

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical**

Adriana Costa Diamantino Soares

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS E
GRAVIDADE DA LESÃO VALVAR REUMÁTICA**

Belo Horizonte
2017

Adriana Costa Diamantino Soares

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS E
GRAVIDADE DA LESÃO VALVAR REUMÁTICA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes

Co-orientadora: Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra

Belo Horizonte
2017

Soares, Adriana Costa Diamantino.
SO876p Perfil de expressão de citocinas e gravidade da lesão valvar reumática [manuscrito]. / Adriana Costa Diamantino Soares. -- Belo Horizonte: 2017.

78f.: il.

Orientadora: Maria do Carmo Pereira Nunes.

Coorientador: Walderez Omelas Dutra.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Febre reumática. 2. Cardiopatia reumática. 3. Valva Mitral 4. Ecocardiografia Doppler. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Nunes, Maria do Carmo Pereira. II. Dutra, Walderez Omelas. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WG 262



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitora de Pós-Graduação

Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Ado Jório de Vasconcelos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Humberto José Alves

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Professor Luiz Armando Cunha de Marco

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação

Professor Edson Samesima Tatsuo

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Professora Valéria Maria Augusto

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

Professor Eduardo Antonio Ferraz Coelho

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

Professor Antônio Luiz Pinho Ribeiro

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

Professor Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Professor Vandack Alencar Nobre Jr.

Professor Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Professora Denise Utsch Gonçalves

Professor Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Professor Unai Tupinambás

Representante Discente

Pollyana Anício Magalhães Gontijo

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos recebidas e pela oportunidade de desfrutar com saúde desse momento de tanto aprendizado.

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

À Professora Carminha, pelo suporte, paciência, conselhos, incentivo à pesquisa e pelo exemplo de dedicação e entusiasmo.

À Professora Wal, pela contagiante alegria, pela participação ativa e precisa, inspirando-nos com sua competência e energia.

À Lívia, pela importante ajuda na coleta de dados e análise de citocinas, compartilhando as minhas angústias, conquistas e dificuldades.

A todos os pacientes e familiares envolvidos, por sua generosidade, doação, força e humildade.

Aos meus pais, Noasses e Taiza, por serem meus principais exemplos de profissionais éticos, médicos dedicados e pessoas bondosas.

As minhas irmãs, Luciana e Tatiana, que mostraram desprendimento e compreensão, ajudando-me sempre que necessário.

Ao meu esposo, Gustavo, que entendeu as minhas ausências com resignação, pelo apoio amoroso e por tornar a minha vida mais leve e feliz.

“Que bom que não sou o melhor de todos,
porque ainda me resta um caminho a percorrer, para melhorar-me a mim mesmo.
Nada mau que eu não seja de todo mau, porque, assim, ainda percebo o que seja mau.
É realmente bom que eu não saiba tudo, porque se soubesse não teria o que aprender,
e não teria a felicidade de aumentar o pouco que sei.
Que bom que não tenho tudo, só assim me animo a lutar pelo que me falta,
e é realmente bom que não me falte tudo,
porque tenho a agradecer a quem me deu do seu um pouco.
Que bom que me canse pelos caminhos, se não me fatigasse,
seria menor a alegria experimentada ao chegar e jamais eu bendiria o descanso.
Que bom que eu tenho defeitos, se não os tivesse,
viveria só e não compreenderia as faltas dos que estariam de mim separados.
Maravilhoso é que eu não tenha tudo de graça,
se tivesse, a inércia me entediaria porque nada poderia produzir ou dar-me.
Melhor ainda é que eu não precise pagar o preço de tudo,
fazendo com que eu conheça a benção da gratidão.
Que bom que eu não sou o mais forte do mundo, porque se o fosse,
não precisaria de quem me auxiliasse e não compreenderia a solidariedade e a ajuda,
pois tentaria fazer tudo sozinho.
Fascina-me saber que não acerto sempre, porque posso merecer o ensinamento,
pois não existe melhor forma de aperfeiçoar-me do que corrigir-me.
E é belo que eu não erre sempre,
porque posso merecer que me acreditem e até confiem em mim.
Chega a ser bom que nem todos me amem, porque para alguns terei de ser ainda melhor,
para que venham a querer-me.
Só o perder faz com que se procure.
Só a consciência da fraqueza faz com que se aumente o esforço.
Só a noite faz com que o dia seja mais claro.
Só os erros dão ocasião ao perdão.
E é por isso que me sinto realmente feliz, porque às vezes sou infeliz,
e é do fundo do abismo que eu clamo mais alto, que peço com mais ansiedade.
Que bom assim, que eu não seja tudo, nem seja nada,
e seja eu um eu à cata, à procura,
em rumo do que não tenho, do que careço, do que preciso.
Só assim posso merecê-lo um pouco
e não ser um parasita dos que merecidamente o houverem merecido.”

José Wanderley Dias

RESUMO

Introdução: A febre reumática (FR) e a subsequente cardiopatia reumática (CR) permanecem como um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento. A base patogênica da doença é composta pela tríade caracterizada pela presença do estreptococo do grupo A (*Streptococcus pyogenes*), hospedeiro geneticamente susceptível e reposta imune exacerbada. O padrão de resposta imune após exposição ao estreptococo do grupo A constitui um dos principais determinantes do processo inflamatório reumático causando as lesões valvares. Entretanto, a evolução da CR é variável, tornando-se essencial a identificação dos pacientes que apresentam maior risco de progressão da doença com posterior necessidade de intervenção valvar. O objetivo do presente estudo foi analisar o perfil imunológico expresso pelos níveis séricos de citocinas nos diferentes estágios evolutivos da CR, correlacionando-se com a gravidade de apresentação da doença. **Métodos:** Este é um estudo observacional, transversal, com inclusão de 89 pacientes com CR provenientes do ambulatório Bias Fortes da Faculdade de Medicina da UFMG. Exame clínico cuidadoso foi realizado pelo pesquisador principal para se quantificar as lesões valvares, com realização subsequente de ecodopplercardiograma para melhor definição do aspecto morfológico da valva e obtenção de medidas e cálculos hemodinâmicos. A seguir, foram coletadas amostras de sangue para dosagem de citocinas. As amostras séricas obtidas foram analisadas por meio da técnica *cytometric bead array* (CBA) para a dosagem das interleucinas (IL): IL-10, IL-6, IL-2, IL-4, IL-17A, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ). **Resultados:** A idade média dos pacientes foi de $41 \pm 11,5$ anos, com elevada prevalência de mulheres (85%). Metade dos pacientes (49,4%) relatou história de FR aguda, não associada à necessidade de intervenção valvar ($p = 0,086$). A valva mais afetada foi a mitral, com 60 pacientes (67,4%) apresentando acometimento mitral isolado, 23 (25,9%) possuíam envolvimento das valvas mitral e aórtica e 6 pacientes (6,7%) apresentavam a valva mitral, aórtica e tricúspide com envolvimento reumático. À inclusão no estudo, 64 pacientes já haviam sido submetidos à intervenção valvar (troca valvar ou valvoplastia percutânea ou aberta), denotando uma CR de maior gravidade, que necessitou de procedimento invasivo para alterar a evolução da doença. Vinte e cinco pacientes, com as mesmas características demográficas dos demais, apresentavam CR estável, com lesões valvares leves ou moderadas, sem necessidade de qualquer intervenção cardíaca. Os pacientes sem passado de intervenção valvar relataram início mais precoce da profilaxia secundária com penicilina benzatina comparando-se aos pacientes com CR mais grave ($15,7 \pm 10,5$ anos versus $23,9 \pm 10,2$ anos; $p = 0,002$, respectivamente), apesar da frequência de uso de penicilina à entrada no estudo ter sido semelhante entre os grupos com e sem intervenção valvar (76,6% versus 92,0%, respectivamente, $p = 0,096$). Os pacientes foram estratificados quanto à necessidade de intervenção valvar, observando-se que a concentração sérica das citocinas inflamatórias (pg/mL) foi maior no grupo de maior gravidade comparado ao de pacientes com doença de progressão mais lenta (IL-6: $p = 0,007$; TNF- α : $p = 0,017$; IL-2: $p = 0,018$; IL-17A: $p = 0,019$; IFN- γ : $p = 0,026$). O mesmo foi visto para IL-4 ($p = 0,007$). De forma interessante, a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 não foi diferente entre

os grupos ($p = 0,366$). Análise em cluster de todas as citocinas mostrou uma segregação diferente entre os grupos com intervenção e sem intervenção, com IL-6/TNF- α e IL-6/IL-17A associadas a estes grupos, respectivamente. **Conclusões:** Os pacientes com CR de maior gravidade com necessidade de intervenção valvar apresentaram uma resposta inflamatória mais intensa, evidenciada por elevadas concentrações de citocinas inflamatórias em relação aos pacientes com evolução mais favorável da doença. Além disso, o início precoce da profilaxia secundária para FR com o uso de penicilina foi mais frequente nos pacientes com evolução estável da CR, suportando a hipótese que as reinfecções estreptocócicas apresentam um papel fundamental na progressão da CR.

Palavras-chaves: febre reumática, cardiopatia reumática, valvopatia mitral reumática, resposta inflamatória, ecodopplercardiograma, intervenção valvar.

