticial.....	10
Figura 5 Detalhes da coleta do segmento valvar e das áreas analisadas.....	24
Figura 6 Análise histoquímica das células CD20.....	35
Figura 7 Análise histoquímica das células CD45.....	37
Figura 8 Análise histoquímica das células CD68.....	38
Figura 9 Análise histoquímica dos antígenos da <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	41
Figura 10 Análise histoquímica dos antígenos da <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	43
Figura 11 Análise histoquímica dos antígenos da <i>Borrelia burgdorferi</i>	45
Figura 12 Análise histoquímica dos antígenos da metaloproteinase MMP9...	50
Figura 13 Identificação bacteriana pela microscopia eletrônica de transmissão.....	52
Figura 14 Características da <i>borrelia</i> pela microscopia eletrônica de transmissão.....	54
Figura 15 Diagrama modificado da patogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral.....	64

	Pag.
Tabela 1. Anticorpos utilizados.....	25
Tabela 2 Características dos pacientes com valva mitral mixomatosa.....	27
Tabela 3 Características dos pacientes do grupo controle.....	29
Tabela 4 Quantificação de degeneração mixomatosa pelo Movat.....	32
Tabela 5 Medida da espessura valvar pelo Movat.....	33
Tabela 6 Quantificação de células CD20.....	35
Tabela 7 Quantificação de células CD45.....	36
Tabela 8 Quantificação de células CD68.....	38
Tabela 9 Quantificação dos antígenos de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	41
Tabela 10 Quantificação dos antígenos de <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	42
Tabela 11 Quantificação dos antígenos de <i>Borrelia burgdorferi</i>	44
Tabela 12 Quantificação dos antígenos de metaloproteinase MMP9.....	48
Tabela 13 Correlações entre antígenos bacterianos versus células inflamatórias versus MMP-9 nos grupos 1 e 2.....	51
Tabela 14 Medida do tamanho dos microrganismos identificados pela ME.....	53

	Pag.
Gráfico 1 Porcentagem de degeneração mixomatosa na área 1 e área 2 dos grupos 1 e 2.....	33
Gráfico 2 Medida da espessura valvar em mm na área 1 e área 2 dos grupos 1 e 2.....	34
Gráfico 3 Quantidade de células inflamatórias CD20, CD45 e CD68, detectadas na área 1 dos grupos 1 e 2.....	39
Gráfico 4 Quantidade de células inflamatórias CD20, CD45 e CD68, detectadas na área 2 dos grupos 1 e 2.....	40
Gráfico 5 Número de antígenos das bactérias <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydophila pneumoniae</i> e <i>Borrelia burgdorferi</i> detectados na área 1 dos grupos 1 e 2.....	46
Gráfico 6 Número de antígenos das bactérias <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydophila pneumoniae</i> e <i>Borrelia burgdorferi</i> detectados na área 2 dos grupos 1 e 2.....	47
Gráfico 7 Número de antígenos de MMP9 detectados nas áreas 1 e 2 dos grupos 1 e 2.....	49

Resumo

Tiveron MG. Estudo biomolecular de produtos de *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* na etiopatogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução e Objetivo: A etiologia da degeneração mixomatosa (DM) da valva mitral ainda não está totalmente esclarecida e pode ser dependente do tempo ou de prováveis fatores ambientais, onde a interação de agentes infecciosos ainda não foi descrita. O objetivo deste estudo é a análise dos produtos dos patógenos da *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* em segmentos de cúspide retirados da valva mitral com degeneração mixomatosa, comparada ao grupo controle e a relação dos produtos bacterianos com aumento de marcadores inflamatórios (CD20, CD45, CD68) e de metaloproteinase (MMP9) na etiopatogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral. **Método:** Analisamos 2 grupos contendo 20 pacientes cada e divididos em grupo 1, composto por fragmentos de tecido valvar mitral com diagnóstico de degeneração mixomatosa e grupo 2, formado por segmentos de valvas mitrais normais. Foram realizadas colorações de hematoxilina e eosina e Movat para diagnóstico histológico da degeneração mixomatosa e técnica de imunohistoquímica para detecção de antígenos da *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae*, mediadores inflamatórios (CD20, CD45, CD68) e marcadores de metaloproteinase (MMP9). A presença de antígenos da *Chlamydomphila pneumoniae* foi pesquisada pela técnica de hibridização *in situ*. A pesquisa de elementos bacterianos foi feita através de microscopia eletrônica de transmissão. **Resultados:** Houve um maior número de células CD20 positivas/mm² no grupo com DM com mediana igual a 17,8 (6,7 - 27,9) x 4,6 (3,6 - 9,8) com p = 0,007 para a área 1. Houve maior número de células CD45 positivas/mm² no grupo com DM com mediana igual a 17,3 (3,4 - 92,5) x 2,8 (1,4 - 10,1) com p = 0,008 para a área 1. Houve maior número de células CD68 positivas/mm² no grupo controle (G2), porém sem significância estatística com mediana igual a 38,7 (26,6 - 81,8) x 70 (42,7 - 120,4) com p = 0,098 para a área 1. Em relação à presença de antígenos de *Mycoplasma pneumoniae*, houve uma maior área (µm²) de antígenos detectados no grupo 1, quando comparadas com o grupo 2 com diferença estatisticamente significativa para as duas áreas. Na área 1, mediana de 180.993 (24.856 - 387.477) x 7.970 (2.736 - 15.992) com p < 0,001 e na área 2,

mediana igual a 105.968 (2.503 - 416.585) x 7.190 (3.314 - 17.833) com $p = 0,02$. A análise da presença de antígenos de *Chlamydomphila pneumoniae* demonstrou que em ambas as áreas, houve uma maior área (μm^2) de antígenos detectados no grupo de valvas com degeneração mixomatosa, quando comparadas com o grupo controle, porém sem diferença estatística com mediana para o G1 de 9.905 (4.716 - 16.912) x 5.864 (2.382 - 8.692) com $p = 0,2$ e para o G2, mediana de 3.199 (1.791 - 10.746) x 2.536 (683 - 6.125) com $p = 0,3$. Em relação à presença de antígenos de *Borrelia burgdorferi*, houve uma maior área (μm^2) de antígenos detectados no grupo 2 em relação ao grupo 1, em ambas as áreas. Na área 1, mediana de 7.596 (3.203 - 13.519) x 10.584 (7.223 - 15.974) com $p = 0,14$ e na área 2, mediana igual a 5.991 (3.009 - 8.475) x 8.403 (1.626 - 27.887) com $p = 0,47$. Em relação à presença da metaloproteínase MMP9, observamos maior área (μm^2) de antígeno marcado de MMP9 no grupo com degeneração mixomatosa tanto na área 1 quanto na área 2, com diferença estatística significativa. Na área 1, mediana de 503.894 (202.428 - 938.072) x 269.244 (111.953 - 354.022) com $p = 0,03$. Na área 2, houve diferença estatística representada pela mediana de 389.844 (214.459 - 679.711) x 144.397 (29.894 - 247.453) com $p < 0,001$. No grupo DM houve correlação positiva entre *Borrelia burgdorferi* e porcentagem de DM com $R = 0,52$ e $p = 0,018$. Houve correlação positiva entre CD45 e *Mycoplasma pneumoniae* com $R = 0,51$ e $p = 0,02$ e entre a MMP9 e *Mycoplasma pneumoniae* com $R = 0,45$ e $p = 0,04$. Estas correlações estiveram ausentes no grupo controle. **Conclusões:** Houve associação de agentes infecciosos *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* na etiopatogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral. Houve relação positiva entre o marcador inflamatório CD45 e a metaloproteínase (MMP9) apenas com a *Mycoplasma pneumoniae*, nas valvas com degeneração mixomatosa. O marcador inflamatório CD68 foi encontrado em maior número no grupo controle.

Descritores: valva mitral, mixomatosa, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, metaloproteínases, marcadores inflamatórios, prolapso da valva mitral.

Summary

Tiveron MG. *A biomolecular study on Chlamydophila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae and Borrelia burgdorferi products in myxoid mitral valve degeneration etiopathogenesis* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Background: The etiology of myxomatous mitral valve degeneration (MVD) is not fully understood and may depend on time or environmental factors for which the interaction of infectious agents has not been documented.

The purpose of this study is the analysis of the pathogens products of *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Borrelia burgdorferi* in removed cusp segments of the mitral valve with myxoid degeneration, compared to the control group and the ratio of bacterial products with increased inflammatory markers (CD20, CD45, CD68) and metalloproteinase (MMP9) in the pathogenesis of myxomatous degeneration of the mitral valve. **Method:** Observational, analytical, case-control study which analyzed 2 groups of 20 patients each and divided in group 1, consisting of fragments of mitral valve tissue with diagnosis of myxomatous degeneration and group 2, formed by segments of normal mitral valves. Hematoxylin and eosin and Movat stains were done for histological diagnosis of myxoid degeneration and immunohistochemical technique for the detection of *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae* antigens, inflammatory mediators (CD20, CD45, CD68) and markers of metalloproteinase (MMP9). The presence of *Chlamydophila pneumoniae* antigens was verified through an *in situ* hybridization technique. The research of bacterial elements was performed by a transmission electron microscopy. **Results:** There was an increased number of CD20 cells/mm² in myxomatous degeneration group (G1) with a median of 17.8 (6.7 - 27.9) x 4.6 (3.6 - 9.8) with p = 0.007 for the area 1. There was a higher number of CD45 cells/mm² in myxomatous degeneration group (G1) with a median of 17.3 (3.4 - 92.5) x 2.8 (1.4 - 10.1) with p = 0.008 for the area 1. There was a higher number of CD68 cells/mm² in control group (G2) without a statistically significant difference, with a median of 38.7 (26.6 - 81.8) x 70 (42.7 - 120.4) with p = 0,098 for the area 1. In quantifying *Mycoplasma pneumoniae* we observed a higher area (µm²) antigen marked by, there was a higher amount of antigen detected in myxomatous degeneration group. In area 1, a median of 180,993 (24,856 - 387,477) x 7,970 (2,736 - 15,992) with p < 0.001 and in area 2, a median of 105,968 (2,503 - 416,585) x 7,190 (3,314 - 17,833) with p = 0.02. The analysis of the

presence of *Chlamydophila pneumoniae* antigens showed that in both area, there was a larger area (μm^2) antigens detected in the group of valves with MD when compared with the control group, but without significant differences with median for the G1 of 9,905 (4,716 - 16,912) x 5,864 (2,382 - 8,692), with $p = 0.2$ and the G2, median 3,199 (1,791 - 10,746) x 2,536 (683 - 6,125) with $p = 0.3$. Regarding the presence of *Borrelia burgdorferi* antigens, there was a greater area (μm^2) antigens detected in group 2 than in group 1, in both areas. In one area, median 7,596 (3,203 - 13,519) x 10,584 (7,223 - 15,974), with $p = 0.14$ and in area 2, a median of 5,991 (3,009 - 8,475) x 8,403 (1,626 - 27,887) with $p = 0.47$. Regarding the presence of metalloproteinase MMP9, we observed a higher area (μm^2) antigen marked by MMP9 in the group with MD both in area 1 and area 2, with statistically significant difference. In area 1, median of 503,894 (202,428 - 938,072) x 269,244 (111,953 - 354,022), $p = 0.03$. In area 2, median 389,844 (214,459 - 679,711) x 144,397 (29,894 - 247,453) with $p < 0.001$. In the DM group there was a positive correlation between *Borrelia burgdorferi* and the percentage of MD with $R = 0.52$ and $p = 0.018$. There was a positive correlation between CD45 and *Mycoplasma pneumoniae* with $R = 0.51$ and $p = 0.02$ and MMP9 with *Mycoplasma pneumoniae* with $R = 0.45$ and $p = 0.04$. These correlations were absent in the control group. **Conclusions:** There was an association of infectious agents *Mycoplasma pneumoniae* and *Borrelia burgdorferi* in etiopathogeny of myxoid degeneration of the mitral valve. There was a positive relationship between the inflammatory marker CD45 and metalloproteinase (MMP9) only with *Mycoplasma pneumoniae*. The inflammatory marker CD68 was found in greater numbers in the control group.

Descriptors: mitral valve, myxomatous, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, metalloproteinases, inflammatory markers, mitral valve prolapse.

1 Introdução

Em 1960, John B. Barlow reconheceu, pela primeira vez, através da cineangiografia ventricular esquerda, a origem do sopro mitral sistólico frequentemente associado com “click” [1]. Posteriormente Criley denominou esta alteração como prolapso da valva mitral (PVM), cuja principal característica é o abaulamento de um segmento valvar para dentro do átrio esquerdo durante a sístole ventricular [2]. O prolapso da valva mitral tem como substrato anatômico a degeneração mixomatosa (DM) que afeta a matriz valvar.

A degeneração mixomatosa se caracteriza por apresentar uma anormalidade estrutural da valva mitral, que resulta de um defeito no colágeno que compõe a matriz valvar e leva a um alongamento das cordas tendíneas e ao espessamento das cúspides, tornando-as mais redundantes [2-4]. A valva tipicamente mixomatosa se apresenta como uma estrutura frouxa, com folhetos grosseiros, espessados e redundantes, com área total aumentada com aspecto de concha ou cúpula (Figura 1). O segmento mais afetado é a região intermediária da cúspide posterior (1/3 médio da cúspide posterior), porém pode haver comprometimento de ambas as cúspides, associadas ou não.

A DM ocorre pelo comprometimento da matriz valvar, devido à alteração em sua composição tecidual provocada pelo desequilíbrio na quantidade de ácidos mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicanos, havendo um acúmulo de glicosaminoglicanos na camada esponjosa [5,6].

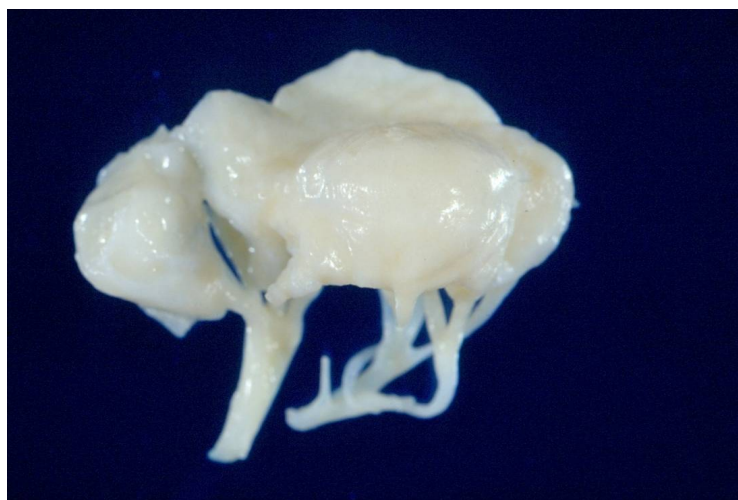


Figura 1 – Visão Macroscópica da valva mitral com degeneração mixomatosa. Fotografia cedida pela Prof. Dra. Vera Demarchi Aiello.

A degeneração mixomatosa é a patologia mais frequente da valva mitral nos países desenvolvidos. Com a evolução tecnológica da ecocardiografia, principal método diagnóstico, sua prevalência na população geral é estimada entre 2 e 3 %, e está igualmente distribuída entre homens e mulheres [7]. No Brasil, em estudo publicado pelo grupo de cirurgia valvar do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC/FMSUP), a degeneração mixomatosa representou cerca de 25,9% da etiologia em um grupo de pacientes submetidos à plástica da valva mitral [8].

Sua etiologia ainda não está totalmente esclarecida, podendo ocorrer em formas familiares com transmissão autossômica dominante de penetrância variável, que pode ser dependente do tempo ou de prováveis fatores ambientais ou hábitos corporais como baixo índice de massa corporal [3,9] (Figura 2). Além disso, o desequilíbrio autonômico das terminações nervosas valvares e a ação das metaloproteinases na degradação do colágeno podem contribuir para acentuar a degeneração da matriz valvar.

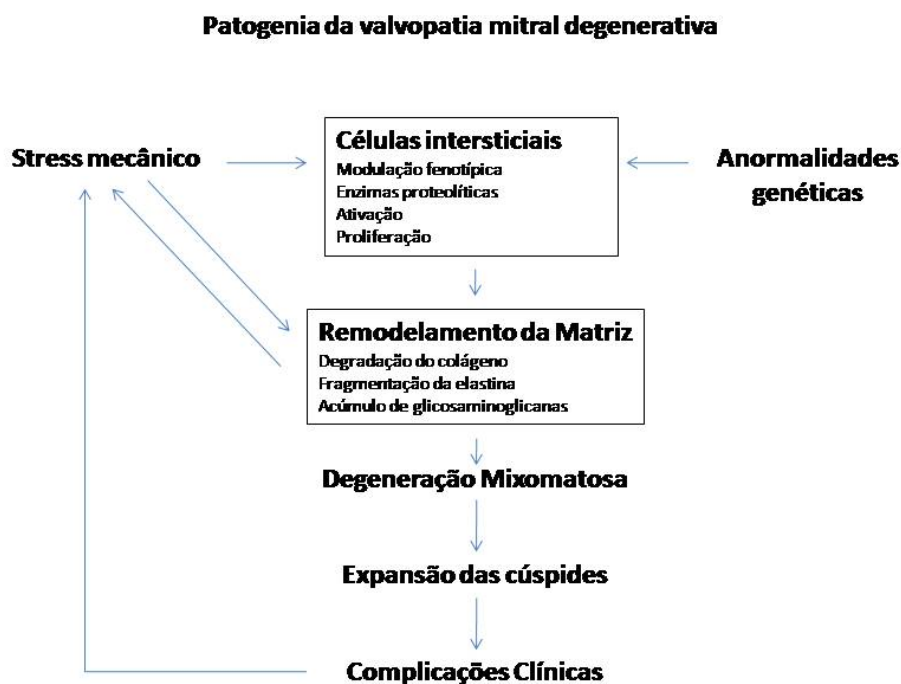


Figura 2 – Diagrama da patogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral. Adaptado de Rabkin et al. [23].

Dentre os fatores ambientais, a participação de agentes infecciosos na gênese da DM, etiologia ainda não descrita na literatura, pode de alguma forma contribuir para o aumento do grau da inflamação valvar e de degradação do colágeno. A presença de bactérias em simbiose se associa à formação de lesão ao tecido. Na placa de ateroma, a participação das bactérias *Mycoplasma pneumoniae* (Mp) e *Chlamydomphila pneumoniae* (Cp), levou à proliferação de ambas, com inflamação, degradação do colágeno e formação da placa vulnerável [10,11]. Na valva aórtica, a proliferação de *Chlamydomphila pneumoniae* e de *Mycoplasma*

pneumoniae se associou à calcificação do tecido, com consequente estenose da valva aórtica [12,13].

Neste mesmo estudo que mostrou a participação de microrganismos no desenvolvimento de doenças crônicas inflamatórias, degenerativas e consumptivas, fazendo uma comparação entre várias doenças valvares, incluindo o prolapso da valva mitral, observou-se, por meio da microscopia eletrônica, uma alta incidência de formas de *Borrelia burgdorferi* (Bb). (informação verbal¹).

Este trabalho abordou de forma geral a presença de agentes infecciosos nesta patologia e a possível participação patogênica de tais agentes, assunto este que ainda nunca havia sido investigado; isto foi, sem dúvida, o grande motivo pelo qual desenvolvemos este trabalho na tentativa de preencher esta lacuna na etiopatogenia da degeneração mixomatosa.

¹ informação recebida por Higuchi em São Paulo, em 2013.

2 Aspectos gerais da literatura

Do ponto de vista clínico, a degeneração mixomatosa é a causa mais frequente de ruptura de cordas tendíneas, que leva à insuficiência mitral aguda ou crônica e ocorre em taxas de 11,7% [14]. O diagnóstico clínico é realizado através da ausculta no foco mitral de um clique na mesossístole ou telessístole, com timbre mais rude, diferente das bulhas. A ecocardiografia bidimensional transtorácica ou transesofágica é o principal método diagnóstico, além de permitir uma análise detalhada da anatomia para auxiliar no planejamento da técnica cirúrgica [15,16]. O tratamento envolve medidas comportamentais como acompanhamento clínico, realização de ecocardiograma periódico, manutenção de boa saúde bucal e realização de profilaxia para endocardite infecciosa em situações específicas. O tratamento cirúrgico está indicado na presença de sintomas, disfunção de ventrículo esquerdo (VE) com fração de ejeção (FE) entre 30 e 60 %, remodelamento ventricular esquerdo (diâmetro sistólico final \geq 40 mm), presença de hipertensão pulmonar grave ou ocorrência de fibrilação atrial durante o acompanhamento clínico [17]. Para correção cirúrgica do prolapso, tanto a troca valvar por bioprótese ou prótese mecânica quanto a plástica valvar podem ser realizadas e dependem da condição da anatomia valvar e da experiência do cirurgião. A plástica valvar alcança melhores resultados em relação à substituição por prótese por preservar o aparelho valvar mitral, apresentando curvas livres de reoperação maiores que 10 anos [18,19].

2.1 Anatomia e histologia da valva mitral

Histologicamente, a valva mitral é formada por células intersticiais entremeadas por três lâminas de tecido bem definidas: (1) camada fibrosa, que é composta predominantemente de fibras colágenas densas dispostas paralelamente à borda livre da cúspide; (2) camada de tecido esponjoso localizado centralmente, o qual é composto por colágeno e proteoglicanos dispostos frouxamente; e (3) camada atrial, que é composta por fibras elásticas (Figura 3A). As células intersticiais, semelhantes a fibroblastos, sintetizam e secretam citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), metaloproteinases de matriz e seus inibidores que modulam a matriz. Além disso, apresentam um importante papel imunomodulador [20] (Figura 4). O número destas células diminui com a idade e esta redução é acompanhada pela degeneração das fibras de colágeno [21-22].

2.2 Aspectos microscópicos da degeneração mixomatosa

Do ponto de vista histopatológico, as valvas mixomatosas mostram: (1) expansão da camada esponjosa por perda da matriz extracelular rica em proteoglicanos; (2) diminuição das fibras colágenas da camada fibrosa; e (3) a fragmentação da elastina na camada atrial (Figura 3B).