ABSTRACT

Background: Rheumatic fever (RF) and subsequent rheumatic heart disease (RHD) remain a serious public health problem in developing countries. The pathogenesis of the disease consists of the triad characterized by the presence of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*), a genetically susceptible host, and an exacerbated immune response. The pattern of immune response after exposure to group A streptococcus is one of the main determinants of the rheumatic inflammatory process leading to valve lesions. However, the evolution of RHD is variable, making it essential to identify the patients who present a higher risk of disease progression with subsequent need for valve intervention. The objective of the present study was to analyze cytokine serum levels in the different stages of RHD, and their correlation with disease severity. **Methods:** This is an observational, cross-sectional study, including 89 patients with RHD from the Bias Fortes outpatient clinic of the UFMG Medical School. Careful clinical examination was performed by the principal investigator to quantify the valvular lesions, with subsequent echocardiogram performed to better define the morphological aspect of the valve and to obtain measurements and hemodynamic calculations. Next, blood samples were collected for cytokine measurements. Serum samples were analyzed using cytometric bead array (CBA) assay for the measurement of interleukins (IL): IL-10, IL-6, IL-2, IL-4, IL-17A, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ). **Results:** The mean age of the patients was 41 ± 11.5 years with a high prevalence of women (85%). Half of the patients (49.4%) reported a history of acute RF, not associated with the need for valve intervention ($p = 0.086$). Mitral valve was the most affected, with 60 patients (67.4%) presenting isolated mitral involvement, 23 (25.9%) with mitral and aortic involvement and 6 patients (6.7%) with mitral, aortic and tricuspid involvement. At the time of inclusion in the study, 64 patients had already undergone valvular intervention (valve replacement or percutaneous or open valvuloplasty), denoting a RHD of greater severity, which required an invasive procedure to alter the disease evolution. Twenty-five patients, with the same demographic characteristics as the others, had stable RHD, with mild or moderate valve lesions, without the need for any cardiac intervention. Patients with no previous valvular intervention reported earlier onset of secondary prophylaxis with benzathine penicillin compared to patients with more severe RHD (15.7 ± 10.5 years versus 23.9 ± 10.2 years, respectively, $p = 0.002$), despite the frequency of penicillin use at study entry was similar between the groups (76.6% versus 92.0%, respectively, $p = 0.096$). When the patients were stratified according to valve intervention, it was observed that the peripheral serum concentration (pg/ml) of inflammatory cytokines was higher in the group with more severe disease than in those with low disease progression (IL-6: $p = 0.007$; TNF- α : $p = 0.017$; IL-2: $p = 0.018$; IL-17A: $p = 0.019$; IFN- γ : $p = 0.026$). The same was seen for IL-4 ($p = 0.007$). Interestingly, the expression of the anti-inflammatory cytokine, IL-10, was not different between groups ($p = 0.366$). Cluster analysis of all cytokines showed a different segregation between intervention and non-intervention groups, with IL-6/TNF- α and IL-6/IL-17A associated with intervention and non-intervention, respectively. **Conclusions:** Patients with severe RHD requiring valvular intervention had a more intense inflammatory response evidenced by high concentrations of inflammatory cytokines, as compared to patients with more favorable disease evolution. In addition, the early initiation of secondary prophylaxis of RF with the use

of penicillin was more frequent in patients with stable evolution of RHD, supported by the hypothesis that streptococcal reinfections play a fundamental role in the progression of heart disease.

Key words: rheumatic fever, rheumatic heart disease, rheumatic mitral valvopathy, inflammatory response, echodopplercardiogram, valve intervention

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação clínica da New York Heart Association (NYHA)	15
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: As citocinas e as suas principais funções	31
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ecodopplercardiograma evidenciando cardiopatia reumática mitral grave com envolvimento aórtico associado.....	14
Figura 2: Prevalência mundial da cardiopatia reumática.....	17

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AVC	acidente vascular cerebral
CBA	Cytometric Bead Array
CR	cardiopatía reumática
EI	endocardite infecciosa
EM	estenose mitral
FA	fibrilação atrial
FR	febre reumática
FRA	febre reumática aguda
HC	Hospital das Clínicas
HLA	antígeno leucocitário humano
IC	insuficiência cardíaca
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL	interleucina
IM	insuficiência mitral
INF	interferon
LABIC	Laboratório de Biologia das Interações Celulares
NK	natural killer
NYHA	New York Heart Association
OMS	Organização Mundial de Saúde
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Th	T helper (linfócito)
TNF	fator de necrose tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	CONCEITOS E HISTÓRIA NATURAL.....	12
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	16
2.3	FISIOPATOLOGIA.....	18
2.3.1	Patogênese da cardiopatia reumática.....	18
2.3.2	A resposta imune e as citocinas.....	190
2.3.2.1	Propriedades, produção e funções das citocinas.....	21
2.3.2.2	A resposta inflamatória e as principais citocinas envolvidas.....	23
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MÉTODOS.....	34
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	34
4.2	LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO.....	34
4.3	PACIENTES.....	34
4.3.1	Critérios de inclusão.....	34
4.3.2	Critérios de exclusão.....	34
4.4	RECRUTAMENTO.....	35
4.4.1	Dosagem das citocinas.....	35
4.5	CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL.....	37
4.6	PESQUISA E NORMATIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4.8	ASPECTOS ÉTICOS.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	39
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
	ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAR DE UMA PESQUISA CLÍNICA.....	67
	ANEXO B - PROTOCOLO DE PESQUISA.....	69
	ANEXO C - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	71
	ANEXO D - Aprovação pela Banca examinadora.....	72

1 INTRODUÇÃO

A febre reumática (FR) e a subsequente cardiopatia reumática (CR) permanecem como um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 15,6 milhões de pessoas estejam afetadas por essa doença. A complicação mais importante é a lesão valvar induzida pelo processo reumático, causando espessamento e calcificação das valvas cardíacas com consequente disfunção valvar. As manifestações clínicas, particularmente o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, ocorrem mais tardiamente em virtude das alterações hemodinâmicas do sistema cardiovascular e do remodelamento cardíaco. No Brasil, a FR é a principal etiologia das valvopatias em crianças e adultos jovens, responsável por até 70% dos casos. A CR grave requer tratamento invasivo, cirúrgico ou percutâneo, para troca ou reparo valvar, com significativa morbidade e morte precoce decorrente de complicações. A intervenção valvar está indicada na CR grave sintomática por ser a única opção capaz de alterar a evolução natural da doença valvar com impacto na sobrevida.

A patogênese da CR está relacionada ao padrão de resposta imune após exposição ao estreptococo do grupo A (*Streptococcus pyogenes*). Apesar dos avanços nos estudos histológicos, a precisa etiopatogenia da CR não está esclarecida. O mecanismo atualmente proposto para o desenvolvimento da CR envolve o mimetismo antigênico associado à resposta imune anormal. A base patogênica da doença é composta pela tríade caracterizada pela presença do estreptococo do grupo A, hospedeiro geneticamente susceptível e resposta imune exacerbada. Assim, melhor entendimento do processo inflamatório e dos componentes da resposta imune envolvidos na gênese da lesão valvar reumática se faz necessário, podendo revelar biomarcadores de susceptibilidade ou gravidade da CR. Além disso, identificar os pacientes que apresentem risco maior de progressão da cardiopatia permitirá estabelecer estratégias terapêuticas diferenciadas, especialmente com indicação de profilaxia secundária precoce e acompanhamento clínico mais frequente. Dessa forma, o presente estudo buscou analisar o perfil de citocinas séricas em pacientes com diferentes estágios evolutivos da CR, correlacionando-se com a gravidade de apresentação clínica e ecocardiográfica das lesões valvares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONCEITOS E HISTÓRIA NATURAL

A FR resulta de complicação não supurativa da faringoamigdalite causada pelo estreptococo beta-hemolítico do grupo A, decorrente de resposta imune tardia a esta infecção em populações geneticamente predispostas (1,2).

A febre reumática aguda (FRA) normalmente ocorre três semanas após a infecção pelo *Streptococcus pyogenes* e pode afetar as articulações (poliartrite), pele (eritema *marginatum* e nódulos subcutâneos), cérebro (coreia) e o coração (9). O quadro agudo costuma ser assintomático ou oligosintomático (9), sendo que a ocorrência do surto de FRA tem a incidência em torno de 19,6 casos por 100.000 habitantes na faixa etária de cinco a 14 anos na América Latina (3). Estima-se que 1 a 5% das crianças susceptíveis vão desenvolver FRA após um surto de faringoamigdalite estreptocócica. As manifestações clínicas da FRA são as mesmas ao redor do mundo, sendo que os critérios de Jones, desenvolvidos na década de 1950 e revisados em 2015 (72), são utilizados até a presente data para o seu diagnóstico. Artrite é a manifestação mais precoce e mais comum, presente em 60 a 80% dos quadros. Tem caráter migratório, acomete geralmente grandes e médias articulações, costuma ser muito dolorosa e, por muitas vezes, limitante. Dura cerca de quatro semanas, com recuperação completa (9). A coreia de Sydeham é uma manifestação mais tardia, geralmente ocorrendo de um a seis meses após a exposição ao estreptococo do grupo A. A sua incidência varia, dependendo da região, de 7 a 28%. É mais comum no sexo feminino (9,72). Manifesta-se como movimentos irregulares involuntários e labilidade emocional (30). As manifestações cutâneas são mais raras e de difícil diagnóstico (9). A cardite é a manifestação mais grave da doença e ocorre em cerca de 30 a 45% dos pacientes. Geralmente apresenta-se como pancardite, mas são as lesões valvares as responsáveis pelo quadro clínico e pelo prognóstico. O acometimento do endocárdio constitui marcador da cardite, envolvendo com maior frequência as valvas mitral e aórtica (8,20). O ecodopplercardiograma foi incluído na última revisão dos critérios de Jones para

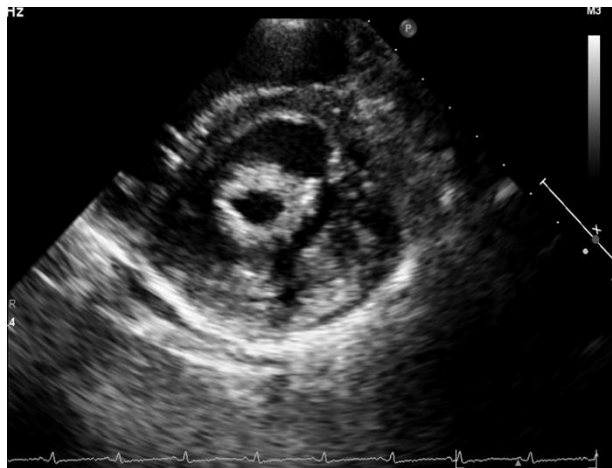
definir a presença de cardiopatia subclínica no episódio de FRA e identificar populações de alto risco de progressão da doença (72).