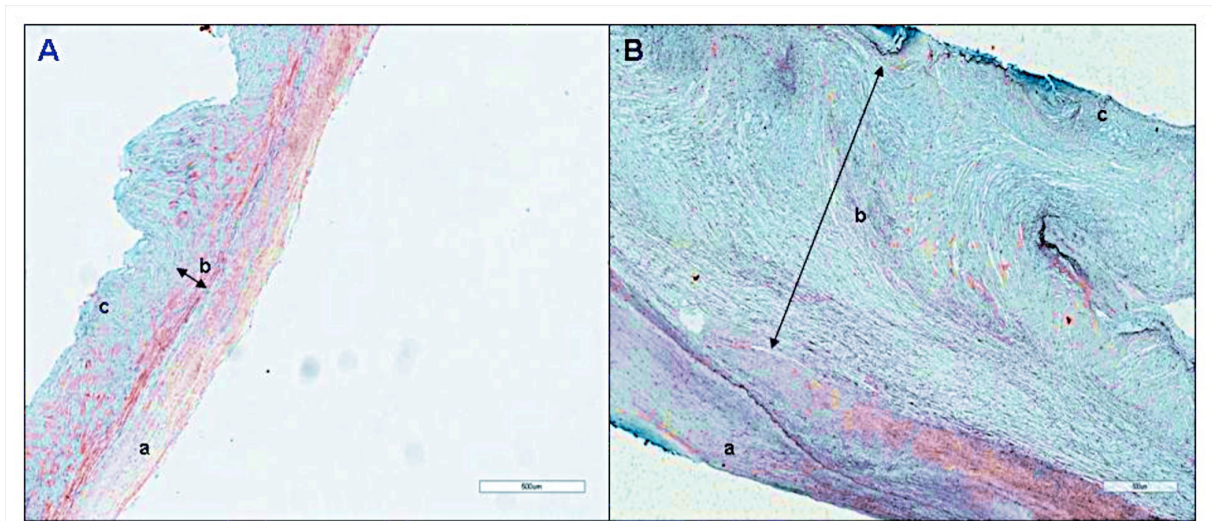


Figura 3 – Histologia da valva mitral normal (A) e com degeneração mixomatosa (B). a:camada atrial, b:camada esponjosa, c:camada fibrosa. Nota-se, através da coloração Movat, a camada esponjosa corada em azul fortemente positivo para proteoglicanos. A- caso 34 e B- caso 29. Barra de 500µm.

A valva mitral apresenta uma distorção em sua arquitetura e nos componentes da matriz extracelular, exibindo características celulares de miofibroblasto ativado, níveis elevados de enzimas proteolíticas e aumento da camada esponjosa, apesar de manter a capacidade de expressar o colágeno intersticial. Há uma fibroelastose da camada atrial, acúmulo de material mucóide nas camadas fibrosa e esponjosa e ausência de células musculares cardíacas na porção basal das cúspides. Outras células presentes são células musculares lisas, fibroblastos e células granulares contendo fibrilas de colágeno intracelular. As valvas apresentam focos de alterações caracterizadas por dissolução das fibras de colágeno e pela presença de fibras colágenas torcidas. As fibras elásticas mostram espaços císticos, fragmentação e dissolução. Assim, todos os tipos de elementos extracelulares de tecido conectivo são alterados nestas valvas. As alterações na estrutura do colágeno podem ser mais importantes do que o acúmulo de material

mucóide na patogênese do prolapso das cúspides valvares. Isto sugere que o desequilíbrio do metabolismo da matriz modula as anormalidades do colágeno e dos outros componentes da matriz extracelular, e que há um excesso de atividade colagenolítica e uma menor síntese de colágeno [23]. Nasuti et al. compararam valvas mitrais normais com valvas com degeneração mixomatosa e com doença reumática, e encontraram uma distribuição anormal de fibrilina na degeneração mixomatosa da valva mitral [24].



Figura 4 – Identificação de célula valvar intersticial. Fibroblasto em meio a matriz valvar apresentado formato alongado e com núcleo delimitado por membrana (célula eucarionte). Caso 39. Barra de 2 μ m.

2.3 Desequilíbrio autonômico e alterações genéticas

Além das alterações da matriz extracelular, recentes trabalhos detectaram alterações em terminações nervosas de valvas mitrais acometidas pela degeneração mixomatosa. A região subendocárdica da face atrial e a porção média das valvas mitrais são ricas em terminações nervosas e estudos recentes já identificaram estas fibras nervosas, que podem ser divididas em fibras aferentes, tais como o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, e as fibras eferentes, incluindo norepinefrina e o neuropeptídeo Y [25,26]. Em estudo experimental, Imataka et al. observaram lesões mitrais valvares e de músculos papilares após a manipulação do nervo vago [27]. Outros estudos reforçam esta hipótese devido à associação de pacientes com neuropatia autonômica diabética e prolapso de válvula mitral e pelo fato de que os pacientes com insuficiência mitral por prolapso podem, em certa medida, responder à administração de bloqueadores dos receptores adrenérgicos [28,29]. Estas evidências sugerem que o tônus autonômico desequilibrado pode desempenhar um papel fundamental na ocorrência e progressão do prolapso da valva mitral. O sistema noradrenérgico desempenha um papel importante no desencadeamento da plasticidade química associada com a plasticidade estrutural. De vários sistemas orgânicos, o número de células positivas e atividade gelatinolítica de metaloproteínas (MMP) MMP2 e MMP9 apresentaram níveis significativamente mais elevados após o tratamento com noradrenalina [30,31]. Portanto, a disfunção autonômica destas terminações nervosas pode estar envolvida na etiologia da degeneração mixomatosa, apresentando um papel facilitador na patogênese do prolapso mitral. O desequilíbrio autonômico das valvas mitrais dá origem a uma

situação de hipersensibilidade ou de susceptibilidade à remodelagem da matriz extracelular e do fenótipo dos componentes celulares [32].

A mutação genética autossômica dominante tem sido proposta como responsável pela origem do prolapso da valva mitral. Pesquisas têm sido desenvolvidas para isolar os genes ligados ao PVM primário. Além dos cromossomos 11 e 16, foram identificados novos *loci* no cromossomo 13 de casos familiares de PVM [33-36].

2.4 Ação das metaloproteinases

As metaloproteinases, enzimas que incluem colagenases intersticiais e gelatinases, estão envolvidas no dano à matriz tanto em valvas normais quanto em valvas acometidas por doenças cardiovasculares associadas à aterosclerose e aos aneurismas aórticos [37-40]. As colagenases intersticiais medeiam o passo inicial da degradação do colágeno pela quebra da hélice nativa da rede de colágeno fibrilar, sendo o tipo I o mais abundante, o qual compreende 70% do total do colágeno nas valvas [41]. Recentes trabalhos mostram que estas enzimas degradadoras de colágeno e seus inibidores estão envolvidos no processo de degeneração mixomatosa [42,43]. Células inflamatórias, como fibrócitos marcados com CD34⁺, têm sido encontradas em maiores quantidades em valvas com DM, principalmente na camada esponjosa funcionando como fonte de metaloproteinases como o MMP9, sendo crucial para o desenvolvimento da degeneração mixomatosa da valva mitral [6,44].

Na maior parte dos tecidos, a degradação da matriz extracelular ocorre através da ação de metaloproteinases de matriz e de cisteína (endoproteases catepsinas). Em valvas cardíacas, a rigorosa regulação da homeostase da matriz mantém a arquitetura funcional da valva normal. Assim, propõe-se que a perda da regulação do metabolismo da matriz modula as anormalidades do colágeno e de outras matrizes extracelulares em válvulas cardíacas com degeneração mixomatosa [40-45]. Além disso, há um aumento da densidade celular na camada esponjosa, aproximadamente o triplo, quando comparada com a valva normal. Além da presença de metaloproteinases na matriz valvar, as células intersticiais com degeneração mixomatosa contêm altos níveis de enzimas catabólicas quando comparadas com valvas normais, especialmente as collagenases. Análises semi-quantitativas mostram que os níveis de MMP1, MMP2, MMP9 e MMP13 nas valvas com degeneração mixomatosa são significativamente maiores que na valva normal. Em valvas normais, macrófagos dispersos podem ser responsáveis por baixos níveis de enzimas proteolíticas [23].

Várias linhas de pesquisa sugerem que as células intersticiais valvares medeiam a degradação da matriz extracelular em muitas doenças degenerativas. A estimulação dessas células, de alguma forma, provoca mensageiros extracelulares que, por sua vez, induzem células intersticiais a iniciar a degradação da matriz [46].

2.5 Ação de agentes infecciosos

Além dos fatores classicamente associados à aterosclerose, agentes infecciosos como a *Chlamydomphila pneumoniae* e o *Mycoplasma pneumoniae*

encontrados em grande quantidade nas placas de aterosclerose vulneráveis e também relacionados a polimorfismos genéticos podem participar da inflamação presente nas valvopatias [10,47,48]. Trabalhos anteriores já descreveram a associação de antígenos de *Chlamydophila pneumoniae* com os processos inflamatórios das lesões da valva aórtica e nos nódulos de calcificação, também em associação com *Mycoplasma pneumoniae* [12,13,49,50].

A *Chlamydophila pneumoniae* é uma bactéria gram negativa com transmissão pela saliva através do contato pessoal com mucosas ou pela inalação de aerossóis contaminados. Está relacionada com infecções pulmonares e tem sido associada com doença cardíaca crônica e infarto agudo do miocárdio [51]. Este patógeno apresenta características microbiológicas especiais, pois tem um tamanho bem menor quando comparado à outras bactérias e sua reprodução ocorre no interior das células do hospedeiro e depende da adenosina trifosfato (ATP) celular, uma vez que não é capaz de se reproduzir. Apresenta dois fenótipos, os corpos elementares e os corpos reticulados. Os corpos elementares podem ser extracelulares e representam a forma infecciosa. A reprodução dos corpos elementares só é possível dentro das células hospedeiras. As células hospedeiras fagocitam os corpos elementares, que no intracelular se transformam em corpos reticulados, e estes se submetem à divisão. Os corpos elementares são, assim, infecciosos, e os corpos reticulados, reprodutivos. Alguns corpos reticulados podem retornar à forma de corpos elementares, que são liberados posteriormente para sediar a lise celular. Os corpos elementares liberados infestam, então, novas células hospedeiras. O diagnóstico sorológico apresenta limitações importantes havendo uma discrepância entre os achados sorológicos e a detecção utilizando técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) [52]. A *Chlamydophila pneumoniae* pode ser

identificada em líquido sinovial e no líquido encéfalo-raquidiano por esta mesma técnica [53,54]. Sua participação como agente infeccioso coadjuvante em doenças cardiovasculares, especialmente em aneurismas aórticos, foi recentemente estudada e mostrou relação positiva com exacerbação de atividade inflamatória na adventícia destes vasos e interferência em inibidores de metaloproteinases que contribuem para a dilatação do vaso sanguíneo [55].

A *Mycoplasma pneumoniae* é uma pequena bactéria extracelular desprovida de parede celular de glicopeptídeos. Como alternativa, possui uma membrana celular de esterol, obtido a partir de substâncias do hospedeiro, acumuladas em simples estruturas. É a principal responsável pela pneumonia atípica e pode cursar com manifestações extra-pulmonares como artrite, hepatite e cardite. Quando atua em simbiose com a *Chlamydomphila pneumoniae* há uma exacerbação da inflamação em doenças cardiovasculares [54]. As manifestações cardíacas mais comuns são as arritmias, o bloqueio átrio-ventricular e a miocardite [56]. Assim como a *Chlamydomphila pneumoniae*, também apresenta dificuldade na detecção sorológica, especialmente para as manifestações sistêmicas, e esta só é positiva após várias semanas do início do quadro clínico [57].

A *Borrelia burgdorferi, sensu lato*, é uma bactéria gram negativa, anaeróbia, com forma de espiroqueta, que, quando transmitida pelo carrapato do grupo *Ixodes ricinus*, torna-se o principal agente causador da doença de Lyme. Esta infecção, que tem como principal manifestação clínica o eritema migratório, apresenta, entre 4 e 10 % dos casos, manifestação cardíaca caracterizada por uma cardite cuja principal manifestação é o bloqueio atrioventricular. A detecção laboratorial se dá por meio de anticorpos específicos contra a espiroqueta ou pela utilização da técnica de PCR no sangue, no líquido articular ou no tecido suspeito [58]. Em recente estudo,

Palecek et al., analisando casos de cardiomiopatia dilatada, realizaram biópsias miocárdicas em 39 pacientes que estavam sem diagnóstico etiológico e encontraram em 21% deles a presença de *Borrelia burgdorferi*. Durante o desenvolvimento da doença de Lyme, pode haver co-infecções causadas por várias bactérias incluindo a *Chlamydia pneumoniae* e a *Mycoplasma pneumoniae* [59].

Em comparação com as células intersticiais, as bactérias, seres procariontes, não possuem separação entre citoplasma e o núcleo, e a cromatina fica dispersa em meio ao citoplasma.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Primário

Análise dos produtos dos patógenos da *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* em segmentos de cúspide retirados da valva mitral com degeneração mixomatosa, comparado ao grupo controle.

3.2 Objetivo Secundário

Análise da relação dos produtos bacterianos com aumento de marcadores inflamatórios (CD20, CD48, CD68) e de metaloproteinase (MMP9) na etiopatogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral.

4 Métodos

4.1 Desenho da pesquisa

Estudo observacional, analítico, tipo caso-controle, aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) sob o número de protocolo 0029/04, renovado em 2012 (Anexo 8.1). Todos os pacientes ou familiares assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos 8.2 e 8.3). O trabalho foi executado com recursos financiados pela FAPESP, com o projeto de pesquisa número 2014/04383-4.

O estudo analisou dois grupos: grupo 1, composto por fragmentos de tecido valvar mitral com diagnóstico de degeneração mixomatosa extraídos em procedimentos de troca ou plásticas valvares mitrais; grupo 2, formado por segmentos de valvas mitrais sem degeneração mixomatosa.

4.2 Ambientação da pesquisa

Os segmentos valvares do grupo 1 foram coletados em procedimentos cirúrgicos realizados no InCor/HC-FMUSP. Os fragmentos valvares do grupo 2 foram coletados no Serviço de Verificação de Óbitos (SVO) da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA) e encaminhados ao laboratório de patologia cardíaca do InCor-HCFMSUP. A execução das técnicas de histologia convencional, imunohistoquímica

e hibridização *in situ* ocorreu no laboratório de patologia cardíaca do InCor/HC-FMSUP e a microscopia eletrônica de transmissão, na Faculdade de Medicina da USP.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

A população desse estudo compreendeu pacientes admitidos no InCor/HC-FMSUP, encaminhados para unidade de valvopatia cirúrgica, com idade maior ou igual a 18 anos, com diagnóstico clínico e ecocardiográfico de insuficiência mitral causada por prolapso valvar com indicação cirúrgica de troca ou plástica valvar. O critério utilizado para o diagnóstico de prolapso da valva mitral foi a constatação de sopro sistólico em foco mitral através do exame clínico, complementado pelo ecocardiograma transtorácico que evidenciasse abaulamento de uma ou ambas as cúspides de pelo menos 2 mm além do plano do anel valvar mitral, independente da sua espessura. O grupo controle teve base na coleta do segmento medial da cúspide posterior de valva mitral em pacientes cadáveres sem história conhecida de cardiopatia valvar congênita ou adquirida admitidos no SVO da cidade de Marília.

Os critérios de exclusão foram:

- Outras doenças cardiovasculares que tivessem indicação cirúrgica. São exemplos: a doença coronariana obstrutiva, aneurismas de ventrículo esquerdo, anomalias cardíacas congênitas cianóticas ou acianóticas;

- Reoperação valvar, mesmo tendo sido a primeira cirurgia em valva outra que não a mitral (ou seja, mesmo que o paciente possuísse valva mitral ainda nativa);
- Doença cardíaca valvar congênita ou adquirida conhecida nos pacientes cadáveres pertencentes ao grupo controle;
- Não concordância do paciente ou representante legal em participar do estudo.

4.4 Procedimentos cirúrgicos e analíticos

O procedimento cirúrgico foi realizado após coleta de exames laboratoriais sumários (bioquímica sanguínea e hemograma; ecocardiograma transtorácico; cineangiocoronariografia para aqueles com idade superior a 40 anos ou com necessidade de estudo mais aprofundado de pressões intracardíacas). Em centro cirúrgico, o paciente foi submetido a anestesia geral, esternotomia mediana, heparinização plena e canulação venosa bicaval e arterial na aorta ascendente. Colocado sob circulação extracorpórea, após o pinçamento da aorta e realização de cardioplegia sanguínea hipotérmica, teve o átrio esquerdo aberto e a valva mitral identificada e analisada. Durante a abordagem da valva mitral foi coletado o segmento valvar comprometido e este foi imediatamente armazenado e encaminhado ao laboratório de patologia cardíaca. O procedimento sobre a valva mitral foi realizado, o átrio esquerdo fechado, seguido da saída da circulação extracorpórea, quando o coração apresentasse boas condições de contratilidade e o paciente estivesse estável hemodinamicamente.

No Serviço de Verificação de Óbito, foi realizada a toracotomia, dissecação das estruturas até abertura do pericárdio seguido da retirada do coração para análise macroscópica. Houve ressecção de um segmento da cúspide posterior (P2), sendo este armazenado em frasco com formol a 10% e enviado ao laboratório de patologia cardíaca do InCor. O fragmento valvar só foi coletado após sua análise macroscópica realizada pelo pesquisador e pelo patologista que realizou a necropsia e se ambos concordassem que a valva era anatomicamente normal.

Do segmento ressecado, medindo em torno de 2 x 2 cm², preparamos as lâminas contendo um fragmento com corte de 5 micrômetros para análise histológica, imunohistoquímica e de hibridização *in situ*. Em cada uma das amostras pré-determinadas, foram analisadas duas áreas, designadas área 1 e área 2 (Figura 5).

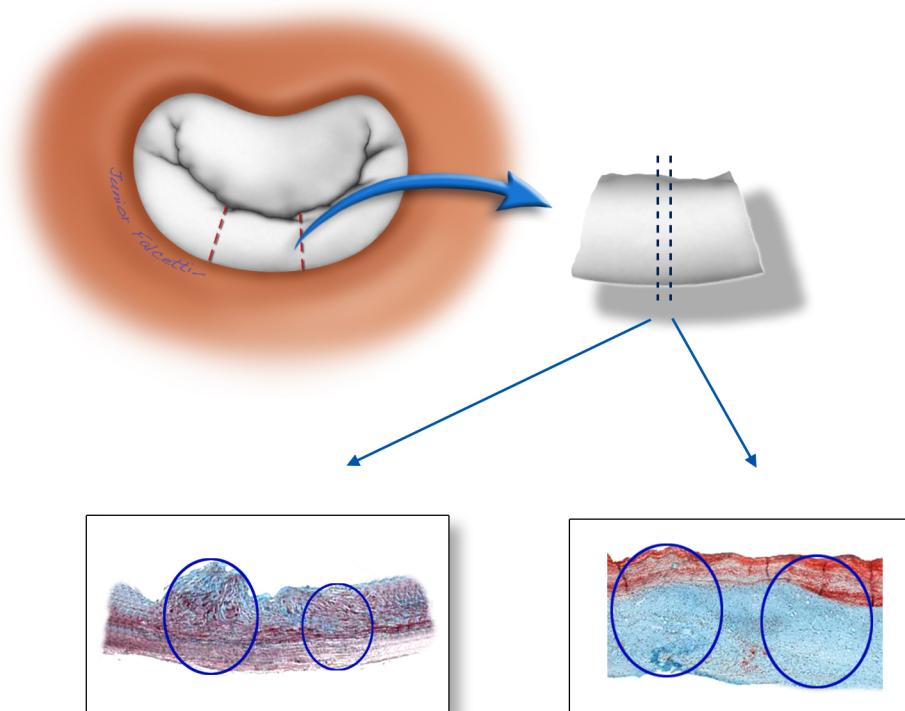


Figura 5 – Detalhes da coleta do segmento valvar e das áreas analisadas. A lâmina posicionada à esquerda representa um segmento valvar do grupo controle. A lâmina posicionada à direita representa um segmento valvar do grupo degeneração mixomatosa.

Estudamos 20 (vinte) fragmentos de cada grupo através das seguintes técnicas: colorações de hematoxilina e eosina (H&E) e Movat para diagnóstico histológico da degeneração mixomatosa e técnica de imunohistoquímica (IQ) para detecção de antígenos da *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae*, mediadores inflamatórios (CD20, CD45, CD68) e marcador de antígeno de collagenase (MMP9) seguindo protocolo específico (Tabela 1 e Anexo 8.4). A detecção de antígenos da *Chlamydomphila pneumoniae* foi feita pela técnica de hibridização *in situ* seguindo protocolo específico (Anexo 8.5). Na coloração H&E (Anexo 8.6) foram feitas as análises de quantidade de fibrose, calcificação e áreas

de degeneração mucóide. A coloração Movat, desenvolvida por Henry Zoltan Movat em 1955, tem a propriedade de analisar elementos do tecido conectivo diferenciando manchas de colágeno, elastina e proteoglicanos, além de avaliar a presença de tecido comprometido pela degeneração mixomatosa [60].

Tabela 1 – Anticorpos utilizados.

Anticorpo primário	Clone (código)	Recuperação do antígeno	Diluição do anticorpo primário	Controle	Marca
CD68	KP1 Cód.:M0814	TRIS/EDTA Ph 9,0	Formol 1/3.200	B08/313-1	DAKO/IgG
Borrelia	Coelho Cód.:ab34970	TRIS/EDTA Ph 9,0	Formol 1/300	A96/08 Miocárdio + para Borrelia	ABCAM
Mycoplasma	Coelho Cód.:10MR54	CITRATO Ph 6,0	Formol 1/100	P4/08 Aneurisma	FITZGERALD
CD20	L26 Cód.:M0755	TRIS/EDTA Ph 9,0	Formol 1/1000	AMF Amígdala	DAKO/IgG
CD45-RO	VCHL Cód.:M0742	TRIS/EDTA Ph 9,0	Formol 1/125	AMF Amígdala	DAKO/IgG
MMP9	Coelho Cód.:RB1539P	SEM RECUPERAÇÃO	Formol 1/3.200	P4/08 Aneurisma	NEO MARKERS

Após o processamento imunohistoquímico, as lâminas foram escaneadas através do aparelho Scanscope CS System (Aperio Technologies, Inc., CA, USA), com uma objetiva Olympus UPlanSApo 20x com especificações 20x/0.75, acoplada ao escaner, gerando arquivos de imagem. As imagens digitalizadas foram analisadas através do programa Aperio ImageScope View Software (Aperio Technologies, Inc., CA, USA), uma nova tecnologia que dispensa o uso do microscópio óptico. As amostras foram analisadas pela ferramenta de análise, por meio da seleção do algoritmo para marcação nuclear e de membrana documentadas

através do Software Image Scope. O software informa o percentual total e subdividido por intensidade de marcação. A medida da degeneração foi realizada em porcentagem de degeneração quantificada pela coloração Movat. Para a análise de células inflamatórias (CD20, CD45, CD68) foram feitas as contagens do número total de células positivas em uma área de 1mm de largura envolvendo toda a extensão da cúspide, sendo expressas em número total de células positivas/mm². Para a análise da presença de antígenos de MMP9 e antígenos bacterianos, contabilizamos a quantidade de área em μm^2 de antígeno em uma área de 1 mm de largura envolvendo toda a extensão da válvula. A pesquisa de elementos bacterianos e a visualização direta dos agentes infecciosos foram realizadas através da microscopia eletrônica de transmissão com o microscópio JEOL modelo JEM-1010 (JEOL Ltd., Akishima, Tokyo, Japan), que permitiu a análise de cortes ultrafinos (70 nanômetros de espessura) preparados em tela de cobre, seguindo protocolo próprio (Anexo 8.8).