Há uma estimativa de que cerca de 60% dos casos de FRA evoluem para a cardiopatia reumática crônica (28). Apesar de ser possível que apenas um quadro agudo de FR já seja capaz de evoluir para doença valvar grave, a cardiopatia reumática normalmente é decorrente de dano cumulativo secundário às repetidas infecções estreptocócicas (9). Esse dano resulta em lesão das valvas cardíacas com alterações morfológicas e funcionais, resultando no desenvolvimento de insuficiência cardíaca. O intervalo entre o episódio inicial de FRA e a evidência clínica da cardiopatia reumática varia entre poucos anos até mais de 20 anos (7,19).

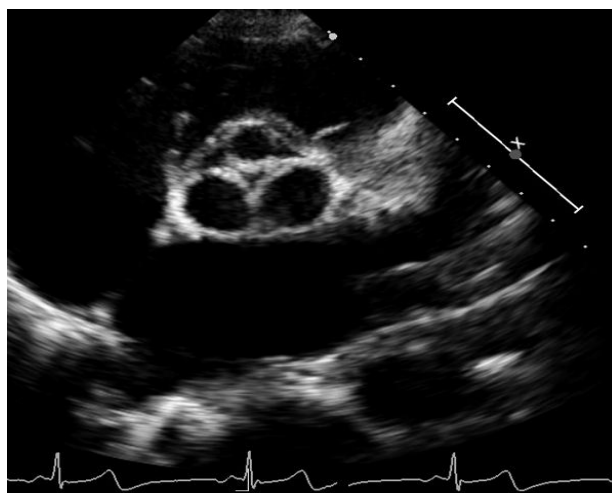
Do ponto de vista patológico, na fase aguda, verificam-se inflamação e edema das cúspides valvares, com depósitos de pequenos trombos de fibrina e plaquetas ao longo das zonas de contato das cúspides. Na fase crônica, ocorre o espessamento dos folhetos com fusão das comissuras e de cordoalhas tendíneas, podendo estar presente algum grau de calcificação dos folhetos. O grau de envolvimento patológico destas estruturas é bastante variável, conferindo ao aparelho valvar mitral uma configuração semelhante a um funil (3,31). A valva mitral é a mais frequentemente acometida pelo processo reumático. Caracteristicamente, a insuficiência mitral (IM) corresponde à lesão aguda, enquanto a estenose mitral (EM) corresponde à lesão crônica. Entretanto, é mais comum que pacientes apresentem graus variados de estenose e insuficiência da valva mitral ou em combinação com outras valvas (Figura 1). Na fase crônica, aproximadamente 25% de todos os pacientes com doença cardíaca reumática apresentam EM pura e outros 40% apresentam EM e IM combinadas. O envolvimento multivalvar é observado em 38% dos pacientes portadores de EM, sendo que a valva aórtica é afetada em quase 38% e a valva tricúspide em 6% (7,19).



A: Incidência paraesternal eixo longo.



B: Incidência paraesternal eixo curto.



C: Incidência eixo curto vasos da base.

Figura 1: Ecodopplercardiograma evidenciando cardiopatia reumática mitral grave com envolvimento aórtico associado.

Em relação aos sintomas da CR, palpitações são queixas frequentes dos portadores de valvopatia mitral, enquanto dor torácica anginosa ao esforço e síncope ao esforço são mais frequentes em pacientes com valvopatia aórtica. Todas as valvopatias podem evoluir com sintomas de insuficiência cardíaca (IC) como dispneia aos esforços, ortopneia, dispneia paroxística noturna, tosse, chiado, hemoptise, edema periférico e fadiga. É fundamental procurar dados que indiquem se o paciente apresenta limitação de provável causa cardíaca para as atividades habituais. A presença de sintomas, especialmente dispneia aos esforços, é o principal indicador de tratamento intervencionista de uma valvopatia anatomicamente grave (7). Abaixo, no quadro 1, segue a classificação universalmente utilizada para quantificar o grau de dispneia e limitação para atividades físicas.

Quadro 1: Classificação clínica da New York Heart Association (NYHA)

Classe I	Sem limitações para atividades físicas; atividade física comum não causa dispneia, palpitações ou fadiga.
Classe II	Leve limitação para atividades físicas, confortável em repouso; atividade física comum causa dispneia, palpitações ou fadiga.
Classe III	Limitação importante para atividades físicas, confortável em repouso; atividade física menos intensa que a comum causa dispneia, palpitação ou fadiga.
Classe IV	Incapaz de realizar qualquer atividade física sem desconforto, sintomas presentes em repouso; se qualquer atividade física for empreendida o desconforto aumenta.

Fonte: Braunwald Heart's Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 8th ed. p. 619.

A cardiopatia reumática constitui um fator predisponente para endocardite infecciosa (EI), especialmente em indivíduos com próteses valvares. Outra complicação muito frequente nos pacientes que possuem lesão reumática da valva mitral é o desenvolvimento de fibrilação atrial (FA), uma taquiarritmia supraventricular com ativação atrial incoordenada e contração atrial inefetiva. Sua prevalência na população geral é de 1,5 a 2,0%, aumentado com a idade, chegando a 30% dos pacientes com CR. Esta arritmia é associada a um risco cinco vezes mais alto de acidente vascular cerebral (AVC) e três vezes mais alto de insuficiência cardíaca. Hospitalizações decorrentes da FA também são muito comuns (32).

O AVC é uma grave complicação da cardiopatia reumática, podendo ser a primeira manifestação clínica da lesão valvar reumática. Apesar do AVC isquêmico estar muito relacionado à FA, a valvopatia reumática é, por si só, um fator emboligênico. Estima-se que 3 a 7,5% de todos os AVCs nos países em desenvolvimento e

subdesenvolvidos seja decorrente da CR (3), especialmente da estenose mitral reumática. O AVC é a terceira maior causa de comprometimento funcional e óbito no mundo, sendo que a taxa de mortalidade imediata chega a ser de 20% nos primeiros 30 dias após o evento. Para os sobreviventes, o tempo de recuperação é muito variável, sendo que somente 30% será totalmente independente dentro de 3 semanas e 50% dentro de seis meses (32).

No Brasil, a FR é a principal etiologia das valvopatias, responsável por até 70% dos casos (7). Estudo realizado no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) demonstrou que 20% dos pacientes internados para cirurgia cardíaca eram portadores de cardiopatia reumática. Além disso, a cardiopatia reumática foi um preditor independente de hospitalização prolongada (73).

A intervenção cirúrgica está indicada na cardiopatia reumática grave com manifestações clínicas por ser a única opção capaz de alterar a evolução natural da doença valvar (8). Esta intervenção pode ocorrer na forma de valvoplastia percutânea por balão, valvoplastia aberta ou troca valvar cirúrgica.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Apesar da reconhecida redução da incidência da FR nas últimas décadas nos países desenvolvidos, com consequente redução na prevalência da cardiopatia reumática, a FR permanece como um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (2). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 15,6 milhões de pessoas estejam afetadas por essa doença (Figura 2). No Brasil, estima-se que anualmente ocorram cerca de 10 milhões de faringoamigdalites estreptocócicas, perfazendo o total de 30.000 novos casos de FR, dos quais aproximadamente 15.000 poderiam evoluir com acometimento cardíaco (4). Estudos realizados na população de escolares em algumas capitais brasileiras estimaram a prevalência de cardiopatia reumática crônica em 1-7 casos/1.000, o que é significativamente maior do que a prevalência da doença em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, onde varia entre 0,1-0,4 casos/1.000 escolares (5,6). Estudo recente realizado no estado de Minas

Gerais utilizando-se o ecodopplercardiograma como *screening* diagnóstico (PROVAR *study*) mostrou prevalência de 0,5% de cardiopatia reumática definitiva e 3,7% de casos borderline. Esse estudo incluiu 5996 estudantes entre cinco a 18 anos de idade de escolas públicas de Belo Horizonte e da região de Montes Claros, demonstrando que a doença reumática continua sendo um problema de saúde pública no nosso meio (22).



Figura 2: Prevalência mundial da cardiopatia reumática.

Fonte: Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO expert consultation. WHO; 2004.

A incidência do surto de FRA é muito variável dependendo da região do globo, mas chega a ser de 50 por 100.000 crianças em alguns países em desenvolvimento (21). Estudo australiano recente mostrou que a taxa de recorrência da FRA ainda permanece alta, sendo de 3,7 por 100 pessoas no primeiro ano após o surto agudo inicial (70). Tendo em vista o fato de que grande parte dos casos de CR não se inicia com o episódio de FRA, o ecodopplercardiograma de *screening* permite diagnóstico precoce para a instituição de profilaxia secundária, com impacto na progressão da doença (22,23).