No grupo 1, 14 (70%) pacientes são do gênero masculino e 6 (30%) do gênero feminino. A idade média foi 67,4 anos (51 a 79 anos, dp = 9,2). Os achados intra-operatórios durante a intervenção cirúrgica sob a valva mitral foram: prolapso isolado em 9 (45%) pacientes, rotura de cordas tendíneas em 7 (35%) pacientes e prolapso associado à rotura de cordas tendíneas em 4 (20%) pacientes. De acordo com a classificação de Carpentier [61], 14 (70%) pacientes tinham envolvimento do segmento P2; 1 (5%) paciente, do segmento A2; 1 (5%) paciente, do segmento A3; 1 (5%) paciente, dos segmentos P1 e P2 associados; 1 (5%) paciente, dos segmentos P2 e P3 associados; 1 (5%) paciente, dos segmentos A2 e A3 associados; e 1 (5%) paciente, dos segmentos A2 e P2 associados (Tabela 2). Em relação ao procedimento cirúrgico realizado, 17 (85%) pacientes foram submetidos a

plástica valvar mitral através da ressecção quadrangular da cúspide posterior associada à anuloplastia segmentar posterior pela técnica do duplo teflon [62]. Em 1 paciente foi associada a ressecção em cunha da cúspide anterior e 3 (15%) pacientes foram submetidos à troca valvar mitral por prótese biológica.

Tabela 2 – Características dos pacientes com valva mitral mixomatosa.

Caso	Idade (anos)	Gênero	Diagnóstico clínico/ Achado cirúrgico	Cúspide analisada
1	72	M	Degeneração Mixomatosa Rotura de cordas	Cúspide posterior (P2)
2	51	F	Degeneração Mixomatosa Rotura de cordas tendíneas	Cúspide anterior (A3)
3	73	F	Degeneração Mixomatosa Rotura de cordas tendíneas	Cúspide posterior (P2)
4	72	F	Degeneração Mixomatosa Prolapso + rotura de cordas tendíneas	Cúspide posterior (P2)
5	60	F	Degeneração Mixomatosa Prolapso + rotura de cordas tendíneas	Cúspide posterior (P2)
6	59	M	Degeneração Mixomatosa Prolapso	Cúspide posterior (P1-P2)
7	72	M	Degeneração Mixomatosa Prolapso+ rotura de cordas tendíneas	Cúspide posterior (P2)
8	73	M	Degeneração Mixomatosa Rotura de cordas tendíneas	Cúspide anterior (A2)
10	72	M	Degeneração Mixomatosa Rotura de cordas tendíneas	Cúspide posterior (P2-P3)
11	68	M	Degeneração Mixomatosa Rotura de cordas tendíneas	Cúspide posterior (P2)
13	68	M	Degeneração Mixomatosa Prolapso + espessamento	Cúspide posterior (P2) + anterior
14	73	M	Degeneração Mixomatosa/Prolapso	Cúspide posterior (P2)
26	79	M	Degeneração Mixomatosa Prolapso + alongamento de corda tendínea	Cúspide posterior (P2) + anterior (A2)
27	56	M	Degeneração Mixomatosa/Prolapso	Cúspide posterior (P2)
28	63	F	Degeneração Mixomatosa/Prolapso	Cúspide anterior (A2-A3)

Continuação

Caso	Idade (anos)	Gênero	Diagnóstico clínico/ Achado cirúrgico	Cúspide analisada
29	69	F	Degeneração Mixomatosa Rotura de cordas tendíneas	Cúspide posterior (P2)
30	44	M	Degeneração Mixomatosa/Prolapso	Cúspide posterior (P2)
35	78	M	Degeneração Mixomatosa/Prolapso	Cúspide posterior (P2)
36	69	M	Degeneração Mixomatosa/Prolapso	Cúspide posterior (P2)
38	76	M	Degeneração Mixomatosa Prolapso + rotura de cordas tendíneas	Cúspide posterior (P2)

No grupo 2, 11 (55%) pacientes são do gênero masculino e 9 (45%), do gênero feminino. A idade média foi 67,6 anos (42 a 84 anos, dp = 12,0). A causa do óbito foi infarto agudo do miocárdio em 5 (25%) casos, acidente vascular cerebral isquêmico em 4 (20%) casos, insuficiência respiratória aguda por pneumonia em 3 (15%) casos, rotura de aorta ascendente por dissecção aguda da aorta ascendente em 2 (10%) casos, tromboembolismo pulmonar em 1 (5%) caso, miocardiopatia hipertrófica em 1 (5%) caso, miocardiopatia isquêmica em 1 (5%) caso, edema agudo de pulmão em 1 (5%) caso, rotura de aneurisma de aorta abdominal em 1 (5%) caso, e insuficiência cardíaca em 1 (5%) caso (Tabela 3). O segmento retirado para análise foi a região P2 da valva mitral e em nenhum deles havia sinais de degeneração mixomatosa pela análise macroscópica, avaliada pelo pesquisador e pelo patologista que realizou as necrópsias. Através da histologia pelo H&E, tanto os segmentos valvares do grupo 1 quanto os do grupo 2 apresentaram algum grau de degeneração mixomatosa, porém a degeneração está presente com maior intensidade nos pacientes do grupo G1 (Anexo 8.6).

Tabela 3 – Características dos pacientes do grupo controle.

Caso	Idade (anos)	Gênero	Causa da Morte	Intervalo de coleta pós morte (em horas)
31	42	M	Infarto agudo do miocárdio	6
32	59	M	Tromboembolismo pulmonar	7
33	76	M	Acidente vascular cerebral isquêmico	3
34	66	M	Miocardopatia isquêmica	6
39	82	M	Acidente vascular cerebral isquêmico	5
40	63	F	Dissecção aorta ascendente - roto	9
41	79	F	Dissecção aorta ascendente - roto	9
42	73	F	Insuficiência respiratória aguda – Pneumonia	10
43	75	M	Rotura parede livre VE por infarto agudo do miocárdio	5
44	54	F	Miocardopatia hipertrófica	9
45	74	F	Edema agudo de pulmão	9
46	51	M	Infarto agudo do miocárdio	10
47	52	M	Aneurisma de aorta abdominal roto	12
48	80	M	Insuficiência respiratória aguda – Pneumonia	5
49	60	M	Infarto agudo do miocárdio	6
50	61	F	Acidente vascular cerebral isquêmico	6
51	72	F	Acidente vascular cerebral isquêmico	8
52	84	F	Infarto agudo do miocárdio	5
53	67	M	Insuficiência respiratória aguda – Pneumonia	14
54	82	F	Insuficiência cardíaca	9

4.5 Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados com o software SigmaStat (versão 20; SPSS Inc., Chicago, IL). Os grupos foram comparados pelo teste t de Student para as variáveis com distribuição normal, expressa por média \pm desvio-padrão e pelo teste de Mann-Whitney para as variáveis com distribuição assimétrica e não pareadas, expressas por mediana (quartis 1 e 3). A análise das correlações entre as variáveis ordinais de distribuição assimétrica foi realizada através do teste de correlação de Spearman. O teste correlação de Spearman foi realizado em diferentes grupos para

observar se os agentes infecciosos poderiam exercer seus efeitos associados a outro agente, à célula inflamatória ou ao MMP9. Os valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística.

5 Resultados

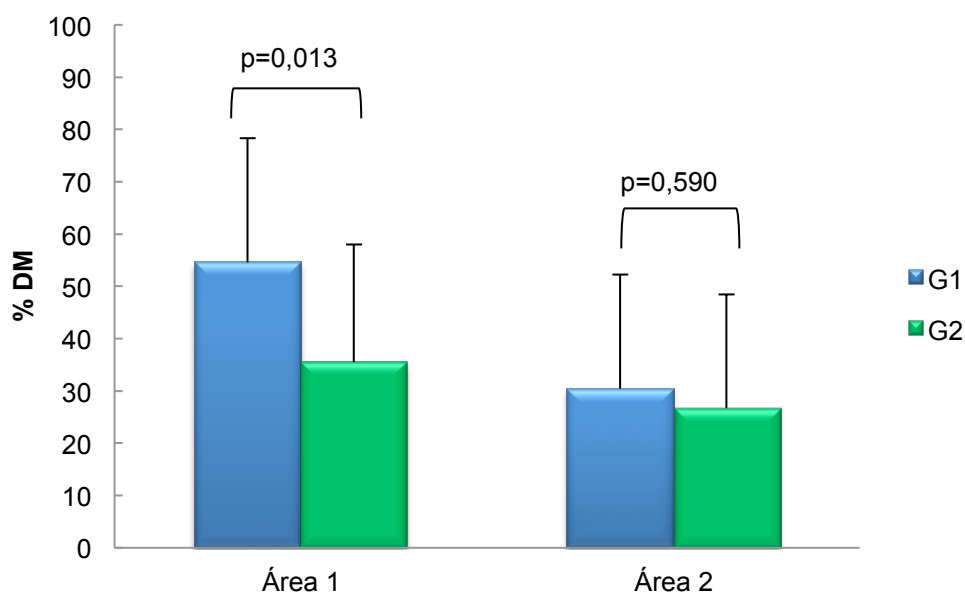
5.1 Análise histológica pelo Movat

Quando analisamos a presença de tecido com degeneração mixomatosa através da coloração Movat, observamos que, ao analisarmos a área 1, houve diferença com significância estatística entre os grupos DM (G1) com média de 54,6 % \pm 23,7 e grupo controle (G2) com média de 35,5 % \pm 22,5 com valor de $p = 0,013$ (4,3 - 33,9 - IC 95%). Quando comparamos isso com a área 2, o grupo com DM também apresentou maior porcentagem de degeneração, porém não houve significância estatística com média de 30,4% \pm 21,9 para o G1 e média de 26,7 % \pm 21,7 para o G2, com $p = 0,59$ (10,3 - 17,7 – IC 95%) (Tabela 4 e Anexo 8.7). Isto mostra que o grupo 1 apresenta degeneração mixomatosa mais intensa e difusa. O gráfico 1 representa a análise da porcentagem de degeneração na área 1 e na área 2. Foram analisadas 100% das amostras teciduais da coloração Movat.

Tabela 4 – Quantificação de degeneração mixomatosa pelo Movat.

Movat	G1		G2		
% DM	Média	dp	Média	dp	p (IC 95%)
área 1	54,6 (0,7 - 91,6)	23,7	35,5 (4,3 - 81,9)	22,5	$p = 0,013$ (4,3 - 33,9)
área 2	30,4 (0,5 - 72,6)	21,9	26,7 (0,1 - 74,1)	21,7	$p = 0,590$ (10,3 - 17,7)

G1: grupo 1; G2: grupo 2; %DM: porcentagem de degeneração mixomatosa; dp: desvio padrão; IC: intervalo de confiança



%DM: porcentagem de degeneração mixomatosa; p: valor de p

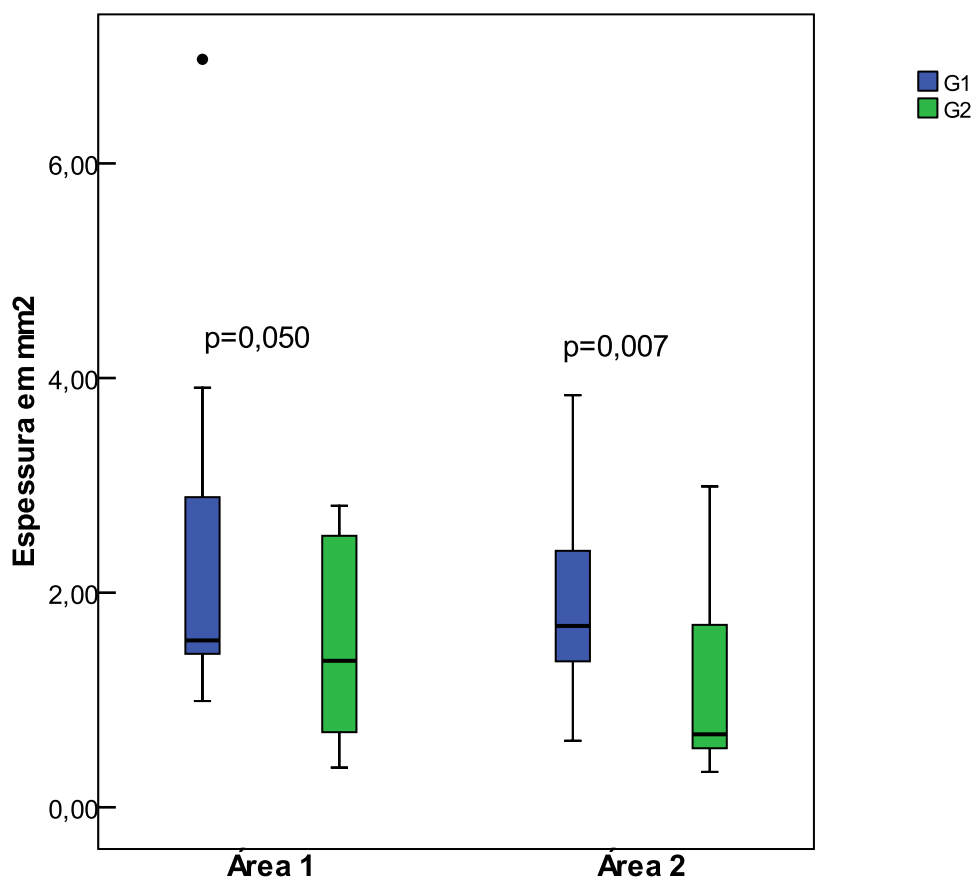
Gráfico 1 – Porcentagem de degeneração mixomatosa (%DM) na área 1 e área 2 dos grupos 1 e 2.

A tabela 5 mostra que os segmentos valvares (área 1 e 2) do grupo degeneração mixomatosa (G1) são mais espessos quando comparados com as valvas do grupo controle (G2) ($1,6 \times 1,4 \text{ mm}^2$ e $1,7 \times 0,7 \text{ mm}^2$ com $p = 0,05$ e $p = 0,007$, respectivamente) (Gráfico 2 e Anexo 8.7).

Tabela 5 – Medida da espessura valvar pelo Movat.

Movat	G1			G2			valor de p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Área DM(mm ²)							
área 1	1,6(1,0-7,0)	1,4	2,5	1,4(0,4-2,8)	0,7	2,5	p = 0,050
área 2	1,7(0,6-3,8)	1,4	2,4	0,7(0,3-3,0)	0,6	1,7	p = 0,007

G1: grupo 1; G2: grupo 2; DM(mm²): porcentagem de degeneração mixomatosa em milímetros; P25 = percentil 25 (ou 1º Quartil); P75=percentil 75 (ou 3º Quartil).



G1: grupo 1; G2: grupo 2; mm²: milímetros quadrados

Gráfico 2 – Medida da espessura valvar em mm na área 1 e área 2 dos grupos 1 e 2.

5.2 Análise histoquímica do CD20

Quando analisamos a presença de células CD20 (marcadoras de linfócitos B), observamos um maior número de células positivas/mm² no grupo com DM (G1). Houve diferença estatisticamente significativa a favor do grupo G1 em relação ao G2, com mediana igual a 17,8 (6,7 - 27,9) x 4,6 (3,6 - 9,8) com $p = 0,007$ para a área 1, e

mediana de 10,7 (6,1 - 32,9) x 3,2 (1,9 - 10) com $p = 0,02$ para a área 2 (Tabela 6 e Anexo 8.7). Foram analisadas 100% das amostras teciduais.

A figura 6 compara as imagens histológicas da valva mitral normal e com degeneração mixomatosa em relação à pesquisa de células CD20 através do escaneamento pelo aparelho Scanscope CS System e digitalização através do programa Aperio Image Scope View Software.

Tabela 6 – Quantificação de células CD20.

CD20	G1			G2			
N. céls +/mm ²	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	valor de p
área 1	17,8 (2-230)	6,7	27,9	4,6 (0-67)	3,6	9,8	$p=0,007$
área 2	10,7 (0-139)	6,1	32,9	3,2 (0-71)	1,9	10,0	$p=0,020$

G1: grupo 1; G2: grupo 2; N. céls +: numero de células positivas; P25 = percentil 25 (ou 1º Quartil); P75=percentil 75 (ou 3º Quartil).

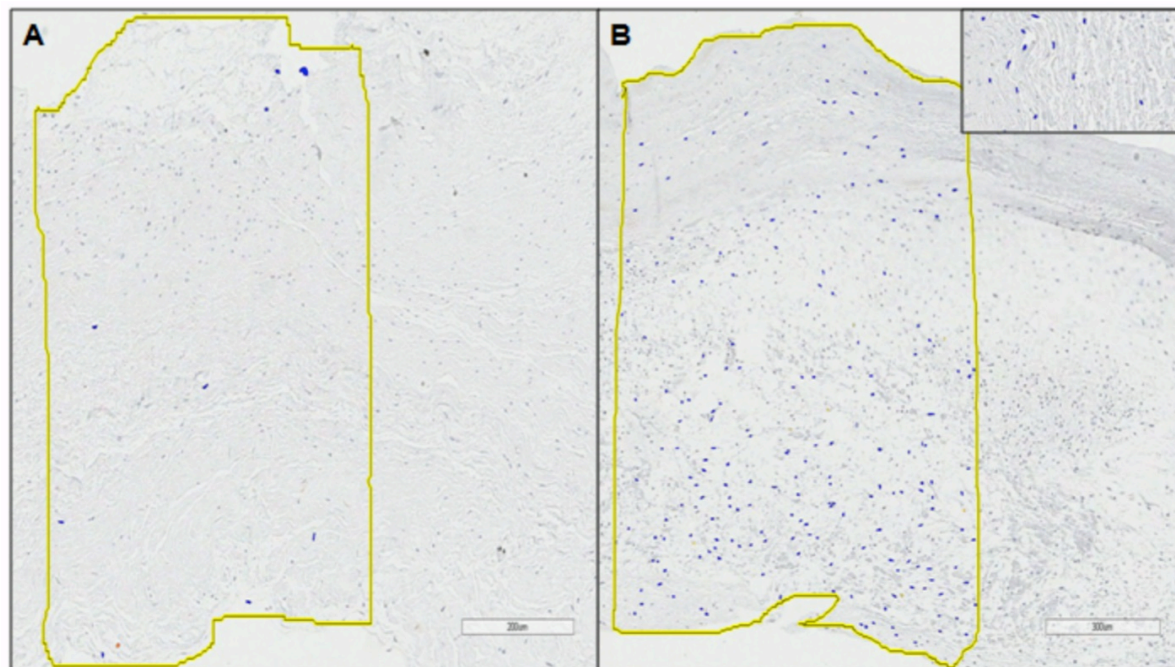


Figura 6 – Análise histoquímica das células CD20. Imagens histológicas da valva mitral normal (A) e com degeneração mixomatosa (B) através do escaneamento pelo aparelho Scanscope CS System e digitalização através do programa Aperio Image Scope View Software. As células CD20 detectadas apresentam-se como pontos escurecidos. A- caso 34, barra de 200 μm ; B- caso 26, barra de 300 μm .

5.3 Análise histoquímica do CD45

Quando analisamos a presença de células CD45 (marcadoras de linfócitos T), observamos um maior número de células positivas/mm² no grupo DM (G1). Houve diferença estatisticamente significativa a favor do grupo G1 em relação ao G2, com mediana igual a 17,3 (3,4 - 92,5) x 2,8 (1,4 - 10,1) com p = 0,008 para a área 1 e mediana de 13,4 (2 - 67,9) x 2,6 (1,4 - 5,1) com p = 0,04 para a área 2 (Tabela 7 e Anexo 8.7). Foram analisadas 100% das amostras teciduais. A figura 7 compara as imagens histológicas da valva mitral normal e com degeneração mixomatosa em relação à pesquisa de células CD45 através do escaneamento pelo aparelho Scanscope CS System e digitalização através do programa Aperio Image Scope View Software.

Tabela 7 – Quantificação de células CD45.

CD45	G1			G2			valor de p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
N. céls +/mm ²							
área 1	17,3(0-316)	3,4	92,5	2,8(0-54)	1,4	10,1	p=0,008
área 2	13,4(0-348)	2,0	67,9	2,6(0-10)	1,4	5,1	p=0,040

G1: grupo 1; G2: grupo 2; N. céls +: número de células positivas; P25 = percentil 25 (ou 1º Quartil); P75=percentil 75 (ou 3º Quartil).

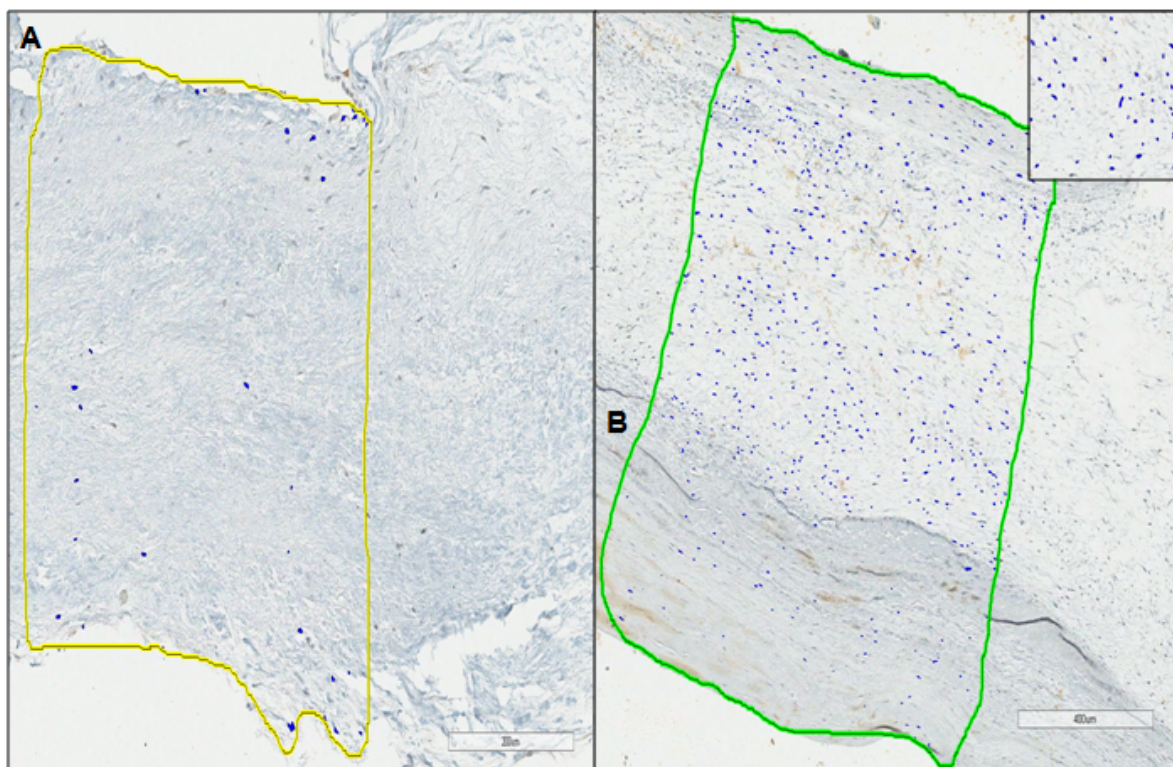


Figura 7 – Análise histoquímica das células CD45. Imagens histológicas da valva mitral normal (A) e com degeneração mixomatosa (B) através do escaneamento pelo aparelho Scanscope CS System e digitalização através do programa Aperio Image Scope View Software. As células CD45 detectadas apresentam-se como pontos escurecidos A- caso 32, barra de 500 µm; B- caso 26, barra de 400 µm.

5.4 Análise histoquímica do CD68

Em relação à presença de células CD68 (marcadoras de macrófagos), houve um maior número de células positivas/mm² no grupo controle (G2) em relação ao grupo de valvas com DM (G1), porém sem significância estatística. Este predomínio aconteceu em ambas as áreas. Na área 1, mediana de 38,7 (26,6 - 81,8) x 70 (42,7 - 120,4) com $p = 0,098$ e na área 2, mediana igual a 30,5 (9,6 - 59,7) x 51,3 (30,5 - 146,7) com $p = 0,066$ (Tabela 8 e Anexo 8.7). Não foi possível a análise

de uma amostra tecidual de cada grupo (caso número 6 e caso número 49) devido à dificuldade de identificação das estruturas na lâmina. A figura 8 compara as imagens histológicas da valva mitral normal e com degeneração mixomatosa em relação à pesquisa de células CD68 através do escaneamento pelo aparelho Scanscope CS System e digitalização através do programa Aperio Image Scope View Software.

Tabela 8 – Quantificação de células CD68.

CD68	G1			G2			
N. céls+/mm ²	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	valor de p
área 1	38,7(10-294)	26,6	81,8	70,0(5,4-182)	42,7	120,4	p=0,098
área 2	30,5(23-527)	9,6	59,7	51,3(5,4-252)	30,5	146,7	p=0,066

G1: grupo 1; G2: grupo 2; N. céls +: numero de células positivas; P25 = percentil 25 (ou 1º Quartil); P75=percentil 75 (ou 3º Quartil).

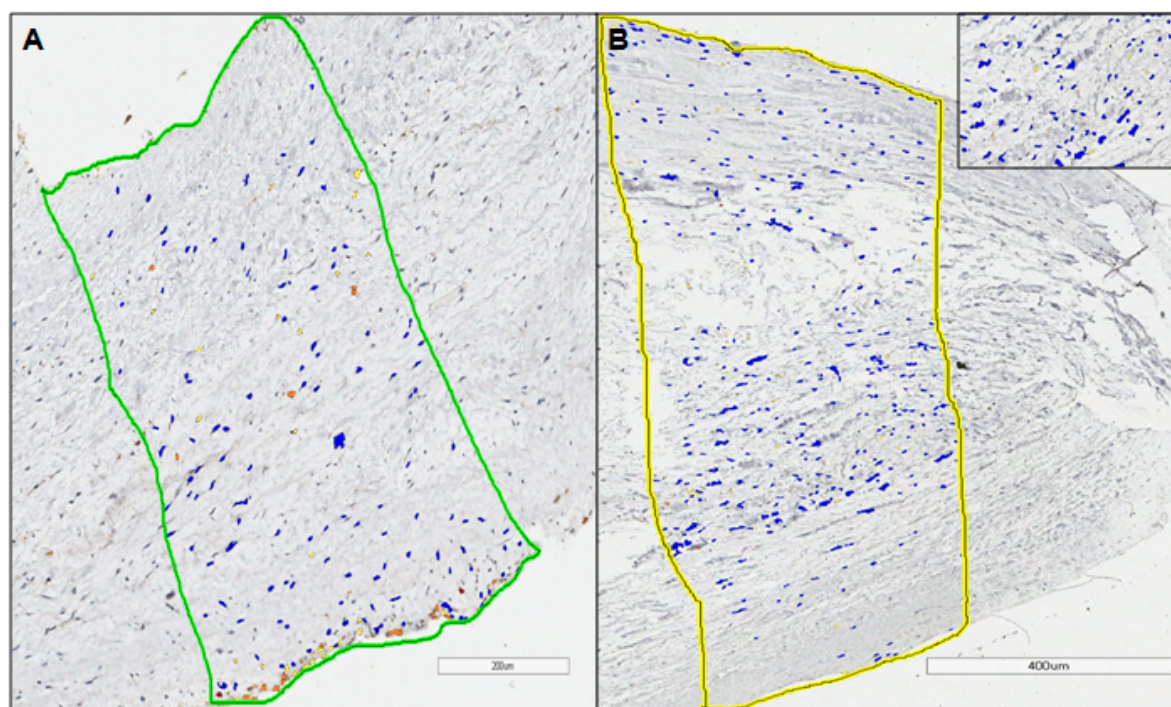
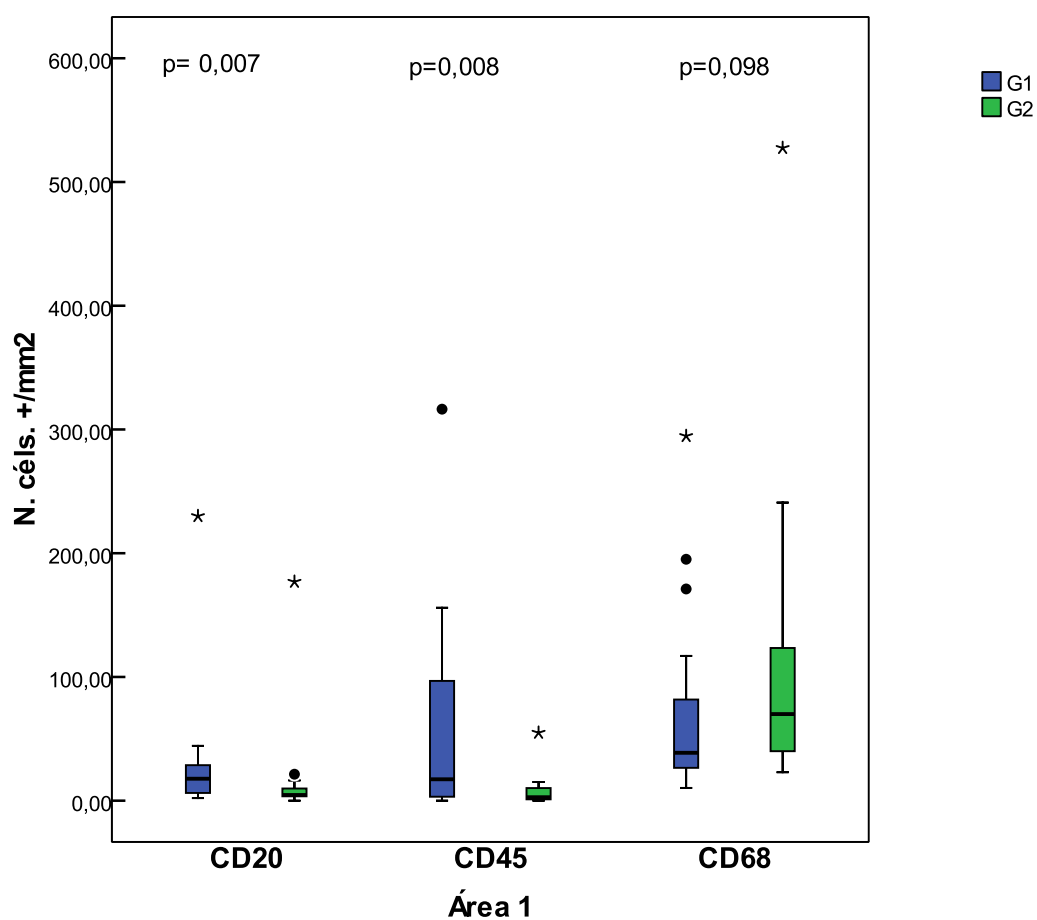


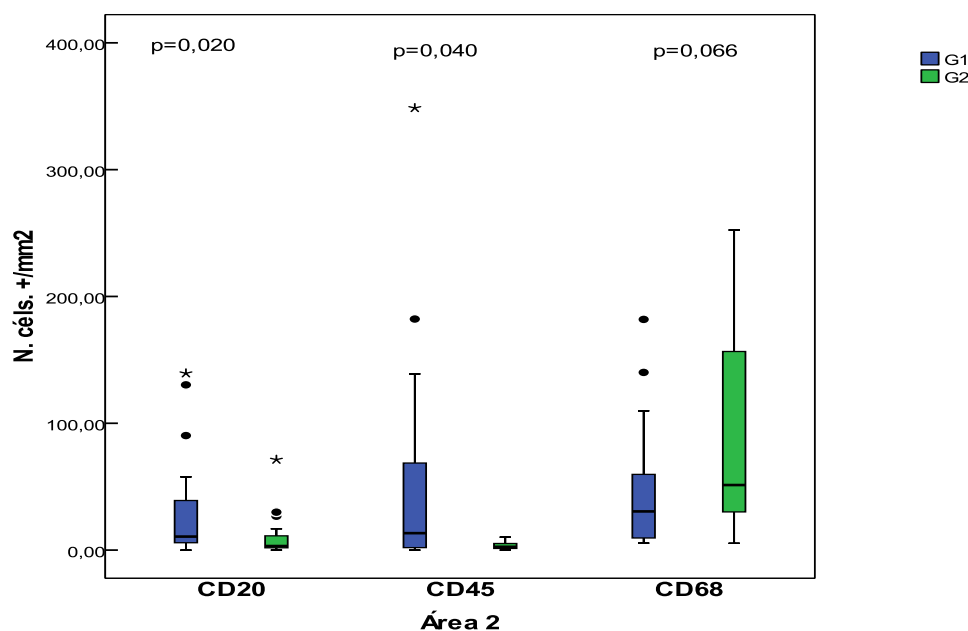
Figura 8 – Análise histoquímica das células CD68. Imagens histológicas da valva mitral normal (A) e com degeneração mixomatosa (B) através do escaneamento pelo aparelho Scanscope CS System e digitalização através do programa Aperio Image Scope View Software. As células CD68 detectadas apresentam-se como pontos escurecidos A- caso 34, barra de 200 µm; B- caso 3, barra de 400 µm.

O gráfico 3 representa a análise estatística das células inflamatórias CD20, CD45 e CD 68 na área 1. O gráfico 4 representa a análise estatística das células inflamatórias CD20, CD45 e CD68 na área 2.



G1: grupo 1; G2: grupo 2; N. céls +: numero de células positivas; mm²: milímetros quadrados

Gráfico 3 – Quantidade de células inflamatórias CD20, CD45 e CD68, detectadas na área 1 dos grupos 1 e 2.



G1: grupo 1; G2: grupo 2; N. céls +: número de células positivas; mm²: milímetros quadrados

Gráfico 4 – Quantidade de células inflamatórias CD20, CD45 e CD68, detectadas na área 1 dos grupos 1 e 2.

5.5 Análise histoquímica da *Mycoplasma pneumoniae*

Em relação à presença de antígenos de *Mycoplasma pneumoniae*, expressos em μm^2 de antígenos por 1 mm de extensão de segmento valvar, houve uma área maior de antígenos detectados no grupo de valvas com DM (G1), quando comparados com o grupo controle (G2) havendo diferença estatisticamente significativa para as duas áreas. Na área 1, mediana de 180.993 (24.856 - 387.477) x 7.970 (2.736 - 15.992) com $p < 0,001$, e na área 2, mediana igual a 105.968 (2.503 - 416.585) x 7.190 (3.314 - 17.833) com $p = 0,02$ (Tabela 9 e Anexo 8.7). Foram analisadas 100% das amostras teciduais.

Tabela 9 – Quantificação dos antígenos de *Mycoplasma pneumoniae*.

Mp	G1			G2			
$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	valor de p
área 1	180.993 (823-933.127)	24856	387477	7.970 (470-760.255)	2736	15992	p<0,001
área 2	105.968 (0-66.128)	2503	416585	7.190 (0-126.000)	3314	17833	p=0,020

Mp: *Mycoplasma pneumoniae*; G1: grupo 1; G2: grupo 2; μm^2 : micrômetros quadrados; Ag: antígenos; mm: milímetros; P25 = percentil 25 (ou 1º Quartil); P75=percentil 75 (ou 3º Quartil).

A figura 9 compara as imagens histológicas da valva mitral normal e com degeneração mixomatosa em relação à pesquisa de antígenos da *Mycoplasma pneumoniae* através do escaneamento pelo aparelho Scanscope CS System e digitalização através do programa Aperio Image Scope View Software.

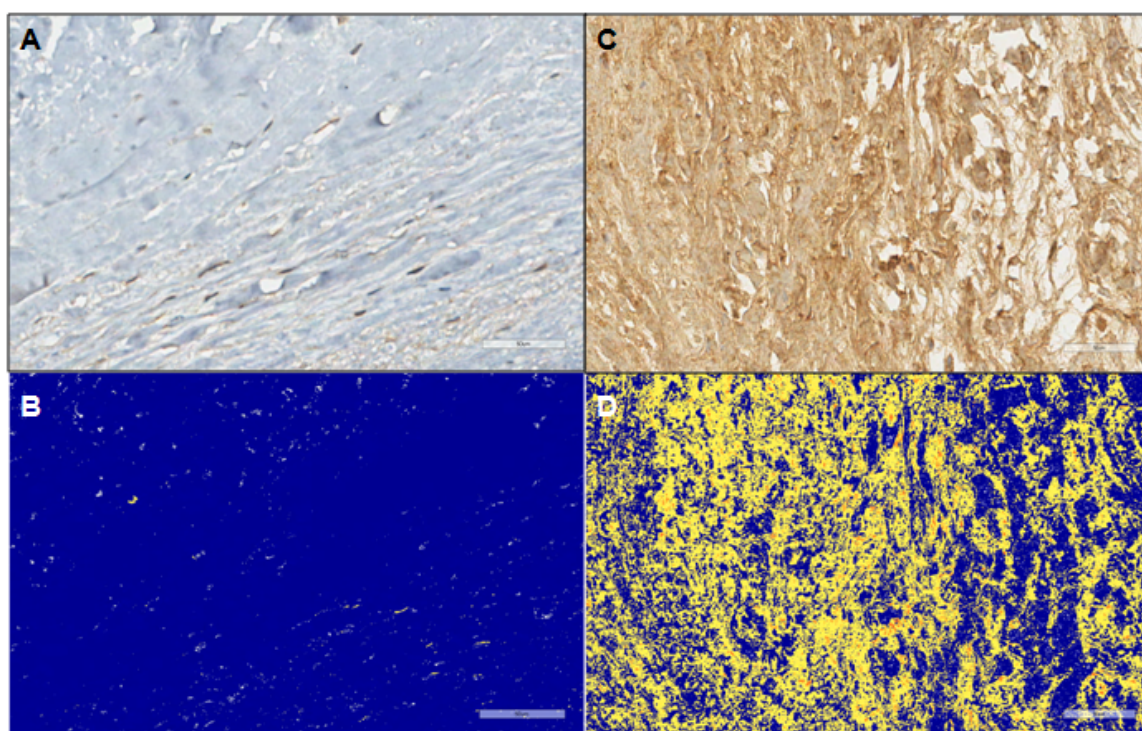


Figura 9 –Análise histoquímica dos antígenos da *Mycoplasma pneumoniae*. A e B: grupo controle. C e D: grupo com degeneração mixomatosa. Os antígenos de Mp detectados são caracterizados pelas cores amarelo e alaranjado. Caso 43: A: Reação Imunohistoquímica e B: Análise do Apério; Caso 10: C: Reação Imunohistoquímica e D: Análise do Apério. Barra de 50 μm .

5.6 Análise da hibridização *in situ* da *Chlamydomphila pneumoniae*

A análise da presença de antígenos de *Chlamydomphila pneumoniae*, expressos em μm^2 de antígenos por 1 mm de extensão de segmento valvar, demonstrou que em ambas as áreas houve uma maior área de antígenos detectados no grupo de valvas com DM (G1), quando comparados com o grupo controle (G2), porém sem diferença estatística com mediana para o G1 de 9.905 (4.716 - 16.912) x 5.864 (2.382 - 8.692) com $p = 0,2$ e para o G2, mediana de 3.199 (1.791 - 10.746) x 2.536 (683 - 6.125) com $p = 0,3$. (Tabela 10 e Anexo 8.7). Não foi possível a análise de uma amostra tecidual do grupo das valvas com DM (caso número 6) e de 4 casos do grupo controle (casos número 31, 35, 46 e 49) devido à dificuldade de identificação das estruturas na lâmina.

Tabela 10 – Quantificação dos antígenos de *Chlamydomphila pneumoniae*.

Cp	G1			G2			valor de p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm) área 1	9.905 (858-109.886)	4716	16912	5.864 (857-69.765)	2382	8692	$p=0,200$
área 2	3.199 (118-20.769)	1791	10746	2.536 (0-51.447)	683	6125	$p=0,300$

Cp: *Chlamydomphila pneumoniae*; G1: grupo 1; G2: grupo 2; μm^2 : micrômetros quadrados; Ag: antígenos; mm: milímetros; P25 = percentil 25 (ou 1º Quartil); P75=percentil 75 (ou 3º Quartil).

A figura 10 compara as imagens histológicas da valva mitral normal e com degeneração mixomatosa em relação à pesquisa de antígenos da *Chlamydomphila pneumoniae* através do escaneamento pelo aparelho Scanscope CS System e digitalização através do programa Aperio Image Scope View Software.

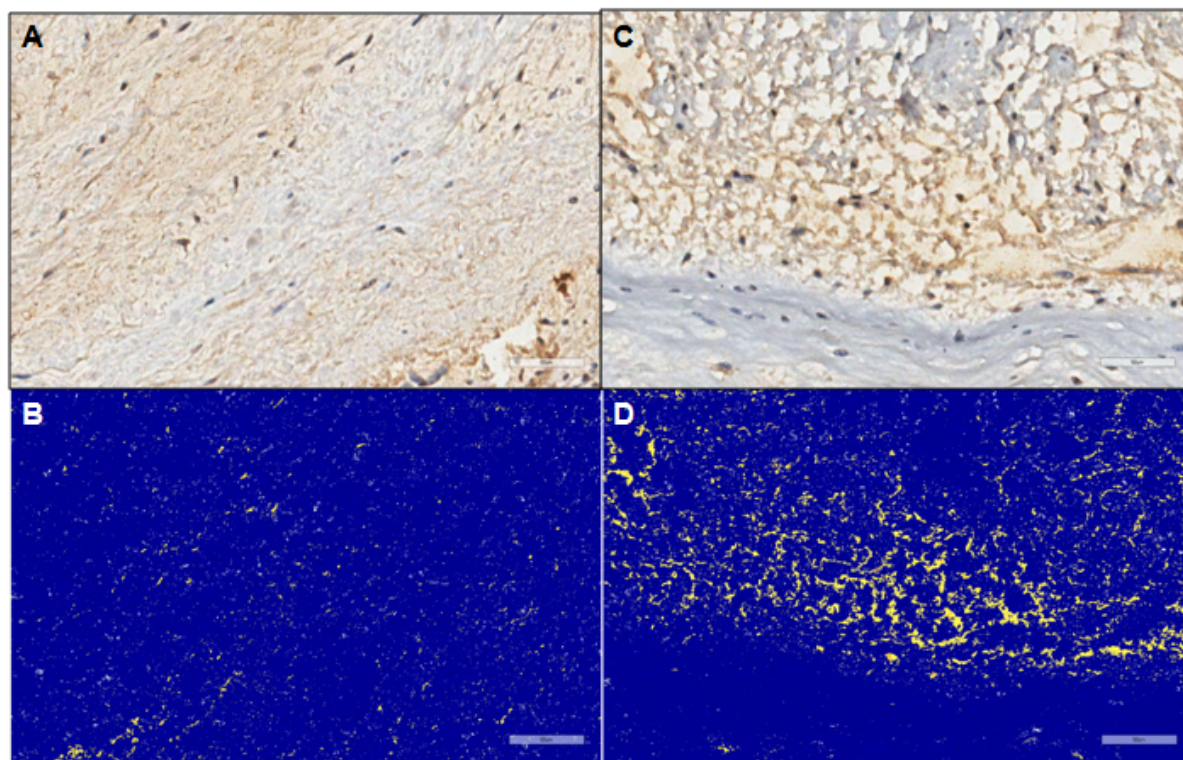


Figura 10 – Análise histoquímica dos antígenos da *Chlamydomonas pneumoniae*. A e B: grupo controle. C e D: grupo com degeneração mixomatosa. Os antígenos de Cp detectados são caracterizados pela cor amarelo. Caso 34: A: Reação Imunohistoquímica e B: Análise do Apério; Caso 28: C: Reação Imunohistoquímica e D: Análise do Apério. Barra de 50 μm .

5.7 Análise histoquímica da *Borrelia burgdorferi*

Em relação à presença de antígenos de *Borrelia burgdorferi*, expressos em μm^2 de antígenos por 1 mm de extensão de segmento valvar, houve uma área maior de antígenos detectados no grupo controle (G2), em ambas as áreas. Na área 1, mediana de 7.596 (3.203 - 13.519) x 10.584 (7.223 - 15.974) com $p = 0,14$ e na área 2, mediana igual a 5.991 (3.009 - 8.475) x 8.403 (1.626 - 27.887) com $p = 0,47$ (Tabela 11 e Anexo 8.7). Não foi possível a análise de uma amostra tecidual do grupo controle (caso número 49) devido à dificuldade de identificação das estruturas na lâmina.

Tabela 11 – Quantificação dos antígenos de *Borrelia burgdorferi*.