A CR está associada a elevadas taxas de mortalidade, sendo que, nos países em desenvolvimento, a estimativa é que esses valores cheguem a 1,5% por ano (3,29).

2.3 FISIOPATOLOGIA

2.3.1 Patogênese da cardiopatia reumática

A patogênese da CR está relacionada ao padrão de resposta imune após exposição ao estreptococo do grupo A (*Streptococcus pyogenes*). Apesar dos avanços nos estudos histológicos, a patogenia precisa da cardiopatia reumática não está esclarecida (9). O mecanismo atualmente proposto para o desenvolvimento da doença reumática envolve o mimetismo antigênico associado à resposta imune anormal. A base patogénica da doença é composta pela tríade caracterizada pela presença do estreptococo do grupo A, hospedeiro geneticamente susceptível e resposta imune exacerbada (9,10). A existência de processo autoimune na FR foi postulada após a observação de que as lesões no coração estavam associadas a anticorpos que reconheciam o miocárdio (56). Anticorpos do hospedeiro dirigidos contra antígenos estreptocócicos também reconhecem estruturas do hospedeiro, iniciando o processo de autoimunidade. Assim, como acontece o reconhecimento cruzado humoral, também acontece reação cruzada celular, com linfócitos T ativados por epítomos estreptocócicos passando a reconhecer epítomos próprios, com consequente agressão celular a tecidos próprios (11,24). Esta resposta celular parece ser especialmente importante em pacientes que desenvolvem cardite grave (57,58). O papel dos anticorpos na FR parece ser mais importante durante a sua fase inicial, causando, entre outros, artrite por depósito de imunocomplexos nas articulações. Por outro lado, a cardite grave estaria mais ligada à resposta celular (69). Estudos histológicos de biópsias de tecido cardíaco de pacientes com cardiopatia reumática mostraram plasmócitos cercados por linfócitos T CD4+, próximos a fibroblastos, sugerindo interação entre os plasmócitos (linfócito B) e o linfócito T (12,20). Os nódulos de Aschoff, considerados característicos da doença, são compostos por agregados de células semelhantes a macrófagos e monócitos, que exercem a função de células apresentadoras de antígeno para as células T (13). Desta forma, além da reação cruzada inicial, a apresentação continuada de

antígenos no sítio da lesão contribui para uma amplificação da resposta imune e ativação de maior número de clones auto-reativos de linfócitos T. A presença de linfócitos T CD4+ em grande quantidade no tecido valvar foi demonstrada em pacientes com doença reumática crônica, o que sugere papel direto destas células na patologia da doença (14,67). Além disso, uma diversidade de quimiocinas é expressa no miocárdio e no tecido valvar lesado, mediando o recrutamento de células T para o local de inflamação (65).

Mais recentemente, marcadores genéticos de suscetibilidade para a FR estão sendo avaliados. Estudos populacionais demonstraram uma associação da FR com os antígenos HLA de classe II, presentes nos linfócitos B e outras células apresentadoras de antígenos (15). É possível que exista um gene que confere suscetibilidade à FR e que cada população tenha seu próprio marcador (HLA-DR), indicando maior risco de desenvolver a doença (16,68). Entretanto, mais estudos são necessários para se determinar o mecanismo exato pelo qual moléculas HLA da classe II conferem suscetibilidade à FR. Além disso, estudos nessa área têm o potencial de possibilitar o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o estreptococo do grupo A (66). Estudos recentes têm mostrado que, nas doenças em que a resposta imunológica desempenha um papel central na patogênese, como é o caso da FR, polimorfismos em genes que codificam para proteínas envolvidas com a resposta imunológica são associados ao desenvolvimento das formas graves (18,25-27,35,59,60). O estudo de ocorrência de polimorfismos (alterações) nos genes de citocinas, importantes orquestradoras da resposta imunológica, podem apontar para fatores genéticos de susceptibilidade ao desenvolvimento de FR grave, possibilitando melhor manejo clínico do paciente. Assim, o melhor entendimento do processo inflamatório e dos componentes da resposta imune envolvidos na gênese da FR se faz necessário.

2.3.2 A resposta imune e as citocinas

A defesa contra microorganismos é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e pelas respostas tardias da imunidade adaptativa. A imunidade inata fornece a primeira linha de defesa contra microorganismos. Ela consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que estão em vigor mesmo antes da infecção e são

preparados para responder rapidamente a infecções. Esses mecanismos ativam-se em resposta aos produtos dos microorganismos e células lesionadas, e respondem essencialmente da mesma forma para exposições repetidas. Os principais componentes da imunidade inata são: barreiras físicas e químicas, tais como epitélio e agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais; células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas e células *natural killer* (NK) e outras células linfoides; proteínas sanguíneas, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação (37).

Já a imunidade adaptativa reconhece e reage a um grande número de substâncias microbianas e não microbianas. Tem como característica a especificidade e a memória, e os seus componentes são os linfócitos e seus produtos secretados, como os anticorpos e citocinas (37).

As citocinas consistem em um grande grupo heterogêneo de proteínas solúveis de baixo peso molecular produzidas por tipos diferentes de células. As citocinas medeiam e regulam diversos aspectos da imunidade inata e adaptativa (37).

Didaticamente, a resposta imune adaptativa pode ser dividida em imunidade humoral e imunidade celular, que são mediadas por diferentes componentes do sistema imune, mas que ocorrem concomitantemente e de forma interativa. A imunidade humoral é mediada por moléculas no sangue e secreções mucosas, denominadas anticorpos, que são produzidos pelos linfócitos B. A imunidade celular é mediada por linfócitos T, que se subdividem em populações fenotípica e funcionalmente distintas: os linfócitos T CD4+, CD8+ e CD4-CD8- (duplo-negativos) (37).

O desenvolvimento de uma resposta imune efetiva envolve a mobilização de diversos tipos celulares, como células linfóides, células inflamatórias e células hematopoiéticas. Várias células efetoras podem ser transportadas pela corrente sanguínea, atingindo órgãos e tecidos onde desempenharão suas funções. Os mecanismos que permitem tal sofisticação na resposta imune dos mamíferos abrangem uma enorme variedade de mensageiros solúveis. As citocinas constituem o grupo melhor caracterizado dentre esses mensageiros, podendo agir localmente

ou à distância, de maneira específica ou generalizada, transitoriamente ou de maneira sustentada, funcionando como meio de comunicação fundamental para as células do sistema imune (38).

Durante os últimos 25 anos, o estudo das citocinas ocupou lugar de destaque na Medicina, por sua utilidade potencial como agentes diagnósticos, prognósticos e terapêuticos nas doenças humanas. As citocinas são estudadas atualmente em praticamente todas as disciplinas biológicas; seus efeitos dominam principalmente os estudos sobre inflamação, imunologia, aterosclerose e oncologia (39).

O avanço das técnicas científicas tem permitido a descoberta crescente de novas citocinas e novos receptores. Muitas atividades e interações entre estas proteínas, bem como características contraditórias, foram descritas. É importante destacar que todas essas moléculas apresentam propriedades em comum, e aproximadamente todas as citocinas recém-descobertas agem em conjunto com citocinas já descritas (36).

2.3.2.1 Propriedades, produção e funções das citocinas

As citocinas compartilham muitas propriedades gerais, incluindo o mecanismo de atuação. As citocinas ligam-se a receptores específicos de membranas nas células-alvo, o que desencadeia uma via de transdução de sinais, cujo efeito final é a alteração da expressão gênica em células-alvo (36,37).

A presença de receptores de membrana específicos determina a susceptibilidade de uma célula-alvo a uma citocina particular. Os receptores de citocinas podem ser constituídos de várias cadeias diferentes. A combinação dessas cadeias pode variar de acordo com a afinidade com a qual se ligam à citocina. As citocinas e seus receptores inteiramente montados exibem alta afinidade e liberam sinais intracelulares, responsáveis por efeitos biológicos (36). Uma citocina pode atuar em diversos tipos de células e exercer múltiplos efeitos biológicos, propriedade designada como pleiotropismo. A maioria das citocinas possui uma ou duas propriedades proeminentes, além de outros efeitos. Algumas citocinas atuam primariamente como fatores de crescimento dos linfócitos T ou B, outras funcionam

como mediadores da inflamação, enquanto outras suprimem a atividade inflamatória e as respostas imunes (36,37,39).

Toda célula, com exceção das hemácias, pode produzir, bem como responder a uma citocina (39). Entretanto, a maior parte das linhagens celulares expressam somente um subconjunto de genes relacionados às citocinas. A especialização contribui para a localização anatômica da síntese de citocinas, limitando a exposição a um largo espectro de potenciais alvos celulares em tecidos distantes. Enquanto algumas citocinas são expressas por muitas e diferentes linhagens hematopoiéticas e não-hematopoiéticas (por exemplo, IL-1, IL-6, TNF- α), outras são altamente restritas (por exemplo, IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5, cuja produção é limitada a certos leucócitos). Especializações adicionais podem ser observadas, por exemplo, entre as células T, de acordo com o estágio de diferenciação e estado de ativação (38).

A natureza do estímulo que desencadeia a síntese das citocinas varia de acordo com o tipo celular e seu estágio de diferenciação e ativação, determinando quais citocinas serão produzidas por aquela célula. As células T, por exemplo, secretam essas proteínas quando o receptor de células T reconhece um antígeno ligado a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em uma célula apresentadora de antígeno apropriada, como macrófagos, células dendríticas ou células B (36,38). A síntese das citocinas pode também ser induzida ou modulada por moléculas próprias do hospedeiro, incluindo elementos ligantes de receptores coestimuladores presentes nas células T e nas próprias citocinas (38).