Bb	G1			G2			valor de p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)							
área 1	7.596 (1.359-25.926)	3203	13519	10.584 (0-42.413)	7223	15974	p=0,140
área 2	5.991 (1.104-27.028)	3009	8475	8.403 (455-83.711)	1626	27887	p=0,470

Bb: *Borrelia burgdorferi*; G1: grupo 1; G2: grupo 2; μm^2 : micrômetros quadrados; Ag: antígenos; mm: milímetros; P25 = percentil 25 (ou 1º Quartil); P75=percentil 75 (ou 3º Quartil).

A figura 11 compara as imagens histológicas da valva mitral normal e com degeneração mixomatosa em relação à pesquisa de antígenos da *Borrelia burgdorferi* através do escaneamento pelo aparelho Scanscope CS System, e digitalização através do programa Aperio Image Scope View Software.

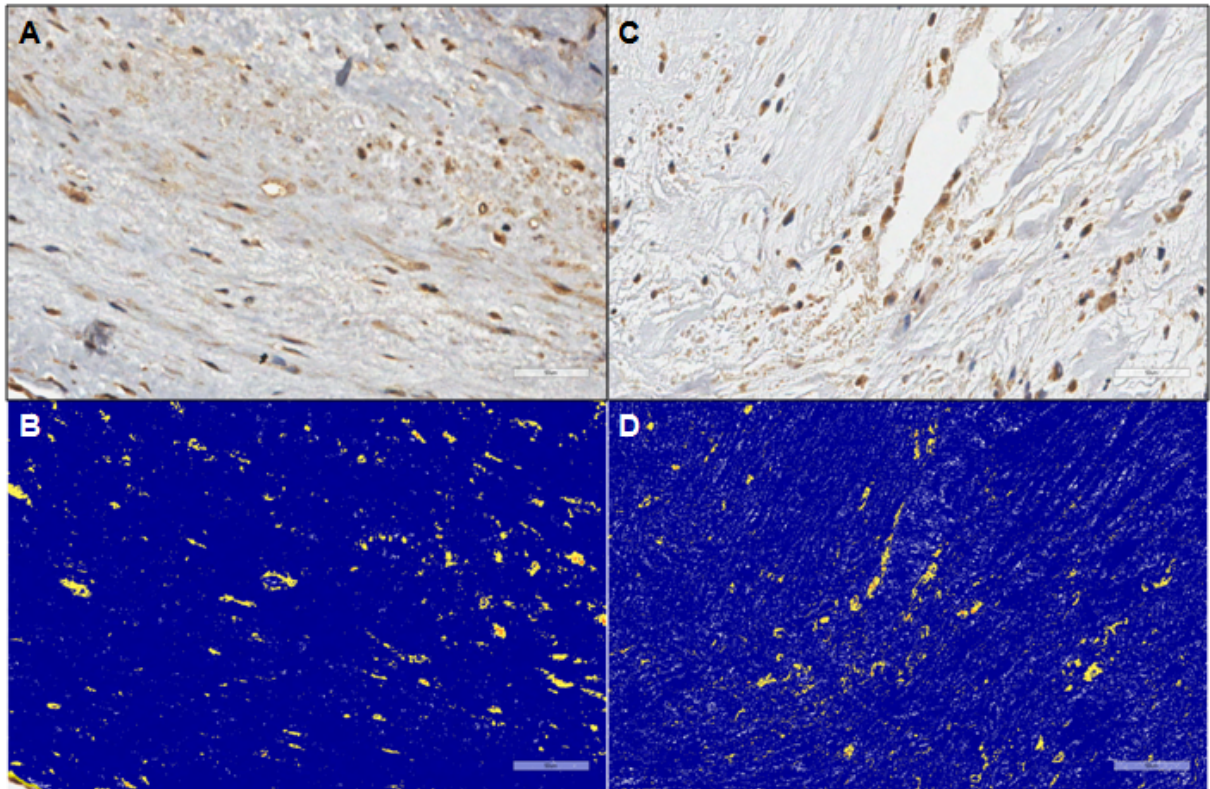
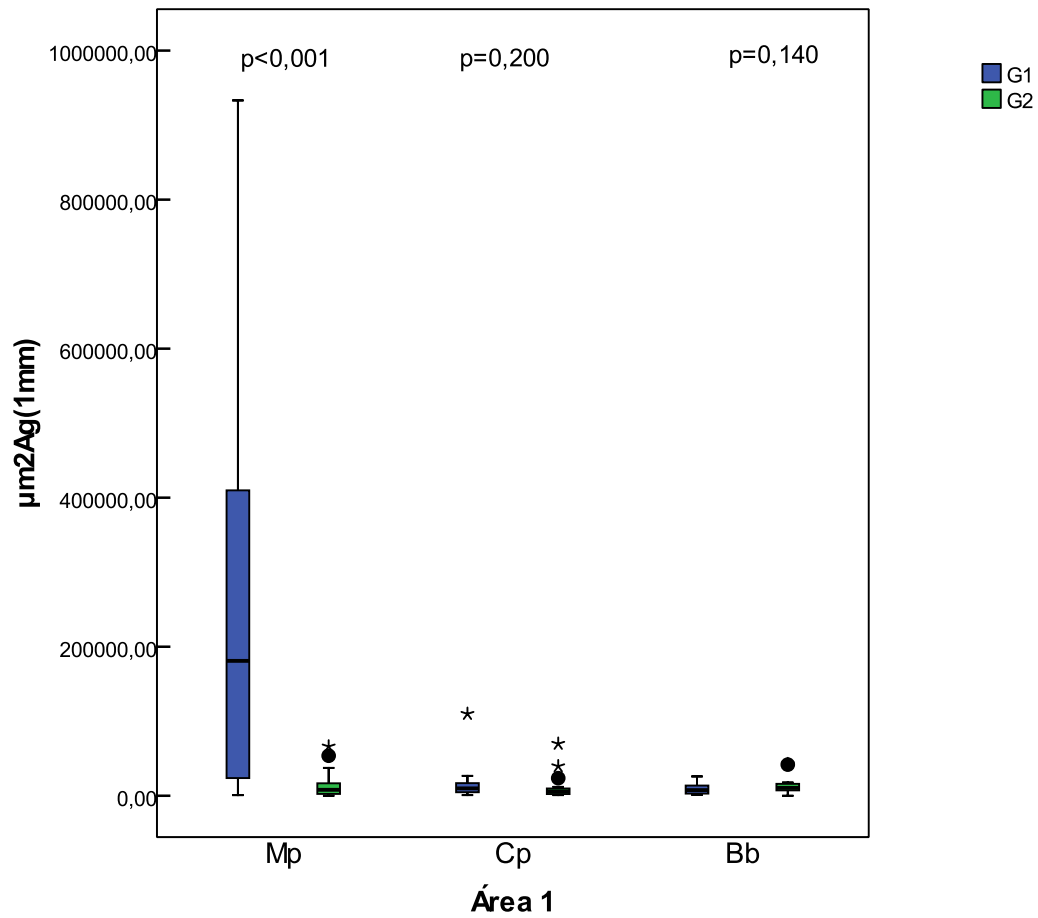


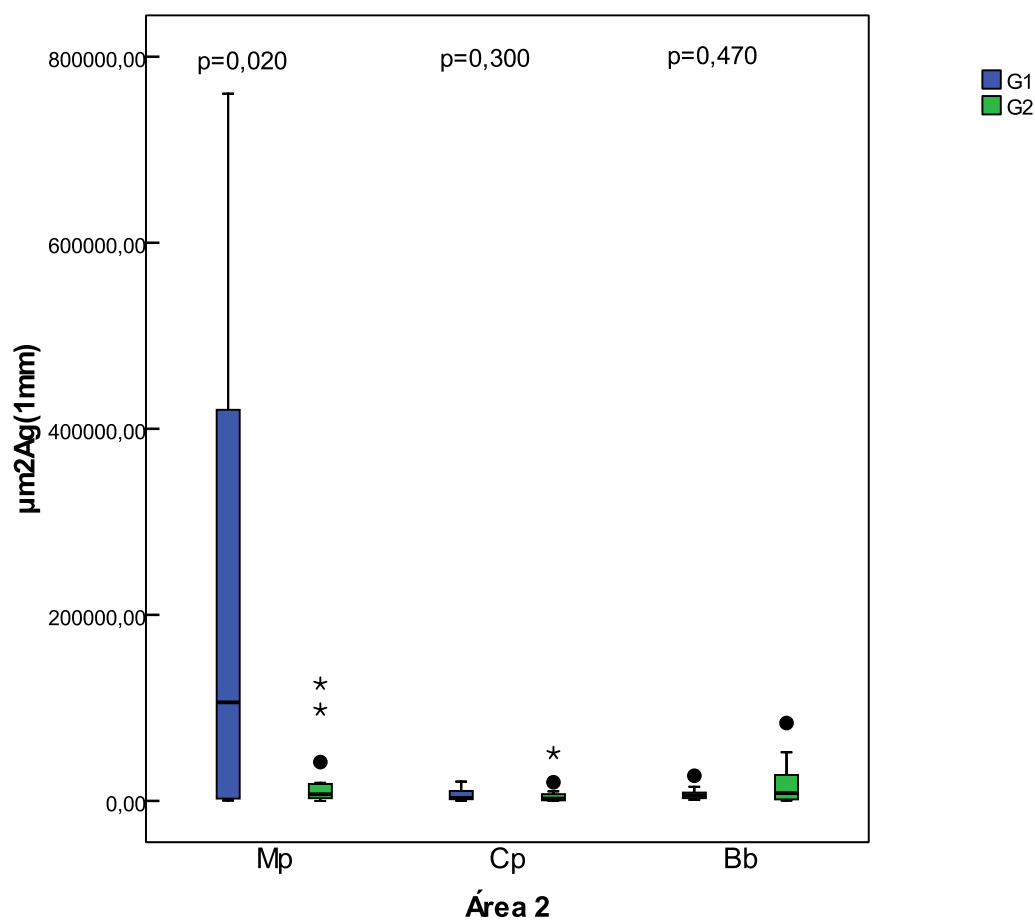
Figura 11 – Análise histoquímica dos antígenos da *Borrelia burgdorferi*. A e B: grupo controle. C e D: grupo com degeneração mixomatosa. Os antígenos de Bp detectados são caracterizados pela cor amarelo. Caso 32: A: Reação Imunohistoquímica e B: Análise do Apério; Caso 2, C: Reação Imunohistoquímica e D: Análise do Apério. Barra de 50 μm ;

Os gráficos 5 e 6 representam a análise estatística do número de antígenos identificados de *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* nas áreas 1 e 2 dos grupos 1 e 2.



μm^2 : micrômetros quadrados; Ag: antígenos; mm: milímetros; Mp: *Mycoplasma pneumoniae*; Cp: *Chlamydomphila pneumoniae*; Bp: *Borrelia burgdorferi*.

Gráfico 5 – Número de antígenos das bactérias *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* detectados na área 1 dos grupos 1 e 2.



μm^2 : micrômetros quadrados; Ag: antígenos; mm: milímetros; Mp: *Mycoplasma pneumoniae*; Cp: *Chlamydomphila pneumoniae*; Bp: *Borrelia burgdorferi*.

Gráfico 6 – Número de antígenos das bactérias *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* detectados na área 2 dos grupos 1 e 2.

5.8 Análise histoquímica da Metaloproteinase MMP9

Em relação à presença da metaloproteinase MMP9, expressa em μm^2 de antígenos por 1 mm de extensão de segmento valvar, observamos maior área de antígeno marcado de MMP9 no grupo com DM (G1), tanto na área 1 quanto na área 2, com diferença estatística significativa. Na área 1, encontramos mediana de

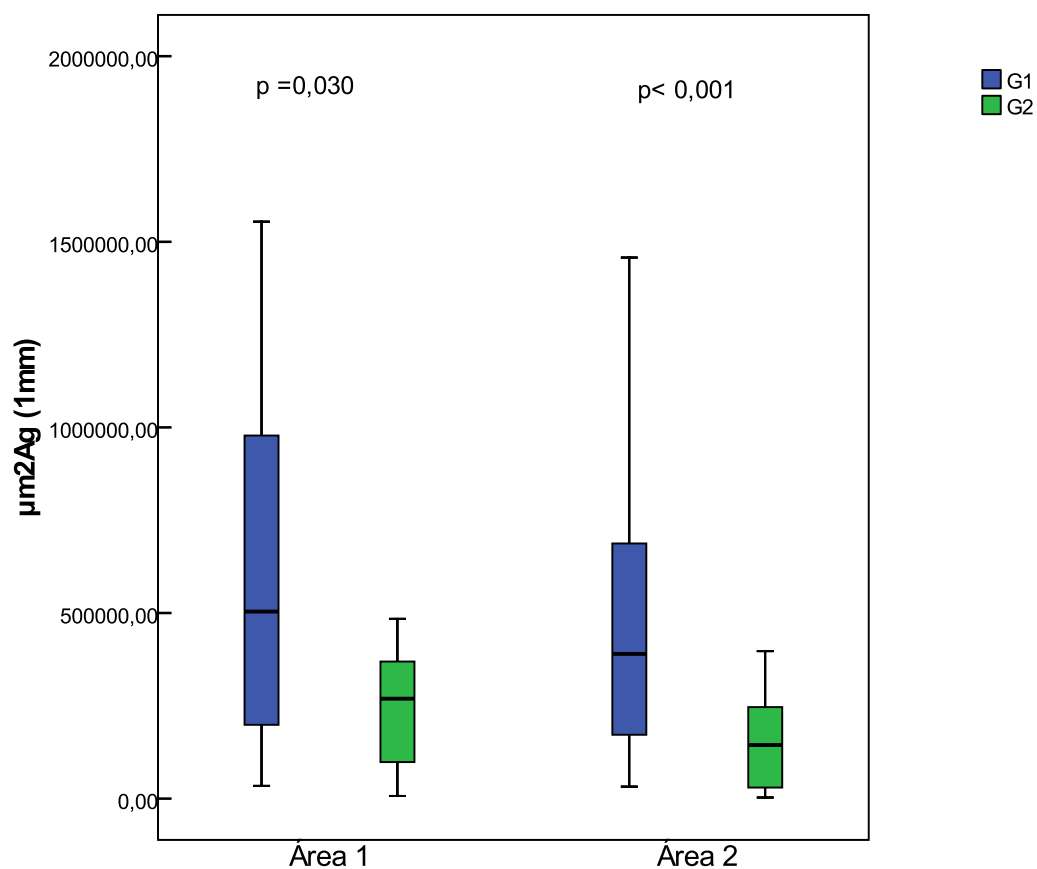
503.894 (202.428 - 938.072) x 269.244 (111.953 - 354.022) com $p = 0,03$. Na área 2, houve diferença estatística representada pela mediana de 389.844 (214.459 - 679.711) x 144.397 (29.894 - 247.453) com $p < 0,001$ (Tabela 12 e Anexo 8.7). Foram analisadas 100% das amostras teciduais.

Tabela 12 – Quantificação de antígenos de metaloproteinase MMP9.

MMP9 $\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)	G1			G2			valor de p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
área 1	503.894 (34.494-1.554.451)	202428	938072	269.244 (7.272-484.481)	111953	354022	$p=0,030$
área 2	389.844 (32.467-1.457.658)	214459	679711	144.397 (3.012-397.151)	29894	247453	$p<0,001$

MMP9: Metaloproteinase 9; G1: grupo 1; G2: grupo 2; μm^2 : micrômetros quadrados; Ag: antígenos; mm: milímetros; P25 = percentil 25 (ou 1º Quartil); P75=percentil 75 (ou 3º Quartil).

O gráfico 7 representa a análise estatística da porcentagem de área positiva de MMP9 no grupo 1, havendo diferença estatística significativa na área 2.



μm^2 : micrômetros quadrados; Ag: antígenos; mm: milímetros; MMP9: metaloproteinase 9

Gráfico 7 – Número de antígenos de MMP9 detectados nas áreas 1 e 2 dos grupos 1 e 2.

A figura 12 compara as imagens histológicas da valva mitral normal e com degeneração mixomatosa em relação à pesquisa de metaloproteinase MMP9 através do escaneamento pelo aparelho Scanscope CS System, e digitalização através do programa Aperio Image Scope View Software.

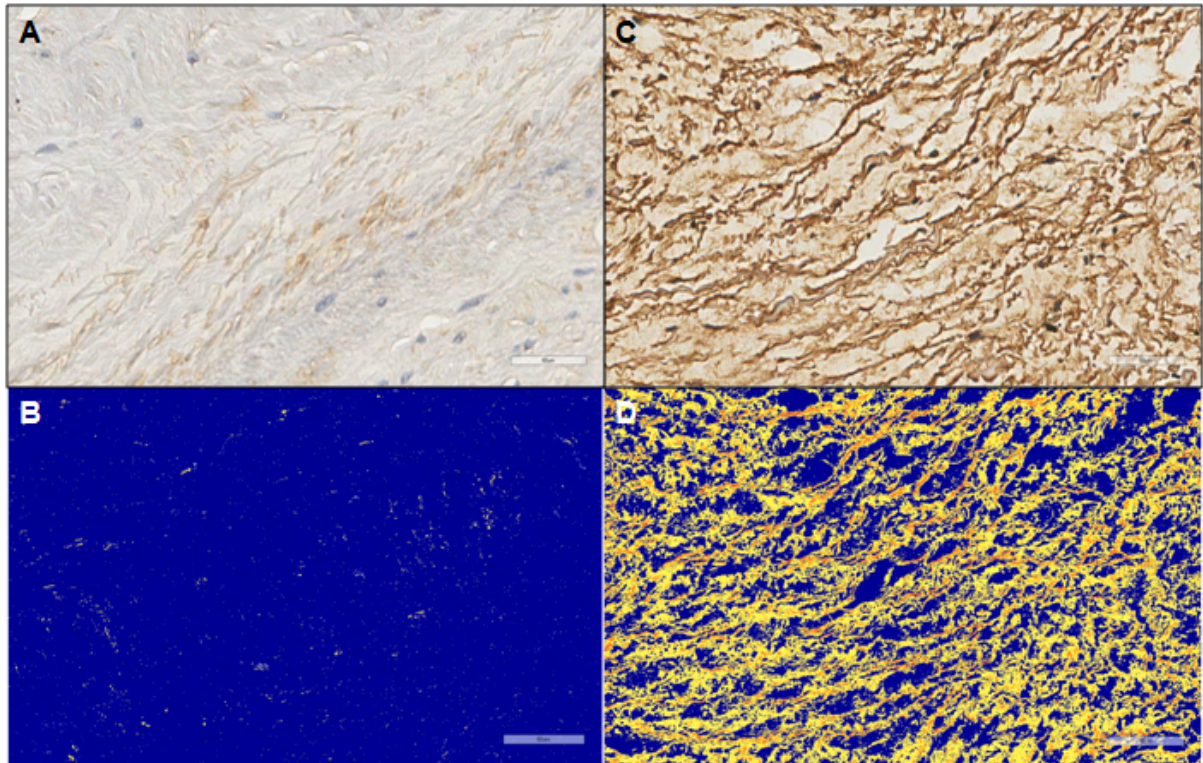


Figura 12 – Análise histoquímica dos antígenos da metaloproteinase MMP9. A e B: grupo controle. C e D: grupo com degeneração mixomatosa. Os antígenos de MMP9 detectados são caracterizados pelas cores amarelo e alaranjado. Caso 43, A: Reação Imunohistoquímica e B: Análise do Apério; Caso 3, C: Reação Imunohistoquímica e D: Análise do Apério. Barra de 50 μ m;

5.9 Análise das correlações entre antígenos bacterianos *versus* células inflamatórias *versus* MMP-9

Houve maior número de correlações significativas entre quantidade de antígenos bacterianos, células inflamatórias e a metaloproteinase no grupo de valvas com DM. No grupo DM houve correlação positiva entre *Borrelia burgdorferi* e porcentagem de DM com $r = 0,52$ e $p = 0,018$. Em relação às células inflamatórias, houve correlação positiva entre CD45 (células T) e *Mycoplasma pneumoniae* com r

= 0,51 e $p = 0,02$. A presença de MMP9 se correlacionou positivamente com a presença de *Mycoplasma pneumoniae* com $r = 0,45$ e $p = 0,04$. Estas correlações estiveram ausentes no grupo controle (Tabela 13).

Tabela 13 – Correlações entre antígenos bacterianos *versus* células inflamatórias *versus* MMP-9 nos grupos 1 e 2.

Grupo / correlações	G1		G2	
	r	p	r	p
Bb x % DM	0,52	0,018	0,15	0,5
CD45 x Mp	0,51	0,02	0,01	0,9
Mp x MMP9	0,45	0,04	0,17	0,6
Mp x % DM	-0,34	0,13	0,04	0,8
MMP9 x % DM	-0,02	0,91	0,4	0,07

G1: grupo 1; G2: grupo 2; r: valor de r; p: valor de p; Bb: *Borrelia burgdorferi*; Mp: *Mycoplasma pneumoniae*; Cp: *Chlamydophila pneumoniae*.

5.10 Análise da microscopia eletrônica (ME)

A microscopia eletrônica revelou a presença de estruturas compatíveis com microrganismos com características de borrelia e micoplasmas. (Figura 13 e Anexo 8.8).