As funções biológicas das citocinas são diversas e de importância crucial para o funcionamento adequado do sistema imune. Essas funções estão sendo cada vez mais estudadas, gerando informações que fundamentam sua utilização como ferramentas terapêuticas. As citocinas estão envolvidas no controle das respostas imunes celular e humoral, na regulação da hematopoiese, no controle da proliferação e diferenciação celulares, entre outras atividades. O processo inflamatório é um dos principais exemplos onde a função das citocinas torna-se de fundamental importância, seja na sua indução, como na sua regulação (36).

2.3.2.2 A resposta inflamatória e as principais citocinas envolvidas

A inflamação corresponde ao processo básico por meio do qual o sistema imune inato responde às infecções e lesões teciduais. Esse processo normalmente leva ao reparo estrutural e funcional, sendo, portanto, fundamental para a manutenção da homeostase tecidual (43).

Considerando-se os processos evolutivos, a inflamação precede, em longo tempo, o desenvolvimento da imunidade adaptativa: todos os organismos multicelulares apresentam elementos da inflamação. Entretanto, a resposta inflamatória fornece sinais que induzem, juntamente com os antígenos, a proliferação e a diferenciação de linfócitos T e B antígeno-específicos. Assim, apesar de sua interconexão profunda com a imunidade inata, a inflamação é um elemento fundamental para o início da resposta imune adaptativa (42,43).

A inflamação pode ser aguda, podendo desenvolver-se de minutos a horas e perdurar por dias. Caso a infecção não seja eliminada ou caso haja lesão tecidual prolongada, os processos inflamatórios podem persistir, constituindo-se assim a inflamação crônica. A inflamação crônica envolve remodelamento tecidual, angiogênese e fibrose, podendo levar a consequências patológicas, como na artrite reumatoide (41,44). Percebe-se assim um paradoxo na inflamação: embora seja um processo essencial para a manutenção da homeostase tecidual, seus mecanismos podem também contribuir para a injúria aos tecidos. Por este motivo, a resposta imune tem também os seus mecanismos regulatórios (43).

A FR, por ser essencialmente uma resposta autoimune do organismo à infecção pelo estreptococo, possui componentes tanto da resposta adaptativa humoral quanto celular (63,64,68). A seguir será descrita uma breve consideração sobre as citocinas envolvidas neste estudo, com suas principais características e funções na resposta imune de uma forma geral e de maneira mais específica, na FR:

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

O TNF é o mediador das respostas inflamatórias agudas a bactérias e outros microorganismos (45). A maior fonte de TNF são as células da linhagem

monócito/macrófagos, sendo que linfócitos T, neutrófilos, mastócitos e células endoteliais podem também contribuir para sua produção sob diferentes circunstâncias (46).

Diversos estímulos potencialmente nocivos, desde os físicos (calor, luz ultravioleta) até os químicos e imunológicos, podem induzir rapidamente a produção e a liberação de TNF. Esta citocina é a citocina pró-inflamatória mais rapidamente produzida *in vivo*, apresentando níveis séricos detectáveis em camundongos em 30 minutos. Essa elevação provavelmente provém da liberação de estoques pré-formados da citocina em macrófagos, neutrófilos e linfócitos T ativados (46). Além disso, a ação do TNF é muito precoce: durante a progressão da doença, os níveis circulatórios de TNF retornam praticamente aos níveis basais após poucas horas.

O TNF é considerado um pirógeno endógeno, sendo capaz de agir no hipotálamo e induzir o aumento da temperatura corporal (febre). Sua ação envolve também a indução da expressão de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, que são secretadas no sangue (41,47).

O TNF exerce também outras funções que corroboram com seu papel de regulador principal da produção de citocinas inflamatórias. Se a rápida liberação do TNF em momentos de estresse é bloqueada, a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6, é reduzida. O TNF tem também a capacidade de exercer regulação positiva sobre o sistema imune, amplificando cascatas inflamatórias de maneira autócrina e parácrina e estimulando macrófagos a secretar outras citocinas proinflamatórias. Entretanto, a exposição prolongada e excessiva a esta citocina pode ser imunossupressiva (46,47).

O papel do TNF na FR ainda não foi totalmente definido, sendo que existem variações da sua ação dependendo da fase da doença. Alguns estudos mostram associação do polimorfismo gênico do TNF com a CR crônica (25,27,71). Entretanto, existem dados na literatura mostrando que não há essa associação nos pacientes durante o surto de FRA (26). Trabalho recente evidenciou que o perfil de expressão de citocinas na FR varia dependendo do seu estágio evolutivo, sendo que há uma resposta preferencial de células Th1 na FRA (com níveis séricos aumentados de IL-

6) enquanto que na CR estabelecida precoce há uma produção elevada de TNF- α (resposta mediada por células Th2). Esses achados sugerem que a citocina TNF- α tem papel importante na progressão da doença e na lesão valvar (33). Esse dado foi reforçado em trabalho realizado somente com pacientes com surto agudo de FR no qual, quando comparados com controles saudáveis, mostrou que, ao longo do tratamento da FRA, os níveis séricos de IL-6 e adiponectina aumentaram e os níveis séricos de TNF- α reduziram, principalmente nos pacientes com cardite (63). A sua expressão aumentada também esteve relacionada à doença valvar grave, indicando provável perfil inflamatório persistente (58).

b) Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma importante citocina inflamatória, que apresenta efeitos locais e sistêmicos (48). É produzida por vários tipos celulares em resposta a uma grande variedade de estímulos. Células do sistema imune inato, como macrófagos, células dendríticas e mastócitos produzem IL-6; linfócitos B e, em menor escala, linfócitos T CD4, também produzem esta citocina. Células endoteliais, fibroblastos, astrócitos, células do tecido muscular liso, células epiteliais e várias células malignas também são capazes de secretar IL-6 (49). A produção de IL-6 é induzida por citocinas como IL-1 β e TNF- α , além de substâncias provenientes da parede celular de bactérias, como os lipopolissacarídeos (47).

A IL-6 é uma citocina multifuncional, sendo capaz de induzir a diferenciação celular e a expressão de genes específicos. Esta citocina desempenha um importante papel nas fases iniciais de infecções e injúrias ao organismo, funcionando como sinalizadora da presença de ameaças e reguladora da resposta de fase aguda (50).

A IL-6 também atua sobre os linfócitos, induzindo a diferenciação de linfócitos B em células produtoras de imunoglobulinas e estimulando a diferenciação de células T CD4⁺ virgens em células produtoras de IL-17 (subtipo de linfócitos T *helper* 17 - Th17). Além disso, a IL-6 também age sobre as células T CD8⁺ para induzir sua ação citotóxica (50).

Outra função importante e que tem sido alvo de estudos recentes é a participação da IL-6 na regulação da transição da imunidade inata para a imunidade adquirida. Entre as atividades desta citocina que apontam para seu envolvimento nesta transição estão: o recrutamento, ativação e apoptose de leucócitos; participação na regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência dos linfócitos T, bem como na regulação da secreção de imunoglobulinas pelos linfócitos B (51).

Finalmente, é importante destacar que a IL-6 também apresenta propriedades antiinflamatórias. Esta citocina é capaz de inibir a liberação de TNF- α e IL-1 e aumentar os níveis séricos de mediadores antiinflamatórios, como IL-10 e cortisol. O fator determinante da ação pro ou antiinflamatória da IL-6 ainda não foi esclarecido (47,51).

Na febre reumática aguda, os dados da literatura atual mostram resultados divergentes, com trabalhos apontando para um papel da IL-6 na fase inicial da doença (33,63) e outros sem uma associação tão clara com a ação desta citocina (26). Já na cardiopatia reumática crônica, existe estudo mostrando não haver uma associação entre o polimorfismo gênico da IL-6, comparando-se pacientes com cardiopatia reumática crônica em diferentes estágios de gravidade com controles saudáveis (27). Outro estudo já mostrou uma associação de susceptibilidade de desenvolvimento da doença (25).

c) Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 destaca-se, principalmente, por sua ação supressora sobre respostas inflamatórias excessivas (41,53). Logo após a descoberta de IL-10, evidenciou-se que essa citocina é produzida por vários tipos celulares além dos linfócitos Th2, incluindo células do sistema imune inato e da resposta imune adaptativa. Exemplos de células produtoras são: células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células NK, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, linfócitos T reguladores e linfócitos B. A IL-10 também pode ser produzida por alguns tipos de células não imunes, como os queratinócitos, células epiteliais e mesmo células tumorais (52-54).

Quando comparada à secreção de outras citocinas, a produção de IL-10 é relativamente tardia após a ativação de linfócitos T ou monócitos, o que parece ser importante para o papel regulador dessa citocina (52). A importância relativa da produção de IL-10 por cada célula pode variar com o tipo, intensidade e localização do estímulo inflamatório, sendo os macrófagos geralmente grandes produtores (54).

A IL-10 inibe respostas inflamatórias tanto da resposta imune inata quanto da resposta adaptativa, sendo, portanto, uma citocina central para a resolução da inflamação. Essa ação previne lesões teciduais advindas de respostas inflamatórias excessivas (52,53).

Outra ação importante da IL-10 é a inibição da produção de várias citocinas e mediadores inflamatórios pelos macrófagos e células dendríticas, dentre eles IL-1, IL-6, IL-12, TNF e muitas quimiocinas. A IL-10 pode também exercer sua ação inibitória por meio do estímulo da liberação de mediadores anti-inflamatórios, como o antagonista do receptor de IL-1, produzido por macrófagos (52).

A inibição da produção de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos implica em atividades imunorregulatórias da IL-10 sobre as respostas Th1 e Th2. A IL-10 inibe a produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos ativados. Como a IL-12 é um estímulo crítico para a secreção de IFN- γ , que participa de reações imunológicas direcionadas contra microorganismos intracelulares, a IL-10 atua suprimindo estas reações. A IL-10 também reduz a produção de IL-4 e IL-5, inibindo as ações do subtipo de linfócito Th2, responsável, dentre outras funções, pela defesa contra helmintos (40,54).

O subtipo de linfócitos Th17 promove a inflamação e medeia a defesa contra fungos e bactérias extracelulares. Os linfócitos Th17 também produzem IL-10, representando uma importante fonte desta citocina durante doenças infecciosas (54). Estudos recentes demonstraram que a IL-10 produzida pelas células Th17 pode refinar as respostas mediadas por esse subtipo de linfócito, direcionando-as para patógenos específicos. Esses estudos também revelaram que a inibição da secreção de IL-10 por essas células ocasiona condições patológicas auto-

inflamatórias, denotando mais uma vez a importância dessa citocina para a imunorregulação (53,55).

Em relação à FR, estudo recente não conseguiu mostrar associação do polimorfismo gênico desta citocina com a FRA (26). Porém, parece haver uma relação entre o polimorfismo gênico da IL-10 com o desenvolvimento da cardiopatia reumática crônica (35) e uma expressão aumentada de IL-10 nos pacientes com doença avançada (34). Estudo envolvendo 36 crianças (37% com FRA e 63% com CR) mostrou que os níveis séricos de IL-10 variaram de 3 a 6 pg/mL, sem diferença entre os grupos, sendo que, do total de pacientes, 95% apresentavam doença valvar grave (58).

d) Interleucina 4 (IL-4)

A IL-4 é a principal citocina do subgrupo Th2 e funciona tanto como um indutor quanto como uma citocina efetora dessas células. As principais fontes celulares são os linfócitos T CD4⁺ do subgrupo Th2 e os mastócitos ativados, mas outras células do tecido também produzem esta citocina (37).

A IL-4 possui ações importantes sobre vários tipos de células. Ela estimula a mudança de classe da cadeia pesada da Ig da célula B para o isotipo IgE, agindo de forma crucial nas reações de hipersensibilidade imediata (alérgicas). Além disso, estimula o desenvolvimento de células Th2 a partir de células T CD4⁺ imaturas, funcionando como um fator de crescimento autócrino para as células Th2 diferenciadas (37).

Estudos prévios em pacientes com CR mostraram baixa produção de IL-4 nas células do tecido valvar e alta produção nas células do miocárdio, sugerindo o envolvimento de diferentes células mononucleares. Dessa forma, reforça-se o caráter regulatório desta citocina e também indutor da progressão e manutenção do dano valvar (20,69).

e) Interleucina 2 (IL-2)

A IL-2 é um fator de crescimento, sobrevivência e diferenciação de linfócitos T, que desempenha um papel importante na indução de respostas das células T e no controle das respostas imunes. É produzida principalmente por linfócitos T CD4⁺ inicialmente após o reconhecimento do antígeno e dos coestimuladores. A produção de IL-2 é rápida e transitória, iniciando-se 1 a 2 horas após o reconhecimento do antígeno, atingindo um máximo em cerca de 8 a 12 horas e reduzindo-se em 24 horas (37).

A IL-2 possui um papel essencial tanto na promoção e controle das respostas da célula T quanto nas suas funções. Ela estimula a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células T ativadas por antígeno (aumenta a produção de citocinas efetoras, tais como IFN- γ e IL-4, pelas células T). Além disso, a IL-2 é necessária para a sobrevivência e o funcionamento das células T reguladoras (37).

O aumento na produção de IL-2 em pacientes com FRA e em pacientes com CR ativa foi relatado por diversos autores (74-77). Além disso, foi observado expressão aumentada de células T CD4⁺ e expressão reduzida de células T CD8⁺ no sangue periférico durante a fase ativa da doença (75-78). Foi identificado que a produção de IL-2 pelas células mononucleares é diferente dependendo da sua localização, sendo que a produção nas células tonsilares foi baixa, enquanto que nas células do sangue periférico foi alta em pacientes com FR e CR ativa sem insuficiência cardíaca (79).

f) Interleucina 17A (IL-17A)

A IL-17 é um importante elo entre a imunidade adaptativa mediada por células T e a resposta inflamatória aguda. Ela induz a inflamação rica em neutrófilos, através da estimulação da produção de outras citocinas e quimiocinas (como TNF) que recrutam os neutrófilos (erradicam bactérias extracelulares e fungos). Além disso, a IL-17A estimula a produção de substâncias antimicrobianas, incluindo as defensinas (37).

Estudo atual analisando a expressão de citocinas associadas às células Th17 em camundongos mostrou aumento nos níveis séricos de IL-17 e IL-6 nos animais com

CR, além de maior concentração destas citocinas também no tecido valvar mitral (61). Essa correlação das citocinas expressas por células Th17 também foi evidenciada em trabalho recente em humanos, no qual 14 pacientes com doença valvar mitral reumática tiveram níveis séricos elevados de IL-17A em relação a 23 controles saudáveis, além de uma razão células Th17/células T regulatórias aumentada (62).

g) Interferon γ (IFN- γ)

O IFN- γ é a principal citocina de ativação de macrófagos e possui funções críticas na imunidade contra microorganismos intracelulares. Ele funciona principalmente como um ativador de células efectoras do sistema imunológico. Além das células Th1 CD4⁺, as células NK e células T CD8⁺ também produzem IFN- γ . As células NK secretam IFN- γ em resposta à ativação de ligantes na superfície das células hospedeiras infectadas ou estressadas ou em resposta a IL-2, atuando, neste cenário, como um mediador da imunidade inata. Na imunidade adaptativa, as células T produzem IFN- γ em resposta ao reconhecimento do antígeno e a produção é aumentada pela IL-12 e IL-18 (37).

As funções da IFN- γ são importantes na imunidade mediada por células contra os microorganismos intracelulares, por vários mecanismos: ativa os macrófagos para destruir os microorganismos fagocitados; atua sobre as células B para promover a mudança para certas subclasses de IgG e inibir a mudança para os isotipos dependentes de IL-4 (como a IgE); promove a diferenciação de células T CD4⁺ para o subgrupo Th1 e inibe o desenvolvimento das células Th2 e Th17; estimula a expressão de várias proteínas diferentes que contribuem para a amplificação antígeno associado à apresentação do MHC associado ao antígeno e à iniciação e amplificação das respostas imunológicas dependentes das células T (37). As ações do IFN- γ resultam no aumento da ingestão de microorganismos e destruição dos patógenos ingeridos.

Células mononucleares do tecido cardíaco secretam IFN- γ e TNF- α tanto na FRA quanto na CR (20). Estudo com crianças com FRA e CR crônica mostrou que os níveis séricos de IFN- γ variaram de 2 a 7 pg/mL, sem diferença entre os grupos (58).

O resumo das citocinas (locais de produção, principais ações e papel descrito na febre reumática) está apresentado na Tabela 1.

Considerando-se que o processo patológico associado à CR é de origem inflamatória e considerando-se a importância das citocinas neste processo, a hipótese formulada foi a de que a lesão valvar reumática pode ser consequência de uma intensa resposta inflamatória induzida pela produção local e sistêmica de citocinas inflamatórias e moléculas citotóxicas, com redução da resposta moduladora.

Tabela 1: As citocinas e as suas principais funções

Cito- cinas	Local de Produção	Principais Ações	Atuação na Febre Reumática
TNF- α	Macrófagos Células dendríticas Células NK Células Th1 CD4 ⁺	- Mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias e outros microorganismos infecciosos - Ativação de células endoteliais (inflamação, coagulação) - Ativação de neutrófilos - Gera febre (age no hipotálamo) e catabolismo de músculos e gorduras (caquexia) - Promove apoptose de muitos tipos celulares - Estimula várias células a secretar quimiocinas	- Papel não bem definido, parece existir variações da sua ação dependendo da fase da doença. - Pode estar associada à progressão da doença e lesão valvar.
IL-6	Macrófagos Células endoteliais Células Th2 CD4 ⁺	- Estimula a síntese de proteínas de fase aguda no fígado - Estimula a produção de neutrófilos na medula óssea - Estimula a produção de anticorpos nas células B - Estimula as células T CD4⁺ a se diferenciar em Th17	- Papel incerto, estudos sugerem estar envolvida na febre reumática aguda e nas fases iniciais da cardiopatia reumática.
IL-10	Macrófagos Células dendríticas Células T regulatórias (principal) Células Th1 CD4 ⁺	- Inibe a produção de várias citocinas inflamatórias por macrófagos e células dendríticas ativados (IL-1, TNF, IL-12, IFN-γ) - Inibe a expressão de coestimuladores e moléculas de MHC classe II em células dendríticas e macrófagos - Tem papel crucial na manutenção da homeostase no sistema imune do intestino	- A expressão aumentada parece estar associada à doença valvar avançada.
IL-4	Mastócitos ativados Células T indiferenciadas Células Th2 CD4 ⁺ (principal)	- Promove diferenciação de células T CD4⁺ para o subgrupo Th2 e inibe o desenvolvimento das células Th1 e Th17 - Estimula a mudança de classe da cadeia pesada da Ig da célula B para o isotipo IgE - Juntamente com a IL-13, contribui para uma forma alternativa de ativação dos macrófagos, que é distinta da resposta de macrófagos ao IFN-γ - Estimula o peristaltismo no trato gastrointestinal - Desencadeia o recrutamento de leucócitos	- Baixa produção nas células do tecido valvar e alta produção nas células do miocárdio, sugerindo caráter regulatório.