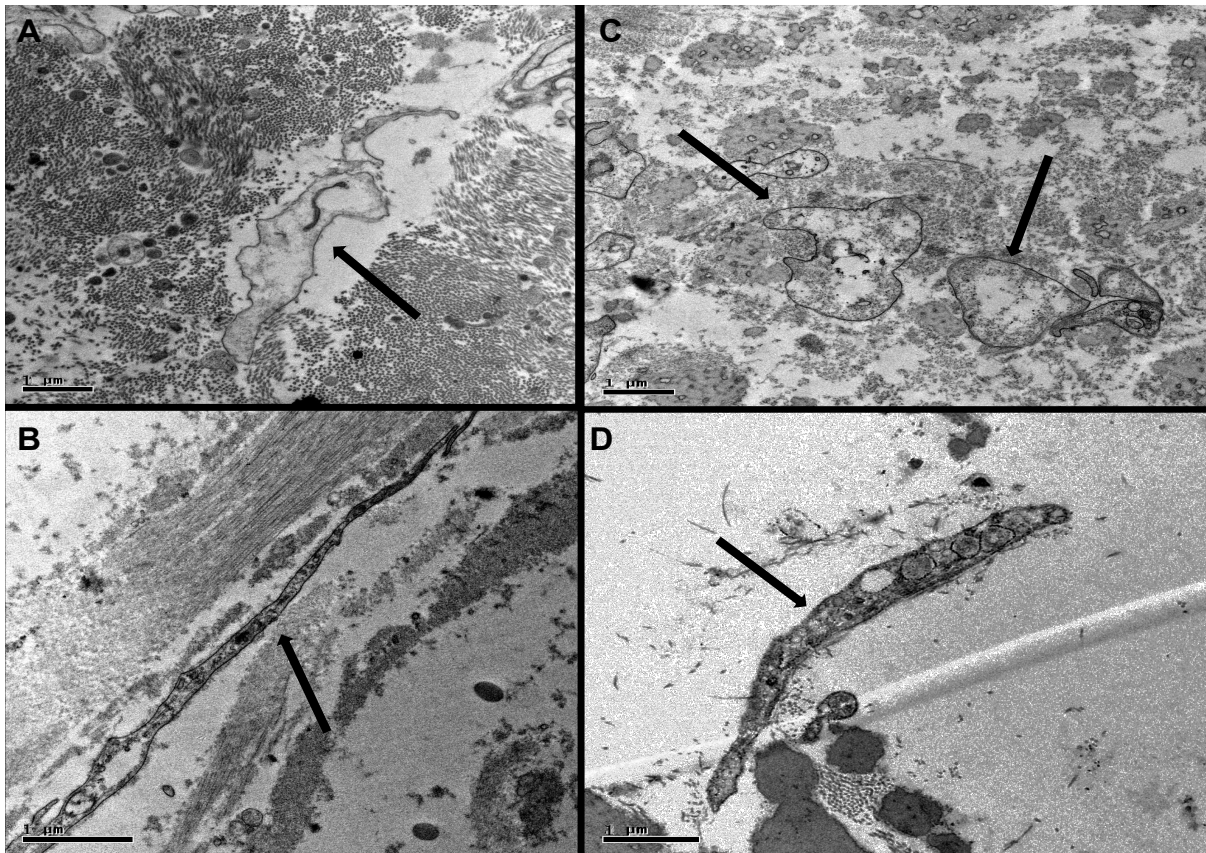


Figura 13 - Identificação bacteriana pela microscopia eletrônica de transmissão. A: Microrganismo com características de micoplasma (seta) longo, apresentando única membrana envoltória e uma estrutura semelhante à espiroqueta no citoplasma, em meio a tecido colágeno pouco fragmentado, identificado no grupo controle (caso 31); B: Estrutura compatível com borrelia, longa e sinuosa, (seta) identificada no grupo controle (caso 33); C: Estruturas compatíveis com micoplasmas arredondados, única membrana envoltória, contendo vacúolos claros no citoplasma (setas) identificado no grupo DM (caso 36); D: Microrganismo com estrutura ondulada compatível com espiroqueta, contendo organelas ou endossimbiontes no interior, compatível com borrelia (seta) alongada, contendo vesículas claras em meio a tecido colágeno intensamente fragmentado identificada no grupo DM (caso 10). Barra de 1 µm.

De acordo com a análise da microscopia eletrônica, observamos que os microrganismos identificados no grupo DM são menores e mais finos quando comparados com as bactérias do grupo controle (tabela 14). Além da visualização de estruturas com características de borrelia e micoplasma, observamos também numerosos microrganismos não identificados com aspecto semelhante às bactérias da classe dos *Mollicutes* [63].

Tabela 14 – Medida do tamanho dos microrganismos identificados pela ME.

		G1 (nm)	G2 (nm)	Valor de p
Micoplasma	comprimento	1799,1	2.678,9	p = 0,002
	largura	681,7	938,5	p = 0,02
Borrelia	comprimento	3886,1	5194,2	p = 0,05
	largura	437,6	3588,1	p = 0,37

G1: grupo 1; G2: grupo 2; P: valor de P; nm: nanômetros.

Além disso, percebemos que a presença de borrelia se associou com maior grau de degeneração ao seu redor nos segmentos valvares com degeneração mixomatosa, o que pode ser visualizado na figura 14.

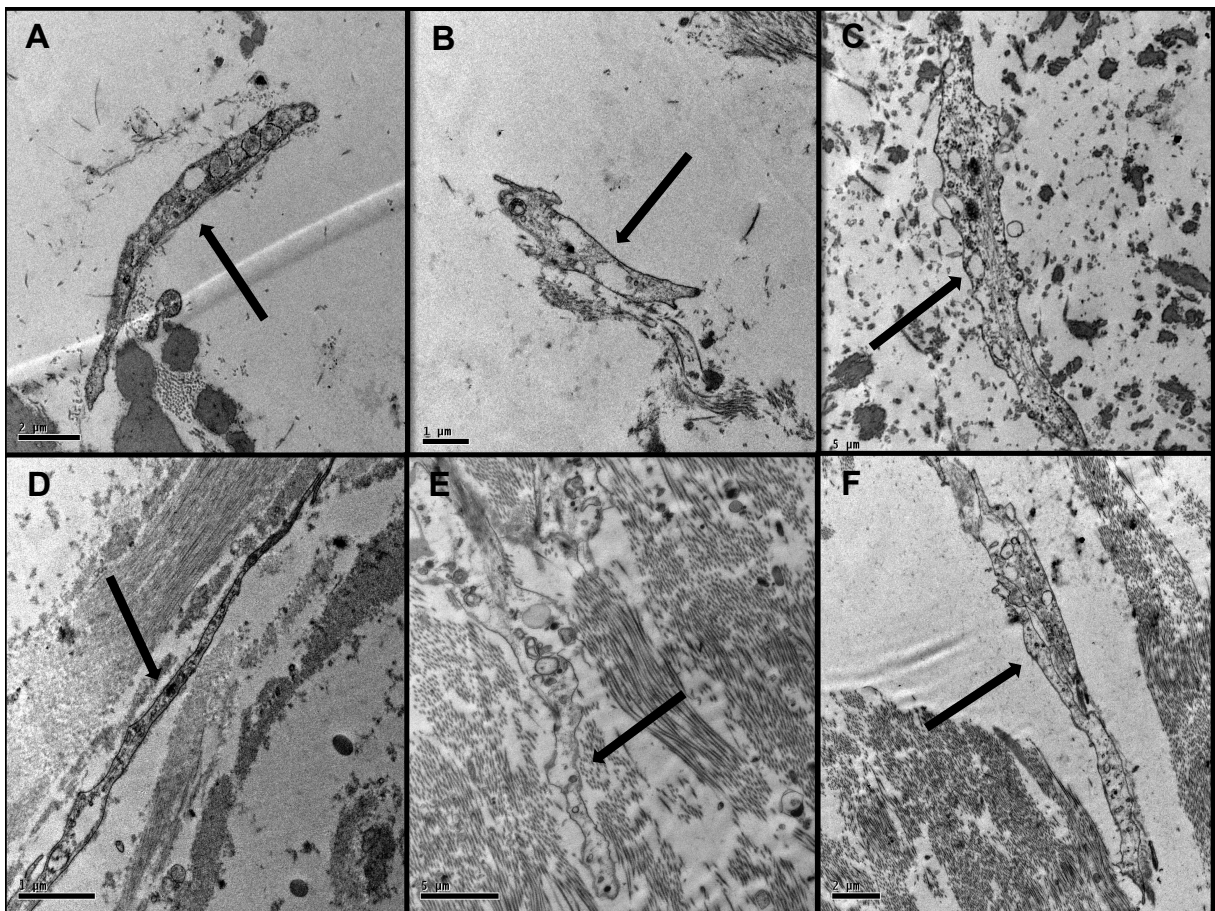


Figura 14 – Características da borrelia pela microscopia eletrônica de transmissão (seta). Observa-se intensa degeneração do colágeno ao redor da borrelia no grupo DM (A, B e C). O colágeno do grupo controle encontra-se mais preservado (D, E e F). Barra de 1 μm em B e D, barra de 2 μm em A e F, barra de 5 μm em C e E.

6 Discussão

O aparelho valvar mitral se localiza entre o átrio e o ventrículo esquerdo do coração e tem como função o controle do fluxo sanguíneo entre estas cavidades. Compreende um conjunto de estruturas que envolvem o anel fibroso, as cúspides anterior e posterior, as cordas tendíneas, os músculos papilares ântero-lateral e pósteromedial, o endocárdio atrial e ventricular, a musculatura miocárdica das paredes do átrio e do ventrículo esquerdo adjacente, além da junção mitro-aórtica. A manutenção da integridade anátomo-funcional destas estruturas permite uma coaptação adequada das cúspides anterior e posterior durante a sístole, evitando o refluxo sanguíneo para o átrio esquerdo [64].

As cúspides da valva mitral são derivadas de excrescências mesenquimais embrionárias, e as células valvares são provenientes de células do endocárdio que foram submetidas a uma transformação epitélio-mesenquimal regulada pelo miocárdio e de células que migraram a partir de locais extra-cardíacos durante o desenvolvimento embrionário [20,65].

A valva mitral é uma estrutura complexa composta por elementos celulares e não celulares (matriz de colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos e glicoproteínas), que em conjunto possuem funções especiais que permitem o perfeito funcionamento valvar [20]. Os elementos da matriz extra-celular se acomodam e mudam seu formato durante o ciclo cardíaco. As células intersticiais têm uma importância vital para a manutenção da função valvar, pois secretam elementos da matriz extra-celular que a reparam e a remodelam tornando a valva resistente [23]. A renovação e a proliferação destas células ainda não estão totalmente esclarecidas. Elas apresentam baixa taxa de proliferação e sua produção diminui com a idade, o que

resulta em uma degeneração das fibras de colágeno [20,22]. As células valvares intersticiais podem contribuir para a destruição da matriz e para sua remodelação na degeneração mixomatosa da valva mitral, pois elas assumem características de miofibroblastos ativados, sendo a principal fonte do aumento da expressão de enzimas proteolíticas, à semelhança das metaloproteinases, que medeiam a degradação de matriz extra-celular. A valvopatia mitral mais frequente é causada pela degeneração mixomatosa e esta apresenta etiologia multifatorial e ainda não esclarecida.

Em nosso estudo, pesquisamos e comparamos valvas mitrais com degeneração mixomatosa em pacientes submetidos à cirurgia valvar mitral, sem outras comorbidades cardiovasculares como coronariopatias ou doenças da aorta, e valvas mitrais “*pós-mortem*” sem história clínica de valvopatias. A análise foi realizada em duas áreas de um mesmo segmento valvar para que tivéssemos maiores detalhes do comportamento da degeneração mixomatosa. O grupo das valvas mitrais com DM apresentou espessamento difuso e com arquitetura comprometida, principalmente pela distorção da camada esponjosa, enquanto a degradação do colágeno dos segmentos valvares de indivíduos do grupo controle é mais localizada e não compromete a cúspide completamente. Ambos os grupos têm idade média em torno de 67 anos e o comprometimento valvar no grupo controle pode ser explicado pela progressão da degeneração da matrix extra-celular pela idade através da ação de enzimas colagenolíticas secretadas pelas células intersticiais causando anormalidades no colágeno [23]. Além disso, nos pacientes do grupo controle identificamos alguns focos de degeneração com características histológicas compatíveis com DM que não foram suficientes para levar a um desarranjo na estrutura valvar. De acordo com a classificação de gravidade da

degeneração mixomatosa proposta por Akiyama et al., que avalia a quantidade de glicosaminoglicana ácida na zona esponjosa, os segmentos valvares do grupo 1 apresentaram-se no estágio III (grave) da doença, que representa um comprometimento maior que 50% com mediana de 57,6% contra mediana de 29,9% (estágio II, moderado) do grupo 2 ($p = 0,013$) [66].

No presente estudo, as valvas com degeneração mixomatosa apresentaram, quando comparadas com os segmentos valvares do grupo controle, maior número de antígenos detectados por μm^2 de metaloproteinase MMP9. Resultados semelhantes foram descritos por Rabkin et al, e outros, que identificaram, além da MMP9, outras colagenases como a MMP1, MMP2 e MMP13 e sua relação com a degradação do colágeno e a degeneração mixomatosa [23,40].

Os linfócitos B e linfócitos T desempenham importante papel na imunidade humoral e celular, respectivamente, produzindo anticorpos, citocinas e perforinas. Em nosso trabalho, na análise histoquímica dos marcadores de linfócitos B e T, CD20 e CD45, identificamos uma inflamação mais intensa nas valvas com degeneração mixomatosa, representada pela maior quantidade de células/ mm^2 de CD20 e CD45. Barth et al. publicaram trabalho que analisou a presença de fibrócitos CD34⁺ em 15 valvas com degeneração mixomatosa e em 10 valvas sem degeneração, e observaram que estas células parecem estar morfológicamente alteradas e em maior número [67]. Os fibrócitos CD34⁺ sintetizam a MMP-9, bem como o colágeno tipo I e III, que são fatores envolvidos na etiologia da doença mixomatosa da valva mitral [44,68,69]. Os autores descrevem que os fibrócitos CD34⁺ observados no estroma da válvula mitral são responsáveis pela reparação fisiológica da válvula e que a doença da válvula mixomatosa pode estar relacionada a um processo de reparação alterado, e supostamente iniciada por um estresse

hemodinâmico anormal, portanto fazem parte da fisiopatologia da degeneração mixomatosa da valva mitral. Em outro artigo que avaliou a presença de células inflamatórias na etiopatogenia da DM, Veinot et al. analisaram 5 valvas com DM e observaram um aumento do número de células marcadoras de mastócitos (CD117) e participando, portanto, do processo inflamatório desencadeado pela degeneração mixomatosa. As células CD117 são células jovens que foram identificadas em valvas mitrais e representam uma certa capacidade de regeneração do coração frente a um estresse, trauma ou isquemia [6].

Em nosso estudo, identificamos também a presença de células CD68, marcadores de macrófagos, em maior quantidade nos segmentos valvares do grupo controle. Rabkin et al. associaram a presença de macrófagos em valvas mitrais normais com uma menor quantidade de enzimas proteolíticas [23]. Portanto, quanto maior o número de células CD68, menor o grau de atividade proteolítica e menor a taxa de degradação do colágeno. Em nosso estudo encontramos um achado similar, no qual o grupo controle apresentou maior quantidade de macrófagos. Apesar da menor quantidade de CD68 nas valvas com DM, estas valvas tiveram maior quantidade de linfócitos B e T. Os linfócitos T são citotóxicos e liberam citocinas como a perforina, a granzina e a gramesilina, que levam à apoptose celular, contribuindo para a degradação do colágeno.

A presença de bactérias na etiopatogenia da degeneração mixomatosa ainda não foi descrita na literatura. A presença de microrganismos, como simbiontes de hospedeiros, é um aspecto não muito bem entendido, porém cada vez mais vem sendo estudado. Acredita-se que simbiontes microbianos podem fundamentalmente alterar a fisiologia do organismo hospedeiro, e por vezes conferir novas habilidades que resultam em um indivíduo mais adaptado ou mais saudável [70]. Essa

adaptação inclui a expansão do nicho ecológico, que permite ao organismo hospedeiro utilizar melhor o alimento e confere resistência ao estresse ambiental, a predadores ou parasitas. Nessa situação ambos os lados se beneficiam da simbiose. Na agricultura, a presença de fungos em simbiose com bactérias tem sido um dos aspectos estudados no combate a pragas [71].

Em trabalhos prévios, Higuchi et al. observaram a presença de algumas bactérias em simbiose com o hospedeiro, conferindo uma aparente proteção ao sistema cardiovascular. Assim, no coração do paciente chagásico na forma indeterminada, a presença de *Mycoplasma pneumoniae* foi protetora contra a presença de outros agentes como a *Chlamydomphila pneumoniae* [72].

No entanto, a presença de várias bactérias em simbiose se associou à formação de lesão ao tecido. Na placa de ateroma, a associação entre *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydomphila pneumoniae* se associou à proliferação de ambos, com inflamação, degradação do colágeno e formação da placa vulnerável [10,11]. Na valva aórtica, a proliferação de *Chlamydomphila pneumoniae* e de *Mycoplasma pneumoniae* se associou à calcificação do tecido, com estenose da valva aórtica [11,49]. Rogério et al. estudaram a relação entre *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydomphila pneumoniae* nos aneurismas de aorta e identificaram a presença destas bactérias na camada adventícia da aorta. A *Chlamydomphila pneumoniae* também foi encontrada no grupo controle, porém sem significância estatística. Houve identificação dos antígenos bacterianos em 100% dos casos e autores concluem que os agentes infecciosos podem favorecer o desenvolvimento dos aneurismas iniciando a inflamação e contribuindo para o processo da doença [55]. Em recente artigo, Mangini et al. detectaram a presença de *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi*, em corações com

miocardiopatia dilatada, incluindo a doença de Chagas [73]. A disseminação da *Chlamydomphila pneumoniae* pode advir do trato respiratório pelos macrófagos alveolares, que funcionam como vetores promovendo acesso aos vasos sanguíneos [74].

Uma íntima interação entre diferentes espécies microbianas leva a uma comunidade mais estável e eficiente, e essa evolução ocorre dentro de um ambiente espacialmente bem estruturado, que estabiliza a interação entre as espécies provocando marcadas mudanças na natureza simbiótica e afetando a função da comunidade microbiana [75]. Quando mais de uma espécie de microparasitas infecta o mesmo hospedeiro, as interações entre estes parasitas podem exacerbar seus efeitos simbióticos e imunológicos [76,77].

No presente trabalho identificamos que as valvas do grupo controle têm maior quantidade de antígenos de *Borrelia burgdorferi* do que o grupo DM. Esse pode ser o padrão normal da valva mitral, para essa idade. Entretanto, nas valvas com degeneração mixomatosa, a presença de *Borrelia burgdorferi* se associou com um maior grau de degeneração mixomatosa, e a interação com a *Mycoplasma pneumoniae* e a *Chlamydomphila pneumoniae* pode ter contribuído para a degradação do colágeno através do efeito simbiótico entre estes três agentes. Tendo em vista que encontramos *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* em ambos os grupos, mas em quantidades e morfologias diferentes, estes agentes podem também influenciar em respostas diferentes na degradação do colágeno. A presença de *Mycoplasma pneumoniae* hiperativa macrófagos com consequente ativação de células T citotóxicas, que podem induzir a apoptose de fibroblastos [78]. Além disso encontramos, no grupo 1, uma correlação positiva e significativa entre a presença de MMP9 e *Mycoplasma pneumoniae*. Deste modo, a *Mycoplasma*

pneumoniae pode predispor as células intersticiais a secretar MMP9, facilitando e contribuindo para o processo de degeneração mixomatosa.

A reação de imunohistoquímica para antígenos de *Borrelia burgdorferi* pode estar marcando borrelias de outras espécies e que dão reação cruzada, tendo em vista que esta borrelia não foi ainda descrita no nosso país. A *Borrelia burgdorferi*, causadora da doença de Lyme, jamais foi isolada no Brasil e os ensaios sorológicos específicos exibem positividade baixa e oscilante. Além disso, o exame do sangue periférico dos pacientes, quando analisado por meio de microscopia eletrônica, exhibe estruturas sugestivas de *Mycoplasma spp*, *Chlamydia spp* e bacteroides [79]. Na verdade, estas estruturas podem representar as formas latentes das espiroquetas (forma L ou bactérias desprovidas de parede), adaptadas a sobreviver em condições inóspitas em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Assim, esta zoonose presente em nosso país recebeu a denominação de Síndrome *Baggio-Yoshinari* e é definida como: “Enfermidade infecciosa nova e emergente brasileira, transmitida por carrapatos não pertencentes ao complexo *Ixodes ricinus*, causada por espiroquetas na sua morfologia atípica e latente, que origina manifestações clínicas semelhantes às observadas na doença de Lyme, exceto pela ocorrência de recidivas clínicas e desordens autoimunes” [80]. Já foi sugerido que cepas de *Borrelia burgdorferi* interagem competitivamente com o hospedeiro. Três tipos de competitividade podem contribuir para esta interação: interferência, exploração e aparência, ou seja, uma cepa primária pode diminuir o sucesso de transmissão de uma cepa secundária; uma cepa pode explorar e esgotar de forma mais eficiente um recurso de proteção de outra cepa; e, por fim, uma cepa pode priorizar a resposta imune do hospedeiro para atingir uma outra cepa, num processo que se assemelha à concorrência por aparência [81,82]. Em recente estudo, Devevey et al. analisaram três diferentes

cepas de *Borrelia burgdorferi sensu strictu* em 36 ratos, e detectaram a presença de forte e competitiva interação inibitória entre as cepas. Em todos os casos, a cepa que infectou primeiro teve uma vantagem de aptidão, principalmente porque a colonização dos tecidos dos ratos pelas cepas subsequentes foi inibida. Esta inibição da infecção provavelmente ocorre pela produção de anticorpos específicos contra os antígenos proteicos de *Borrelia* [83]. A diversidade de cepas de *Borrelia burgdorferi* permanece elevada em muitas áreas geográficas [84]. A expansão de *Borrelia burgdorferi* em novas áreas geográficas ou mudanças nos comportamentos de carrapatos infectados em resposta à mudança climática pode aumentar o impacto do efeito de prioridade sobre as interações competitivas entre elas e fazer com que as linhagens de *Borrelia burgdorferi* mais comuns, que são também as mais infecciosas em seres humanos, tornem-se ainda mais prevalentes [85].

Em nosso estudo, a microscopia eletrônica mostra formas onduladas compatíveis com *Borrelia*, mas não consegue distinguir a espécie.

A identificação das bactérias e sua relação com a degradação do colágeno e com o aumento da inflamação local pode facilitar o processo de degeneração mixomatosa. Esta presença de múltiplos simbioses em simbiose é o que parece contribuir para a gênese da DM. Desta forma acreditamos que o diagrama proposto por Rabkin et al. poderia ser modificado adicionando as bactérias *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* como fatores causadores da degeneração mixomatosa (Figura 15). Futuros trabalhos com maior número de casos, e pesquisa de outros agentes como, por exemplo, arqueias e colagenases de arqueias podem ajudar a desvendar melhor a presente proposição. A pesquisa de bactérias *Borrelia burgdorferi* e *Mycoplasma pneumoniae* marcadas com antígenos de MMP9 pode elucidar a associação delas com a degradação do colágeno.

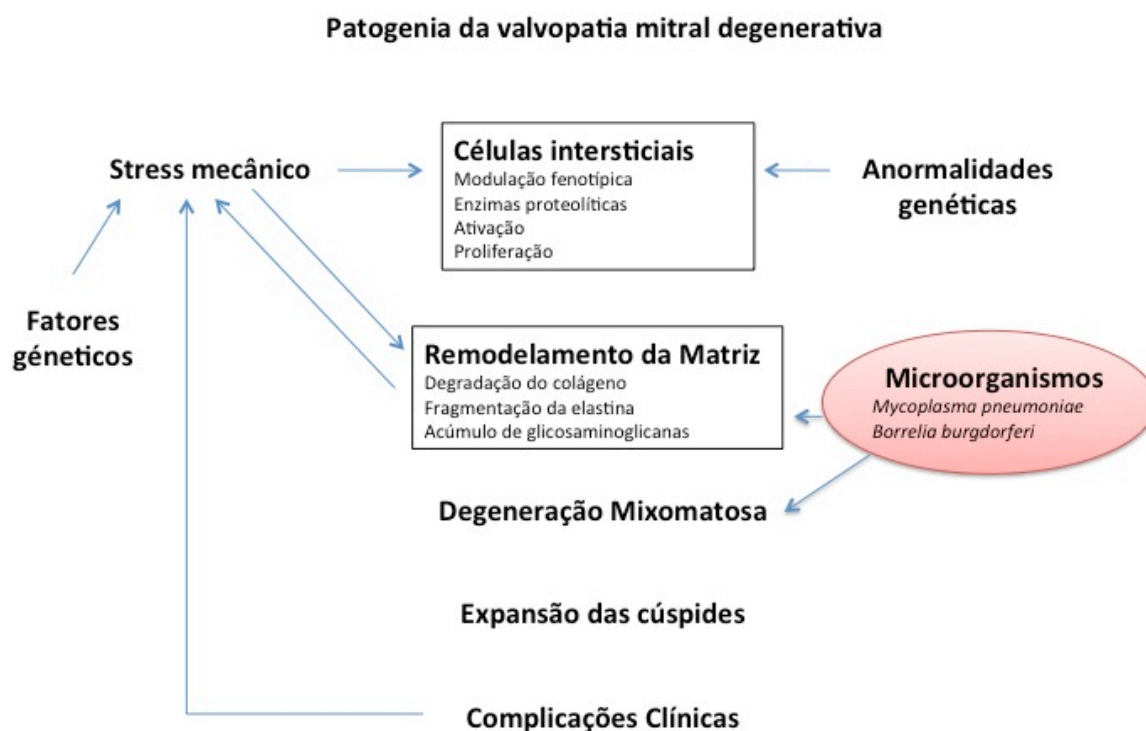


Figura 15 Diagrama modificado da patogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral.
Adaptado de Rabkin et al. [23].

Todas estas alterações poderiam contribuir para uma deterioração valvar pós-operatória tardia após plásticas valvares. A plástica valvar não cura o processo degenerativo subjacente, e a regurgitação mitral recorrente é um problema em potencial nesses pacientes, independentemente da sua condição clínica no momento da cirurgia. Em recente estudo, David et al. analisaram os resultados tardios em 840 pacientes submetidos a plástica valvar mitral por insuficiência mitral degenerativa e houve insuficiência mitral grave em 37 pacientes, e moderada em 61

pacientes durante o seguimento médio de 10,3 anos. Isto é equivalente a cerca de um terço de todos os pacientes que desenvolvem insuficiência mitral recorrente. Aos 20 anos, a curva livre de insuficiência mitral grave foi de 90,7%, e moderada ou grave foi de 69,2% [86]. Outros autores identificaram curva livre de insuficiência mitral moderada ou grave de 77% em 5 anos e de 81% em 10 anos [87,88]. São fatores preditores independentes de regurgitação mitral recorrente: o prolapso isolado da cúspide anterior e a degeneração mixomatosa avançada [86].

Portanto, cabe aos profissionais envolvidos no tratamento das valvopatias aprofundar cada vez mais seu conhecimento sobre os fatores contribuintes na etiologia da degeneração mixomatosa. Assim, no futuro, o tratamento adequado de cada fator envolvido na gênese da DM poderá diminuir a chance da disfunção valvar pós-operatória.

Estamos conscientes das limitações do nosso estudo, principalmente em relação as restrições do desenho metodológico, quanto ao tamanho da amostra e pelo fato de haver doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e aneurisma de aorta presentes no grupo controle, apesar de sua pouca influência nos resultados (Anexo 8.9). Este estudo é o passo inicial de uma pesquisa que sustenta a hipótese de que a ação simbiótica entre as bactérias *Mycoplasma pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* e *Chlamydomphila pneumoniae* desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da degeneração mixomatosa da valva mitral. Um maior número de estudos poderiam confirmar esta relação causal.

7 Conclusões

- 1 - Houve associação dos agentes infecciosos *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* na etiopatogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral.

- 2 - Na análise da relação dos produtos bacterianos com os marcadores inflamatórios e com a metaloproteinase, houve relação positiva entre o marcador inflamatório CD45 e a metaloproteinase (MMP9) apenas com a *Mycoplasma pneumoniae*, nas valvas com degeneração mixomatosa. O marcador inflamatório CD68 foi encontrado em maior número no grupo controle.

8.1 Aprovação da CAPPesq



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

A

Comissão Científica do INCOR

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão de 25.04.12 a execução do subprojeto intitulado "**ESTUDO BIOMOLECULAR DE PRODUTOS DE CHLAMYDIA PNEUMONIAE E MYCOPLASMA PNEUMONIAE NA ETIOPATOGENIA DA DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VALVA MITRAL**" que será tese de Doutorado do aluno **Marcos Gradim Tiveron**, tendo como orientador o Prof. Dr. Pablo M. Alberto Pomerantzeff.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0029/04**, intitulado "**A PARTICIPAÇÃO DE MICRORGANISMOS NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS INFLAMATÓRIAS, DEGENERATIVAS E CONSUMPTIVAS EM HUMANOS E ANIMAIS**" tendo como Responsável o **Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi**.

CAPPesq, 25 de Abril de 2012.

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
10/05/2012
Jabiana

8.2 Termo de consentimento livre e esclarecido – InCor

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Estudo biomolecular de produtos de *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* na etiopatogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral.**

PESQUISADOR: **Dr. Marcos Gradim Tiveron**.....

CARGO/FUNÇÃO: **Aluno de pós-graduação**..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 108.057.....

UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade Cirúrgica de Cardiopatias Valvares**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: **48 meses**.....

1 – Desenho do estudo e objetivo(s) “**essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa estudar se produtos de bactérias (clamídia, micoplasma e borrelia) estão presentes e associados com a etiologia da degeneração mixomatosa da valva mitral presentes no fragmento de válvula que será retirado durante a correção cirúrgica.**

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros - **O paciente será submetido a um procedimento cirúrgico para correção da disfunção valvar mitral e o segmento doente da valva mitral do coração será enviado para análise sem comprometer o resultado cirúrgico.**

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos; **Durante o procedimento cirúrgico fragmentos da valva mitral serão retirados e encaminhados para exame ao laboratório de Patologia para avaliação e comparação com valvas doentes da etiologia da doença mixomatosa. O presente projeto tem como finalidade utilizar para estudos desses fragmentos, além das técnicas convencionais da Patologia, outras técnicas procurando novos elementos que possam explicar melhor por que se desenvolve essa doença. Não haverá necessidade de coleta sanguínea.**

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3; **Nenhum desconforto adicional.**

5 – Benefícios para o participante. **Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo que testa a hipótese de que agentes infecciosos tipo clamídia, micoplasma e borrelia estejam favorecendo o desenvolvimento de inflamação e/ou infecção que pode contribuir para o desenvolvimento da doença valvar mixomatosa. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício sobre o mecanismo de doença, não implicando em melhoria no tratamento. No entanto, o melhor entendimento dos mecanismos que levam ao desenvolvimento da doença pode levar a um melhor tratamento ou prevenção no futuro;**

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar- **Nenhum que se relacione ao fato de participar do presente projeto;**

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. **Os principais investigadores são o Dr. Marcos G. Tiveron, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 44 Telefone(s) (11)26615415 (14)96709033, a Dra. Maria de Lourdes Higuchi, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 44 Telefone(s) 1126615541 e o cirurgião Dr. Pablo Pomerantzeff. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br**

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade – **As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;**

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: **não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.**

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Declaro ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. **Estudo biomolecular de produtos de *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* na etiopatogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral.**”

Eu discuti com o Dr. Marcos G. Tiveron e com Prof. Dr. Pablo M. A. Pomerantzeff sobre minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

8.3 Termo de consentimento livre e esclarecido – SVO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Estudo biomolecular de produtos de *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* na etiopatogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral.**

PESQUISADOR : **Dr. Marcos Gradim Tiveron**.....

CARGO/FUNÇÃO:**Aluno de pós-graduação**..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº108.057.....

UNIDADE DO HCFMUSP:**Unidade Cirúrgica de Cardiopatias Valvares**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA :**48 meses**.....

1 – Desenho do estudo e objetivo(s) **essas informações estão sendo fornecidas para participação voluntária neste estudo, que visa estudar se produtos de bactérias (clamídia, micoplasma e borrelia) estão presentes e associados com a etiologia da degeneração mixomatosa da valva mitral em comparação com valva mitral coletada em pessoas, sem doença valvar prévia, que sofreram processo de morte súbita.**

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros - **Seu familiar será submetido a um procedimento junto com a necropsia para retirada de um pequeno segmento da valva mitral e do endocárdio do coração que será encaminhado para análise anatomo-patológica. Não haverá prejuízo para o corpo ou órgão examinado.**

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos; **Durante o procedimento de necropsia, fragmentos da valva mitral e do endocárdio serão retirados e encaminhados para exame ao laboratório de Patologia do InCor/HCFMUSP para avaliação e comparação com valvas mitrales doentes de etiologia mixomatosa. O presente projeto tem como finalidade utilizar para estudos desses fragmentos, além das técnicas convencionais da Patologia, outras técnicas procurando novos elementos que possam explicar melhor por que se desenvolvem essa doença. Não haverá necessidade de coleta sanguínea ou outros exames complementares.**

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3. **Nenhum desconforto adicional.**

5 – Benefícios para o participante. **Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo que testa a hipótese de que agentes infecciosos tipos clamídia, micoplasma e borrelia estejam favorecendo o desenvolvimento de inflamação e/ou infecção que pode contribuir para o desenvolvimento da doença valvar mixomatosa. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício sobre o mecanismo de doença. No entanto, o melhor entendimento dos mecanismos que levam ao desenvolvimento da doença pode levar a um melhor tratamento ou prevenção no futuro;**

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar- **Nenhum que se relacione ao fato de participar do presente projeto.**

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. **Os principais investigadores são o Dr. Marcos Gradim Tiveron, que pode ser encontrado no endereço Av. Vicente Ferreira, 828, Marília – SP, Telefone (14)96709033, a Dra. Maria de Lourdes Higuchi, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 44, São Paulo, Telefone(s) 11-26615541 e o cirurgião Dr. Pablo Pomerantzeff. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovidio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br**

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – **As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;**

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: **não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação;**

12 – Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Declaro ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. **Estudo biomolecular de produtos de *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Borrelia burgdorferi* na etiopatogenia da degeneração mixomatosa da valva mitral.**

Eu discuti com o Dr. Marcos G. Tiveron sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

8.4 Protocolo de Imunohistoquímica

- Tampão de recuperação – Tris/EDTA pH 9.0 ou

– Citrato pH 6.0

(Acertar pH e adicionar 0,05% Tween20)

- Tripsina (1/1) em PBS 5 min a 37°C

- Tampão de lavagem - PBS pH 7.4 (Acertar pH e adicionar 0,1% Tween20)

- 1) Desparafinamos as lâminas: 3 banhos de xilol (10 min cada), seguidos de 3 banhos em etanol 100%, 2 banhos em etanol 95% e 1 banho em etanol 70%. As lâminas foram lavadas várias vezes em água corrente.
- 2) Caso necessário, tratamos as lâminas em Tampão de recuperação com 0,05% de Tween20 na panela Pascal (DakoCytomation- California/ Code N° S2800) conforme calibração do fabricante, por 2 minutos a 121°C com pressão de 15.9 psi.
- 3) Após o término do programa, retiramos as cubas e mantivemos as lâminas com o tampão 5 minutos em TA. Lavamos várias vezes em água.
- 4) Bloqueamos a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 20 vol (ou 6%) com 2 banhos de 8 minutos. Lavamos várias vezes em água.
- 5) Bloqueamos com CAS Block (Invitrogen, cat. 00-8120) por 10 minutos em TA em câmara úmida.
- 6) Pingamos anticorpo primário diluído em Antibody Diluent Reagent Solution (Invitrogen, Ref 003218) e incubamos em TA em câmara úmida por 1 hora.
- 7) Lavamos em PBS 5 vezes. Pingamos a solução A do polímero Picture Max (Invitrogen, Ref 87-8983) e incubamos em TA por 30 minutos.
- 8) Lavamos em PBS 5 vezes. Pingamos a solução B do polímero Picture Max (Invitrogen, Ref 87-8983) e incubamos em TA por 30 minutos.
- 9) Lavamos em PBS 5 vezes.
- 10) Revelamos no DAB 1:50 (DakoCytomation- California/ Code N° K3468) e contra-coramos em hematoxilina de Harris.

8.5 Protocolo de Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* foi realizada para detecção do DNA de *Chlamydophila pneumoniae* (50ng/μl), utilizando-se a sonda ACAACGGCTAGAAATCAATTATAAGACTGAAGTTGAGCATATTCGTGAGGGAG TGCAGATTTAGATCATGGTGTCATTGCCCAAGGTTAAAGTCTACGT.

Para a permeabilização celular dos cortes histológicos foi utilizado tampão Tris/EDTA 10mM pH 9.0, bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 6% e redução de proteínas não específicas com bloqueador de proteínas (CAS Block –Invitrogen, Estados Unidos).

A dupla fita de DNA foi desnaturada em estufa a 95 ± 5 °C e a hibridização *in situ* foi realizada a 60°C, por 19 horas em estufa. O sinal foi amplificado utilizando-se o kit Genpoint (Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos) e a reação foi visualizada com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos). Controles: controle negativo - foi omitida a sonda. Cortes histológicos com tecidos previamente diagnosticados como positivos para *Chlamydophila pneumoniae* foram utilizados como controles positivos para as reações.

8.6 Análise histológica pela técnica de H&E

Caso	Degeneração Mixomatosa	Caso	Controle
1	DM intensa com vacuolização	31	Pouca DM, muita fibrose densa com calcificação
2	Muita fibrose, degeneração do colágeno e pouca DM	32	Discreta DM
3	DM sem vacuolização	33	DM na face ventricular
4	DM sem vacuolização	34	DM porção interna
5	DM sem vacuolização	39	DM porção interna
6	Muita fibrose, degeneração do colágeno e pouca DM	40	Fibrose e DM com inflamação
7	DM sem vacuolização	41	Fibrose e DM
8	DM sem vacuolização	42	DM porção interna
10	DM sem vacuolização	43	Fibrose
11	DM sem vacuolização	44	Sem material valvar suficiente
13	Muita fibrose, degeneração do colágeno e pouca DM e muita inflamação	45	Fibrose e degeneração com inflamação
14	Pouca DM, muita fibrose densa com calcificação	46	Muita fibrose e moderada DM
26	DM intensa com vacuolização	47	Muita fibrose e moderada DM
27	DM intensa com vacuolização	48	Muita fibrose e moderada DM
28	DM sem vacuolização	49	Fibrose e intensa DM
29	Pouca DM, muita fibrose densa com calcificação	50	Fibrose e intensa DM
30	DM intensa com vacuolização	51	Fibrose e intensa DM
35	Muita fibrose, degeneração do colágeno e pouca DM	52	Fibrose e intensa DM
36	Muita fibrose, degeneração do colágeno e pouca DM	53	Muita fibrose e moderada DM
38	Muita fibrose, degeneração do colágeno e pouca DM	54	Muita fibrose e moderada DM

8.7 Quantificação das análises histológicas da degeneração mixomatosa, das células inflamatórias e das bactérias

Movat

MOVAT									
CAS	A (mm ²)		% degeneração		CASO	A (mm ²)		% degeneração	
	1	2	1	2		1	2	1	2
1	1,67	1,64	76,9	23,3	31	0,63	0,40	7,5	7,2
2	3,91	2,48	53,5	32,7	32	0,77	0,57	12,6	8,1
3	2,13	2,43	75,3	67,8	33	0,37	0,39	21,9	5,1
4	1,55	1,12	27,6	24,9	34	0,50	0,71	11,8	68,3
5	1,56	1,65	57,4	39,7	39	0,95	0,36	75	39,3
6	1,21	1,73	41,8	13,7	40	2,77	1,69	30,7	11,5
7	2,12	1,35	64,4	59,3	41	2,77	1,22	51,2	10,1
8	3,65	3,84	26,2	31	42	1,43	1,20	26,4	43,2
10	6,97	0,73	50	15	43	0,47	0,53	50,3	30,5
11	3,89	2,86	19,5	3,9	44	0,37	0,33	25,3	6,6
13	3,70	1,72	0,7	0,5	45	2,81	2,01	39	17
14	1,35	1,19	37,1	21,5	46	0,93	0,64	4,3	0,1
26	0,99	2,27	71,8	35,7	47	1,54	2,73	81,9	74,1
27	1,45	1,37	80,5	24,3	48	1,28	1,05	39,4	31,6
28	1,34	2,35	61,5	3,8	49	2,51	0,65	40,7	30,7
29	1,47	2,84	57,8	18,9	50	2,71	2,99	19,7	19,5
30	1,49	1,66	73,5	10,8	51	1,44	1,71	29,2	23,7
35	1,77	1,85	80	72,6	52	2,55	0,59	69,6	60
36	1,50	0,62	91,6	66,4	53	2,37	2,61	18,5	9,5
38	1,41	1,40	45,7	43,5	54	1,30	0,59	55,6	39,4

CD 20

CD 20					
CASO	N. Céls +/mm ²		CASO	N. Céls +/mm ²	
	1	2		1	2
1	24,6	51,6	31	0,0	0,0
2	30,4	57,7	32	3,6	2,0
3	230,0	130,3	33	16,4	8,4
4	7,2	90,3	34	4,6	3,4
5	22,3	26,6	39	9,7	3,0
6	8,1	139,4	40	4,7	0,0
7	4,2	9,0	41	7,5	2,4
8	5,3	6,6	42	10,7	8,7
10	14,7	0,0	43	2,5	16,8
11	20,8	18,3	44	176,9	71,3
13	21,5	10,6	45	3,7	2,4
14	3,4	9,5	46	9,9	13,8
26	13,7	4,6	47	1,6	2,5
27	44,3	13,6	48	1,6	29,9
28	5,0	3,6	49	4,3	1,1
29	27,0	6,3	50	4,3	5,4
30	9,4	5,3	51	21,4	26,7
35	2,1	1,5	52	4,6	0,0
36	31,2	10,7	53	3,5	7,2
38	31,4	26,1	54	9,8	1,6

CD 45

CD 45					
CASO	N. Céls +/mm ²		CASO	N. Céls +/mm ²	
	1	2		1	2
1	105,4	88,1	31	2,8	2,1
2	155,9	42,8	32	0,0	7,0
3	316,4	182,2	33	11,9	3,2
4	1,3	0,0	34	10,5	3,1
5	132,5	348,6	39	2,2	7,2
6	107,9	138,9	40	12,3	6,4
7	9,9	20,8	41	1,7	4,3
8	2,3	1,8	42	15,1	5,5
10	76,0	70,1	43	4,1	2,1
11	25,0	41,0	44	0,0	4,2
13	88,2	67,2	45	54,9	1,7
14	61,8	5,9	46	0,0	0,0
26	10,8	3,4	47	1,7	0,9
27	0,0	0,0	48	2,8	10,2
28	9,1	4,6	49	2,3	1,6
29	2,9	2,1	50	4,2	1,4
30	23,8	22,5	51	9,9	0,0
35	0,0	0,5	52	0,0	4,9
36	3,5	0,0	53	0,5	0,8
38	10,8	4,2	54	8,3	1,2

CD 68

CD 68					
CASO	N. Céls +/mm ²		CASO	N. Céls +/mm ²	
	1	2		1	2
1	37,4	6,7	31		
2	25,4	12,2	32	527,5	252,4
3	171,1	140,1	33	216,9	249,8
4	46,4	13,3	34	82,3	158,5
5	27,7	31,4	39	40,0	30,1
6			40	79,1	66,5
7	10,7	5,9	41	72,0	22,8
8	15,9	5,5	42	68,0	39,1
10	10,3	6,9	43	50,6	5,4
11	38,7	23,4	44	123,4	116,8
13	37,4	6,7	45	29,9	55,9
14	117,0	30,1	46	33,2	31,6
26	51,8	55,2	47	111,4	28,3
27	23,4	53,4	48	58,8	43,0
28	195,1	109,0	49		
29	86,5	181,9	50	30,1	24,8
30	294,7	45,7	51	58,5	238,7
35	41,6	30,5	52	23,0	46,7
36	77,0	109,8	53	194,2	111,1
38	35,9	64,2	54	240,9	156,6

Borrelia Burgdorferi

<i>Borrelia Burgdorferi</i>					
$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)			$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)		
CASO	7764	7739	CASO	1	2
1	16338	13346	31	7169	715
2	7427	2776	32	0	834
3	3821	3086	33	13596	794
4	4732	1283	34	14750	4571
5	2031	6803	39	7277	2082
6	2052	1879	40	9030	9573
7	2213	1863	41	13990	45326
8	3513	15212	42	15778	4279
10	2272	4341	43	2991	456
11	10223	3797	44	4171	1169
13	1359	1105	45	16169	52267
14	9802	7296	46	9705	17403
26	10368	5913	47	17694	42795
27	5788	4302	48	10276	6483
28	20009	27029	49		
29	17194	6068	50	10584	12305
30	25927	14005	51	42413	83712
35	13997	7961	52	5840	31074
36	13360	10017	53	17209	24699
38	7764	7739	54	41777	8403

Mycoplasma pneumoniae

<i>Mycoplasma pneumoniae</i>					
$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)			$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)		
CASO	1	2	CASO	1	2
1	285395	79464	31	1235	1089
2	454628	428145	32	12229	14527
3	508380	760256	33	9005	14326
4	157974	412731	34	1897	7428
5	39158	69878	39	3696	1731
6	365093	397689	40	12630	3733
7	213513	126796	41	53707	9797
8	204012	599655	42	5539	5059
10	532536	264730	43	821	2057
11	488952	499626	44	3771	6952
13	933127	535191	45	12406	17471
14	130001	85139	46	66129	98130
26	824	727	47	15284	18921
27	28416	2502	48	30971	41764
28	1988	471	49	18116	19485
29	1814	2095	50	6935	3879
30	3862	2503	51	37374	126003
35	276659	199777	52	364	3960
36	25986	4033	53	0	0
38	21464	1701	54	3016	0