Cito-cinas	Local de Produção	Principais Ações	Atuação na Febre Reumática
IL-2	Células T CD4 ⁺ indiferenciadas	- Estimula a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células T ativadas por antígenos - Aumenta a produção de citocinas efetoras como IFN-γ e IL-4 pelas células T - É necessária para a sobrevivência e o funcionamento das células T reguladoras, que suprimem as respostas imunes contra os autoantígenos e outros antígenos - Estimula a proliferação e a diferenciação das células NK e das células B <i>in vitro</i>	- Expressão aumentada na febre reumática aguda e na cardiopatia reumática ativa. - Seu papel na cardiopatia reumática crônica não está bem estabelecido.
IL-17A	Células Th17 CD4 ⁺	- Induz a inflamação rica em neutrófilos - Estimula a produção de TNF - Estimula a produção de substâncias antimicrobianas (ex: defensinas)	- Concentrações séricas e em tecido valvar mitral aumentadas em pacientes com cardiopatia reumática estabelecida.
IFN- γ	Células NK Células T CD8 ⁺ Células Th1 CD4 ⁺ (principal)	- Mediador da resposta inata - Ativa os macrófagos para destruir os microorganismos fagocitados - Atua sobre as células B para promover a mudança para certas subclasses de IgG - Promove diferenciação de células T CD4⁺ para o subgrupo Th1 e inibe o desenvolvimento das células Th2 e Th17 - Estimula a expressão de várias proteínas que contribuem para a amplificação do antígeno associado a apresentação do MHC e à indicação e amplificação das respostas imunológicas dependentes das células T	- Parece apresentar concentrações séricas elevadas tanto na febre reumática aguda quanto na cardiopatia reumática crônica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil de citocinas séricas em pacientes adultos com cardiopatia reumática crônica, em diferentes fases da história natural da doença, correlacionando-se com a gravidade das lesões valvares expressa pela necessidade de intervenção valvar invasiva.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer associação entre concentração sérica de citocinas e critérios ecocardiográficos de gravidade da doença valvar.
- Verificar se existe correlação entre o padrão de acometimento valvar e a concentração sérica de citocinas.
- Identificar se um perfil específico de citocinas é encontrado em pacientes nos estágios mais avançados da cardiopatia reumática.
- Verificar a associação entre a idade do início da profilaxia secundária com penicilina e a necessidade de intervenção valvar.

4 MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de estudo observacional transversal.

4.2 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

O local da pesquisa foi o ambulatório Bias Fortes e o Hospital das Clínicas da UFMG, onde os pacientes realizam os exames clínicos, propedêutica complementar e o acompanhamento da cardiopatia reumática. Os casos que foram referenciados para abordagem valvar, seja cirúrgica ou percutânea, foram conduzidos no Hospital das Clínicas da UFMG. A dosagem das citocinas foi realizada no Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LABIC) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

4.3 PACIENTES

4.3.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com cardiopatia reumática em qualquer estágio evolutivo com idade superior a 18 anos.
- Concordância voluntária e por escrito em participar do estudo.

4.3.2 Critérios de exclusão

- Lesão valvar secundária a outras patologias como isquemia ou doença degenerativa da valva mitral.
- Doenças sistêmicas ou autoimunes que alterem a resposta inflamatória.
- Doenças infecciosas associadas como AIDS e doença de Chagas.
- Gravidez.

4.4 RECRUTAMENTO

Os pacientes com diagnóstico de doença valvar reumática caracterizada por estenose ou insuficiência, em diferentes estágios evolutivos da doença, que estavam em acompanhamento no ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas da UFMG, sem distinção de cor, classe ou grupo social, foram elegíveis para o estudo. Os pacientes foram esclarecidos sobre o estudo e convidados a participar deste. Ao concordarem, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A), em que autorizaram a utilização no estudo de seus dados clínicos e de exames cardiológicos, além da coleta de sangue. Não houve qualquer tipo de alteração no tratamento em virtude do presente estudo. A indicação ou não de tratamento cirúrgico ou valvoplastia foi realizada pela equipe médica assistente seguindo as recomendações das diretrizes atuais para tratamento das doenças valvares e avaliando individualmente os pacientes.

Após inclusão no estudo, foi realizado cuidadoso exame clínico de cada paciente pelo pesquisador principal, com o objetivo de se estabelecer a gravidade da valvopatia subjacente. Além disso, foi realizado inquérito sobre sintomas, comorbidades, presença de complicações da cardiopatia reumática, como fibrilação atrial e eventos tromboembólicos, passado de necessidade de intervenção valvar, passado de febre reumática aguda, uso atual de medicações e realização de profilaxia secundária com penicilina benzatina.

Todos os pacientes realizaram ecodopplercardiograma transtorácico de acordo com as diretrizes atuais, fornecendo não somente dados para a pesquisa, mas também parâmetros necessários para a abordagem clínica do paciente.

Os dados coletados foram inseridos em Protocolo de Pesquisa que se encontra no Anexo B.

4.4.1 Dosagem das citocinas

Amostras de soro foram coletadas de todos os pacientes para a dosagem das seguintes citocinas: IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-4, IL-17A e IL-2, utilizando o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. A escolha

deste kit específico foi baseada no fato de que o mesmo possui um perfil de citocinas que compreende a resposta imune envolvendo células Th1, Th2 e Th17, com amplo balanço imunorregulatório.

Foram coletados cerca de 5 ml de sangue periférico em frascos contendo heparina sódica (Vacutainer - BD, EUA). As amostras foram preparadas de acordo com protocolo desenvolvido para o presente estudo e para a futura análise de perfil celular. Sendo assim, foi necessária a separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Para isso, o sangue foi aplicado lentamente em tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 50 mL (Falcon, BD Biosciences, EUA) contendo 15 mL de solução Ficoll-Hypaque (Histopaque®1.077, Sigma-Aldrich, EUA). Posteriormente os tubos foram centrifugados a 400 g por 40 minutos a 20°C. Ao término da centrifugação formou-se um anel contendo as PBMCs na interface entre plasma e eritrócitos. O plasma foi pipetado e armazenado em freezer -80°C. As citocinas séricas foram avaliadas por citometria de fluxo de acordo com as especificações do fabricante.

O anel contendo as PBMCs foi coletado e transferido para outros tubos cônicos contendo meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich, EUA). Posteriormente foram lavadas por duas vezes por centrifugação (400 g, 10 minutos a 4°C). Ao final das duas lavagens, as células foram ressuspensas novamente em 1 mL do meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 5% soro humano (Sigma-Aldrich), 1,6% de L-glutamina (Invitrogen) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Cultilab), contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer, na diluição 1:20, em solução de Azul de Turks (Sigma-Aldrich, EUA) e ajustadas para a concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL. As células mononucleares do sangue periférico foram criopreservadas para a realização dos ensaios futuros por citometria de fluxo. Para tanto, após serem ajustadas para a concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL, as PBMCs foram então ressuspensas em criotubos (Imec) contendo 1,5 mL de solução de congelamento para cada $1,0 \times 10^6$ células. A solução de congelamento é constituída de 90% de Soro Fetal Bovino (Cultilab) e 10% de Dimetilsulfóxido – DMSO (Merck). Os criotubos foram deixados *overnight* a -80°C em recipiente próprio

de congelamento (Nalgene) contendo álcool isopropílico e então transferidos para nitrogênio líquido, onde estão identificadas e armazenadas até o presente momento.

Tanto os dados clínicos quanto o material biológico (sangue periférico) foram utilizados somente nesta pesquisa.

4.5 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

O cálculo amostral foi realizado a partir do primeiro experimento incluindo 48 pacientes para se determinar os valores das citocinas conforme a intervenção valvar. Selecionou-se IFN- γ para os cálculos, verificando-se um aumento na concentração sérica dessa citocina nos pacientes que foram submetidos à intervenção valvar em relação aos demais (5,3 versus 3,1 pg/mL, respectivamente). Assim, considerando-se erro alfa de 0,05, poder estatístico de 95%, na proporção de 3:1 intervenção/não intervenção, obteve-se uma amostra de 80 pacientes (20 no grupo sem intervenção e 60 no grupo de intervenção). Para os cálculos, utilizou-se *software G Power*, versão 3.1.

4.6 PESQUISA E NORMATIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

A pesquisa bibliográfica foi realizada por meio de ferramentas de busca utilizando-se as seguintes palavras-chave: febre reumática, cardiopatia reumática, valvopatia mitral reumática, resposta inflamatória, ecodopplercardiograma, intervenção valvar. A base de dados consultada foi o portal de literatura biomédica Publicações Médicas (PUBMED), disponível na internet. Os artigos incluídos como referências bibliográficas foram escolhidos após pesquisa de publicações indexadas nas áreas de interesse, de 1964 a julho de 2016. Foram também utilizados para a bibliografia livros de referência sobre os temas estudados.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram inseridos em um protocolo de pesquisa, transferidos para um banco de dados eletrônico e analisados em um sistema de análise de dados intitulado SPSS, versão 21, utilizando-se métodos estatísticos adequados.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo por si não alterou a rotina do acompanhamento clínico e tampouco das cirurgias cardíacas do hospital. Como não houve nenhuma alteração no tratamento dos pacientes, o estudo não predispôs a nenhum risco terapêutico adicional.