Clamydophila pneumoniae

<i>Clamydophila pneumoniae</i>					
$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)			$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)		
CASO	1	2	CASO	1	2
1	109887	11816	31		
2	6679	321	32	7624	4436
3	10841	13195	33	39597	51447
4	14977	2794	34	69765	20062
5	4097	1958	35		
6			39	1716	3119
7	4768	3533	41	4964	4970
8	26672	20770	42	2484	730
10	9905	6838	43	857	0
11	5332	5881	44	2074	543
13	16123	2405	45	3679	1174
14	20797	17534	46		
26	11112	11831	47	6435	9591
27	4024	1624	48	6938	2983
28	17701	3199	49		
29	4663	1594	50	1772	0
30	20589	660	51	5965	10269
35	859	2122	52	11894	2090
36	1181	119	53	23592	0
38	7904	9676	54	5763	791

Metaloproteinase 9

MMP9					
$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)			$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)		
CASO	1	2	CASO	1	2
1	416511	381734	31	18080	25525
2	256699	664132	32	260654	214691
3	1369513	1457658	33	270533	103894
4	760474	310800	34	7273	29973
5	1243911	989778	39	71433	244372
6	898008	785820	40	311264	23589
7	745227	760091	41	298659	248776
8	1058262	467390	42	167801	43945
10	1554451	397956	43	47465	6366
11	241465	672055	44	267956	184900
13	527061	702677	45	335024	83648
14	34494	32467	46	40840	3012
26	41362	66941	47	467011	379092
27	112803	48273	48	444725	397151
28	191617	87119	49	125460	289757
29	206032	286931	50	133785	318189
30	1097643	491402	51	484481	233815
35	480727	349678	52	399898	29657
36	650108	256905	53	484352	213198
38	57229	41007	54	338731	40600

8.8 Protocolo de Microscopia Eletrônica

Inclusão rápida para microscopia eletrônica para tecido

- a) Para fixação das amostras: o tecido foi cortado com o auxílio de lâminas de inox em cima de papel alumínio estéril (quando necessário, cortou-se de tal maneira que se respeitasse o limite das camadas do fragmento e o tamanho do corte deveria ser no máximo 1mm de um lado e 0,5 mm do outro), adicionado 1000µl de glutaraldeído 3% e incubado na geladeira por 3 horas a 4°C.
- b) A seguir, adicionamos 500µl de hexaferricianeto 2% + 500µl de ósmio 2% (ósmio reduzido), incubamos por 2 horas a 4°C (geladeira 6).
- c) Lavamos o fragmento 3 vezes com 500µl de solução salina 0,9% sacarose.
- d) Adicionamos ao fragmento 500µl de uranila 0,5%, 0,40 M com sacarose (incubamos a 4°C por 16 horas na geladeira).
- e) Lavamos o fragmento 3 vezes com 500µl de solução salina 0,9% sacarose.
- f) Desidratação com ETANOL 70%: adicionamos ao fragmento 500µl de etanol 70% e incubamos por 10 minutos a TA. Repetimos este procedimento 3 vezes.
- g) Desidratação com DIMETOXIPROPANO: adicionamos ao fragmento 500µl de 2,2-dimetoxipropano acidificado e incubamos por 5 minutos a TA.
- h) Fixação em ACETONA: adicionamos ao fragmento 500µl de acetona (parte superior do sulfato de cobre 4% em acetona), e incubamos por 2 minutos a TA.
- i) Preparamos em um tubo à parte a mistura de acetona com resina polybed 812/araldite F (1:1). Adicionamos 500ul da mistura ao fragmento e incubamos por 30 minutos a TA.
- j) Retiramos o fragmento com o auxílio de uma agulha e colocamos nos moldes de silicone.
- k) Polimerização: em seguida as cápsulas foram incubadas na estufa a 60°C por 24 horas.
- l) A coloração dos cortes ultrafinos (70 nanômetros) foi feita com uranila saturada e citrato de chumbo.

8.9 Quantificação dos antígenos de *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae* e MMP9 na comparação entre o grupo DM e o grupo controle contendo apenas os casos associados à doença cardiovascular

Borrelia burgdorferi

Bb		G1		G2			
$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	valor de p
área 1	3.821 (1.359-25.927)	2046	6791	9.367 (2.991-14.703)	7435	14370	p=0,32
área 2	6.803 (1.105-15.212)	2784	8937	13.487 (455-45.326)	7071	36934	p=0,31

Bb: *Borrelia burgdorferi*; G1: grupo 1; G2: grupo 2; dp: desvio padrão; ep: erro padrão; μm^2 : micrômetros quadrados; Ag: antígenos; mm: milímetros.

Mycoplasma pneumoniae

Mp		G1		G2			
$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	valor de p
área 1	213.513 (823-532.536)	97997	298767	12.630 (364-66.129)	1628	3903	p=0,013
área 2	126.796 (470-412.731)	64035	297969	7.427 (1089-98130)	27013	19062	p=0,07

Mp: *Mycoplasma pneumoniae*; G1: grupo 1; G2: grupo 2; dp: desvio padrão; ep: erro padrão; μm^2 : micrômetros quadrados; Ag: antígenos; mm: milímetros.

Metaloproteinase (MMP9)

MMP9		G1		G2			
$\mu\text{m}^2\text{Ag}$ (1mm)	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	valor de p
área 1	480.727 (34.494-1.554.451)	154053	794857	125.460 (7.272-467.011)	45809	333422	p=0,05
área 2	349.678 (32.467-785.820)	82074	48849	29.657 (3.012-379.092)	19283	259021	p=0,037

MMP9: metaloproteinase MMP9; G1: grupo 1; G2: grupo 2; dp: desvio padrão; ep: erro padrão; μm^2 : micrômetros quadrados; Ag: antígenos; mm: milímetros.

9 Referências

1. Barlow JB, Bosman CK. Aneurysmal protrusion of the posterior leaflet of the mitral valve. An auscultatory-electrocardiographic syndrome. *Am Heart J*. 1966;71:166-78.
2. Criley JM, Lewis KB, Humphries JO, Ross RS. Prolapse of the mitral valve: clinical and cine-angiocardigraphic findings. *Br Heart J*. 1966;28:488-96.
3. Hayek E, Gring CN, Griffin BP. Mitral valve prolapse. *Lancet*. 2005;365:507-18.
4. Agozzino L, Falco A, de Vivo F, et al. Surgical pathology of the mitral valve: gross and histological study of 1288 surgically excised valves. *Int J Cardiol*. 1992;37:79-89.
5. Gande-Allen KJ, Griffin BP, Ratliff NB, et al. Glycosaminoglycan profiles of myxomatous mitral leaflets and chordae parallel the severity of mechanical alterations. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:271-77.
6. Veinot JP, Prichett-Pejic W, Songd J, Waghrayd G, Parks W, Mesanad TG, Ruel M. CD117-positive cells and mast cells in adult human cardiac valves - observations and implications for the creation of bioengineered grafts. *Cardiovascular Pathology*. 2006;15:36-40.
7. Freed LA, Levy D, Levine RA, et al. Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse. *N Engl J Med*. 1999;341:1-7.
8. Pomerantzeff PMA, Brandão CMA, Monteiro ACM, Nersessian AC, Zeratti AE, Stolf NAG, Barbero-Marcial M, Oliveira SA, Verginelli G, Jatene AD. Plástica da valva mitral: resultados tardios de doze anos de experiência e evolução das técnicas. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1994;9(1):22-28.
9. Movahed MR, Hepner AD: Mitral valvar prolapse is significantly associated with low body mass index in addition to mitral and tricuspid regurgitation. *Cardiol Young*. 2007;17:172-74.
10. Higuchi M de L, Reis MM, Sambiase NV, Palomino SA, Castelli JB, Gutierrez PS, Aiello VD, Ramires JA. Co-infection with *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2003;81(1):12-22.
11. Higuchi ML, Santos MH, Rogério A, Kawakami JT, Bezerra HG, Canzian M. A role for archaeal organisms in development of atherosclerotic vulnerable plaques and myxoid matrices. *Clinics*. 2006;61(5):473-8.

12. Pierri H, Higuchi-Dos-Santos MH, Higuchi MI, Palomino S, Sambiase NV, Demarchi LM, Rodrigues GH, Nussbacher A, Ramires JAF, Wajngarten M. Density of *Chlamydia pneumoniae* is increased in fibrotic and calcified areas of degenerative aortic stenosis. *Int J Cardiol.* 2006;108:43-47.
13. Higuchi-Dos-Santos MH, Pierri H, Higuchi MI, Nussbacher A, Palomino S, Sambiase NV, Ramires JAF, Wajngarten M. *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* nos Nódulos de Calcificação da Estenose da Valva Aórtica. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84:443-48.
14. Gabbay U, Yosefy C. The underlying causes of chordae tendinae rupture: A systematic review. *Int J Cardiol.* 2010;143:113-18.
15. Enriquez-Sarano M, Freeman WK, Christophe M, Tribouilloy CM, Thomas A, Orszulak TA, Bijoy K, Khandheria BK, Seward JB, Bailey KR, Tajik J. Functional Anatomy of Mitral Regurgitation: Accuracy and Outcome Implications of Transesophageal Echocardiography. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34(4):1129-36.
16. Monin J-L, Dehant P, Roiron C, Monchi M, Tabet J-Y, Clerc P, Fernandez G, Houel R, Garot J, Chauvel C, Gueret P. Functional Assessment of Mitral Regurgitation by Transthoracic Echocardiography Using Standardized Imaging Planes Diagnostic Accuracy and Outcome Implications. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(2):302-9.
17. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP III, Guyton RA, O'Gara PT, Ruiz CE, Skubas NJ, Sorajja P, Sundt TM III, Thomas JD, 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Valvular Heart Disease. *Circulation.* 2014;129:1-96.
18. Pomerantzeff PMA, Brandão CMA, Albuquerque JMA, Stolf NAG, Pomerantzeff PY, Takeda F, Oliveira SA. Mitral valve annuloplasty with a bovine pericardial strip – 18-year results. *Clinics.* 2005;60(4):305-10.
19. Pomerantzeff PMA, Brandão CMA, Rossi EG, Cardoso LF, Tarasoutchi F, Grinberg M, Stolf NAG, Puig LB, Verginelli G, Jatene AD. Plástica da valva mitral. Ressecção quadrangular da cúspide posterior em portadores de degeneração mixomatosa. *Arq Bras Cardiol.* 1999;73(3):273-76.
20. Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *Inter J Biochemistry & Cell Biology.* 2003;35:113-18.
21. Bayreuther K, Rodemann HP, Francz PI, Maier K. Differentiation of fibroblast stem cells. *J. Cell. Sci.* 1988; Suppl. 10:115-30.

22. Sell S, Scully RE. Aging changes in the aortic and mitral valves. Histological and biochemical studies, with observations on the pathogenesis of calcific aortic stenosis and calcification of the mitral annulus. *Am. J. Pathol.* 1965; 46:345-65.
23. Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, Schoen FJ. Activated Interstitial Myofibroblasts Express Catabolic Enzymes and Mediate Matrix Remodeling in Myxomatous Heart Valves. *Circulation.* 2001;104:2525-2532.
24. Nasuti JF, Zhang PJ, Feldman MD, Pasha T, Khurana JS, Gorman JH, Gorman RC, Narula J, Narula N. Fibrillin and Other Matrix Proteins in Mitral Valve Prolapse Syndrome. *Ann Thorac Surg.* 2004;77:532-6.
25. Oki T, Fukuda N, Kawano T, Iuchi A, Tabata T, Manabe K, Kageji Y, Sasaki M, Yamada H, Ito S. Histopathologic studies of innervation of normal and prolapsed human mitral valves. *J Heart Valve Dis.* 1995;4(5):496-502.
26. Borin C, Vanhercke D, Weyns A: Innervation of the atrioventricular and semi-lunar heart valves: a review. *Acta Cardiol.* 2006;61(4):463–69.
27. Imataka K, Yamaoki K, Seki A et al: Peculiar mitral valve and papillary muscle lesions induced by vagus manipulations in rabbits. An experimental model for nonrheumatic mitral regurgitation. *Jpn Heart J.* 1986;27:377-86.
28. Bell DS, Acton RT: Increased prevalence of mitral valve prolapse in IDDM. *Diabetes Care.* 1996;19:672.
29. Jew JY, Williams TH: Innervation of the mitral valve is strikingly depleted with age. *Anat Rec.* 1999;255(3):252-60.
30. Yang EV, Sood AK, Chen M et al: Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res.* 2006; 66(21):10357-64.
31. Maolood N, Hardin-Pouzet H, Grange-Messent V: Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are upregulated by noradrenaline in the mouse neuroendocrine hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 2008;27(5):1143-52.
32. Hu X, Zhao Q. Autonomic dysregulation as a novel underlying cause of mitral valve prolapse: A hypothesis. *Med Sci Monit.* 2011;17(9):27-31.
33. Disse S, Abergel E, Berrebi A et al: Mapping of a first locus for autosomal dominant myxomatous mitral-valve prolapse to chromosome 16p11.2-p12.1. *Am J Hum Genet.* 1999;65:1242–51.

34. Freed LA, Acierno JS Jr, Dai D et al: A locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 11p15.4. *Am J Hum Genet.* 2003; 72:1551-59.
35. Nesta F, Leyne M, Yosefy C et al: New locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 13: clinical insights from genetic studies. *Circulation.* 2005;112(13):2022-30.
36. Scheele W, Allen H, Krans R et al: Familial prevalence and genetic transmission of mitral valve prolapse. *Circulation.* 1976;54(Suppl.III):111.
37. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma. *Circulation.* 1998;97:2433-44.
38. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases -1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation.* 1999;99:2503-09.
39. Segura AM, Luna RE, Horiba K, et al. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation.* 1998;98:II-331-II- 338.
40. Mahimkar R, Nguyen A, Mann M, Yeh CC, Zhu BQ, Karliner JS, Lovett DH. Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression induces myxomatous valve degeneration: a potential model of mitral valve prolapse disease. *Cardiovascular Pathology.* 2009;18:253-61.
41. Bashey RI, Torii S, Angrist A. Age-related collagen and elastin content of heart valves. *J Gerontol.* 1967;22:203-208.
42. Avierinos JF, Inamo J, Grigioni F, Gersh B, Shub C, Enriquez-Sarano M. Sex Differences in Morphology and Outcomes of Mitral Valve Prolapse. *Ann Intern Med.* 2008;149:787-94.
43. Soini Y, Satta J, Maatta M, Autio-Harmainen H. Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *J. Pathol.* 2001;194:225-231.
44. Hartlapp I, Abe R, Saeed RW, Peng T, Voelter W, Bucala R, Metz CN. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J.* 2001;15:2215-24.
45. Schoen FJ. Aortic valve structure-function correlations: Role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. *J Heart Valve Dis.* 1997;6:1-6.

46. Decker RS, Dingle JT. Cardiac catabolic factors: the degradation of heart valve intercellular matrix. *Science*. 1982;215:987-89.
47. Higuchi ML, Castelli JB, Aiello VD, Reis MM, Sambiasi NV, Palomino SA, Bezerra HG, Ramires JAF. Great amount of *Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaque vessel segments at autopsy. A comparative study of stable plaques. *Arq Bras Cardiol*. 2000;74:149-51.
48. Momiyama Y, Hirano R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Effects of interleukin-1 gene polymorphisms on the development of coronary artery disease associated with *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(3):712-17.
49. Nystrom-Rosander C, Thelin S, Hjelm E, Lindquist O, Pahlson C, Friman G. High incidence of *Chlamydia pneumoniae* in sclerotic heart valves of patients undergoing aortic valve replacement. *Scand J Infect Dis*. 1997;29(4):361-65.
50. Higuchi ML, Góis JM, Reis MM, Higuchi-dos-Santos MH, Diament J, Sousa JM, Ramires JAF, Oliveira AS. Co-infection ratios versus inflammation, growth factors and progression of early atheromas. *APMIS*. 2006;114:338-44.
51. Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis*. 2007;44(4):568-76.
52. Tuuminen T, Palomäki P, Paavonen J. The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J Microbiol Methods*. 2000;42(3):265-79.
53. Contini C, Cultrera R, Seraceni S, Castellazzi M, Granieri E, Fainardi E. Cerebrospinal fluid molecular demonstration of *Chlamydia pneumoniae* DNA is associated to clinical and brain magnetic resonance imaging activity in a subset of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2004;10(4):360-9.
54. Gerard HC, Wang Z, Whittum-Hudson JA, et al. Cytokine and chemokine mRNA produced in synovial tissue chronically infected with *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *J Rheumatol*. 2002;29(9):1827-35.
55. Roggério A, Sambiasi NV, Palomino SAP, Castro MAP, Silva ES, Stolf NG, Higuchi ML. Correlation of Bacterial Coinfection Versus Matrix Metalloproteinase 9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 Expression in Aortic Aneurysm and Atherosclerosis. *Ann Vasc Surg*. 2013;27:964-971.

56. Koskiniemi M. CNS manifestations associated with *Mycoplasma pneumoniae* infections: summary of cases at the University of Helsinki and review. *Clin Infect Dis.* 1993;17(Suppl 1):S52-7.
57. Berghoff W. Chronic Lyme Disease and Co-infections: Differential Diagnosis. *The Open Neurology Journal.* 2012;6(Suppl 1-M10):158-78.
58. Krause PJ, Bockenstedt LK. Lyme Disease and the Heart. *Circulation.* 2013;127:e451-e454.
59. Palecek T, Kuchynka P, Hulinska D, Schramlova J, Hrbackova H, Vitkova I, Simek S, Horak J, Louch WE, Linhart A. Presence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies in patients with new-onset unexplained dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol.* 2010;199:139-43.
60. Russell HK. A modification of the Movatpentachrome stain. *Arch Pathol.* 1972;94:187-91.
61. Carpentier AF, Lessana A, Relland JY, Belli E, Mihaileanu S, Berrebi AJ, et al. The "physio-ring": an advanced concept in mitral valve annuloplasty. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(5):1177-85.
62. Pomerantzeff PMA, Brandão CM, Souza LR, Vieira ML, Grimberg M, Ramires JA, Oliveira SA. Posterior mitral leaflet repair with a simple segmental annulus support: the "Double-Teflon Technique". *J Heart Valve Dis.* 2002;11:160-4.
63. Rottem S, Kosower NS, Kornspan. Contamination of Tissue Cultures by Mycoplasmas. 2012. Licensee In Tech. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/51518>.
64. Muresian H. The Clinical Anatomy of the Mitral Valve. *Clinical Anatomy.* 2009;22:85-98.
65. Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ. Res.* 1995;77:1-6.
66. Akiyama K, Hirota J, Taniyasu N, Maisawa K, Kobayashi Y, Tsuda M. Pathogenetic significance of myxomatous degeneration in fenestration-related massive aortic regurgitation. *Circ J.* 2004 ;68:439-43.
67. Barth PJ, Koster H, Moosdorf R. CD34⁺ fibrocytes in normal mitral valves and myxomatous mitral valve degeneration. *Pathology – Research and Practice.* 2005;201:301-4.
68. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol. Med.*

- 1994;1:71-81.
69. Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J. Immunol.* 1998;160:419-25.
70. Hussa EA, Goodrich-Blair H. It takes a village: Ecological and fitness impacts of multipartite mutualism. *Annu. Rev. Microbiol.* 2013;67:161-78.
71. Ramadhar TR, Beemelmans C, Currie CR, Clardy J. Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery. *The Journal of Antibiotics.* 2014;67:53-58.
72. Higuchi ML, Kawakami J, Ikegami R, Clementino MBM, Kawamoto FM, Reis MM, Bocchi E. Do Archaea and bacteria co-infection have a role in the pathogenesis of chronic chagasic cardiopathy? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(1):199-207.
73. Mangini S, Higuchi ML, Kawakami JT, Reis MM, Ikegami RN, Palomino SAP, Pomerantzeff PMA, Fiorelli AI, Braga-Marcondes FG, Bacal F, Ferreira SMA, Issa V, Souza GEC, Chizzola PR, Bocchi EA. Infectious agents and inflammation in donated hearts and dilated cardiomyopathies related to cardiovascular diseases, Chagas' heart disease, primary and secondary dilated cardiomyopathies. *Int J Cardiol.* 2015;178:55-62.
74. Kern JM, Maass V, Maass M. Chlamydia pneumoniae-induced pathological signaling in the vasculature. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;55:131-9.
75. Hansen SK, Rainey PB, Haagensen JA, Molin S. Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature.* 2007;445(7127):533-6.
76. Mideo N. Parasite adaptations to within-host competition. *Trends Parasitol.* 2009;25(6):261-8.
77. Alizon S, van Baalen M. Multiple infections, immune dynamics, and the evolution of virulence. *Am Nat.* 2008;172(4):E150-68.
78. Muhlradt PF. Immunomodulation by Mycoplasmas: Artifacts, Facts and Active Molecules. In: Razin S, Herrmann R. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasma. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.p.449.
79. Mantovani E, Costa IP, Gauditano G, Bonoldi VL, Higuchi ML, Yoshinari NH. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:443-56.

80. Yoshinari NH, Mantovani E, Bonoldi VLN, Marangoni RG, Gauditano G. Doença de Lyme-símile brasileira ou síndrome Baggio-Yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(3):363-9.
81. Derdakova M, Dudioak V, Brei B, et al. Interaction and transmission of two *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains in a tick-rodent maintenance system. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(11):6783-8.
82. Pedersen AB, Fenton A. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol Evol.* 2007;22(3):133-9.
83. Devevey G, Dang T, Graves CJ, Murray S, Brisson D. First arrived takes all: inhibitory priority effects dominate competition between co-infecting *Borrelia burgdorferi* strains. *BMC Microbiology.* 2015;15(61)2-9.
84. Swanson KI, Norris DE. Presence of multiple variants of *Borrelia burgdorferi* in the natural reservoir *Peromyscus leucopus* throughout a transmission season. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8(3):397-405.
85. Dykhuizen DE, Brisson D, Sandigursky S, Wormser GP, Nowakowski J, Nadelman RB, et al. Short report: the propensity of different *borrelia burgdorferi* sensu stricto genotypes to cause disseminated infections in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(5):806-10.
86. David TE, Armstrong S, McCrindle BW, Manlihot C. Late Outcomes of Mitral Valve Repair for Mitral Regurgitation Due to Degenerative Disease. *Circulation.* 2013;127:1485-92.
87. Stevens LM, Basmadjian AJ, Bouchard D, El-Hamamsy I, Demers P, Carrier M, Perrault LP, Cartier R, Pellerin M. Late echocardiographic and clinical outcomes after mitral valve repair for degenerative disease. *J Card Surg.* 2010;25:9-15.
88. Shimokawa T, Kasegawa H, Katayama Y, Matsuyama S, Manabe S, Tabata M, Fukui T, Takanashi S. Mechanisms of recurrent regurgitation after valve repair for prolapsed mitral valve disease. *Ann Thorac Surg.* 2011;91:1433-38.