O estudo não trouxe benefícios imediatos em termos individuais. No entanto, o conhecimento gerado a partir dos dados obtidos pode levar a um melhor conhecimento do padrão morfológico e imunológico da lesão valvar reumática e sua correlação com o perfil epidemiológico dos pacientes com doença reumática no Brasil. Além disso, pode servir de base, juntamente com outros estudos, para a investigação de novas abordagens terapêuticas na doença reumática para evitar progressão da lesão valvar. Todos os pacientes incluídos no estudo são acompanhados no serviço de cardiologia do Hospital das Clínicas da UFMG no Ambulatório Bias Fortes.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Projeto: CAAE 32715214.90005149) (Anexo C).

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

CYTOKINE PROFILE ASSOCIATED WITH RHEUMATIC VALVE DISEASE SEVERITY

Adriana C. Diamantino Soares, MD¹, Livia S. Araújo Passos², Craig Sable, MD³,
Andrea Beaton, MD³, Kenneth J. Gollob, PhD^{2,4}, Walderez O. Dutra, PhD²,
Maria Carmo P. Nunes MD, PhD¹

Institutions:

1. Postgraduate Course of Infectious Diseases and Tropical Medicine, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
2. Laboratory of Cell-Cell Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
3. Children's National Health System, Washington DC, USA
4. Center for Research and Education, Instituto Mario Penna, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Address for correspondence:

Prof. Maria Carmo P. Nunes - Department of Internal Medicine, School of Medicine of the Federal University of Minas Gerais

Av. Professor Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, 30130 100 - Belo Horizonte, MG, Brazil - Phone: +55 31 34099746 Fax: +55 31 34099437

Email: mcarmo@waymail.com.br

ABSTRACT

Background: Rheumatic fever (RF) and subsequent rheumatic heart disease (RHD) remain a serious public health problem in developing countries. The pathogenesis of the disease consists of the triad characterized by the presence of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*), a genetically susceptible host, and an

exacerbated immune response. The pattern of immune response after exposure to group A streptococcus is one of the main determinants of the rheumatic inflammatory process leading to valve lesions. However, the evolution of RHD is variable, making it essential to identify the patients who present a higher risk of disease progression. The objective of the present study was to analyze cytokine serum levels in the different stages of RHD, and their correlation with disease severity, stratified by the need for valve intervention. **Methods:** This is an observational, cross-sectional study, including 89 patients with RHD from the Bias Fortes outpatient clinic of the UFMG Medical School. Careful clinical examination was performed by the principal investigator to quantify the valvular lesions, with subsequent echocardiogram performed to better define the morphological aspect of the valve and to obtain measurements and hemodynamic calculations. Next, blood samples were collected for cytokine measurements. Serum samples were analyzed using cytometric bead array (CBA) assay for the measurement of interleukins (IL): IL-10, IL-6, IL-2, IL-4, IL-17A, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ). **Results:** The mean age of the patients was 41 ± 11.5 years with a high prevalence of women (85%). Half of the patients (49.4%) reported a history of acute RF, not associated with the need for valve intervention ($p = 0.086$). Mitral valve was affected on all cases, with 60 patients (67.4%) presenting isolated mitral involvement, 23 (25.9%) with mitral and aortic involvement and 6 patients (6.7%) with mitral, aortic and tricuspid involvement. At the time of inclusion in the study, 64 patients had already undergone valvular intervention (valve replacement or percutaneous or open valvuloplasty), denoting a RHD of greater severity, which required an invasive procedure to alter the disease evolution. Twenty-five patients, with the same demographic characteristics as the others, had stable RHD, with mild or moderate valve lesions, without the need for any cardiac intervention. Patients with no previous valvular intervention reported earlier onset of secondary prophylaxis with benzathine penicillin compared to patients with more severe RHD (15.7 ± 10.5 years versus 23.9 ± 10.2 years, respectively, $p = 0.002$). When the patients were stratified according to valve intervention, it was observed that the peripheral serum concentration (pg/ml) of inflammatory cytokines was higher in the group with more severe disease than in those with low disease progression (IL-6: $p = 0.007$; TNF- α : $p = 0.017$; IL-2: $p = 0.018$; IL-17A: $p = 0.019$; IFN- γ : $p = 0.026$). The same was seen for IL-4 ($p = 0.007$). Interestingly, the

expression of the anti-inflammatory cytokine, IL-10, was not different between groups ($p = 0.366$). Cluster analysis of all cytokines showed a different segregation between intervention and non-intervention groups, with IL-6/TNF- α and IL-6/IL-17A associated with intervention and non-intervention, respectively. Besides that, when analyzing the echocardiographic parameters, the echo score of mitral involvement had a negative correlation with IL-17A, showing that the lower the interleukin serum concentration, the higher the valve damage. **Conclusions:** Patients with severe RHD requiring valvular intervention had a more intense inflammatory response evidenced by high concentrations of inflammatory cytokines, as compared to patients with more favorable disease evolution. The interleukin IL-17A may play a role on the regulation of the inflammatory response on RHD. In addition, the early initiation of secondary prophylaxis of RF with the use of penicillin was more frequent in patients with stable evolution of RHD, supported by the hypothesis that streptococcal reinfections play a fundamental role in the progression of heart disease.

Key words: rheumatic fever, rheumatic heart disease, rheumatic mitral valvopathy, inflammatory response, echodopplercardiogram, valve intervention

INTRODUCTION

Rheumatic heart disease (RHD) remains an important public health challenge in developing countries, where it is the major cause of cardiovascular morbidity and premature death in children and young adults (2,7,18,19). RHD is the consequence of valvular damage caused by an abnormal immune response triggered by group A streptococcal pharyngitis, usually during childhood. The pathogenesis of RHD is incompletely understood and depends on several host factors that mediate a pathological autoimmune response. Molecular mimicry between streptococcal antigens and human proteins in association with an aberrant host immune response is the cornerstone of RHD pathophysiology (6,20).

RHD is a progressive condition that often results from cumulative inflammation of the cardiac valves due to recurrent episodes of ARF leading to chronic valvular dysfunction (6). The rate of progression of valvular lesions may be influenced by multiple factors, including burden of streptococcal exposure, streptococcal serotypes,

genetic predisposition, and variations in immune response (6,20). In this context, cytokines involved in the activation of the immune response may play a role in determining RHD progression. Autoreactive T cells (CD4+) migrate from peripheral blood to the heart and proliferate in the valves in response to stimulation with specific cytokines (21,22). High TNF alpha, interferon gamma, and low IL-4 were detected in the rheumatic valve tissue (11), supporting the hypothesis that an exacerbated inflammatory reaction induces progressive and permanent valve damage. A previous study showed that mononuclear cells from heart lesions predominantly secrete IFN- γ and TNF- α , Th1-type cytokines, in chronic RHD patients (12,23).

Once valve lesions have developed, further progression to life-threatening valve dysfunction may vary, and the identification of patients at risk for disease progression with subsequent need for intervention is essential. Thus, circulating cytokine profile may have potential value for clinical risk stratification in RHD patients. The present study was designed to determine the cytokine profile of patients in a wide spectrum of RHD severity, specifically if a particular cytokine profile is associated with the need for valve intervention.

METHODS

Study Population

This is an observational, cross-sectional study, including patients who were referred for management of rheumatic valve disease from a tertiary center for heart valve disease. The study initially enrolled 98 patients with RHD from March 2015 to May 2016, but 9 patients were excluded because of the presence of: other systemic or inflammatory diseases that could independently alter the cytokine profile (1 patient with lupus erythematosus, 1 patient with active breast cancer, 1 patient with sickle cell anemia); other infectious diseases such as HIV or Chagas disease (1 patient with dengue, 2 patients with Chagas disease); valve disease due to other causes (1 patient with ischemic mitral regurgitation, 1 patient with degenerative aortic valve disease); and pregnancy (1 patient). This study was approved by the Ethics

Committee of Federal University of Minas Gerais and written informed consent was obtained from all patients.

Careful clinical examination was performed by the principal investigator to quantify the valvular lesions. The previous clinical history was collected, focusing on symptoms, comorbidities, history of ARF, recurrent pharyngotonsillitis, and also valvular complications such as atrial fibrillation, stroke or the need for valvular intervention. Information on current medications used and secondary prophylaxis with penicillin was also assessed.

Definition of severity of rheumatic heart disease

The main outcome was the need for valve intervention, defined by any invasive valve procedure performed previously to the enrollment in the study. Indications for intervention followed the guidelines for treatment of valve disease, and the criteria were based on the presence of symptoms associated with echocardiographic parameters that quantify valve dysfunction as severe, including morphologic characteristics of the valve, repercussions on the cardiac chambers, ventricular function, and pulmonary hypertension (13).

Echocardiographic Evaluation

Echocardiogram was performed following the current recommendations regarding imaging acquisition to better define the morphological aspect of the valve and to obtain measurements and hemodynamic calculations. The valvular damaged was quantified by the most recent guidelines on the subject into mild, moderate and severe (13). The impairment of the right and left ventricle was also accessed to better identify the severity of the valvular disease.

Cytometric Bead Array Assay

Peripheral blood samples were collected from all patients for cytokine measurements, using a cytometric bead array (CBA) assay containing interferon-

gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-17A (IL-17A), interleukin-10 (IL-10), interleukin-6 (IL-6), interleukin-4 (IL-4) and interleukin-2 (IL-2).

To assess the levels of these cytokines in the sera from patients, CBA kits (BD Biosciences, California, USA) were utilized according to manufacturer's protocol. A minimum of 2000 events were collected per sample. Data analysis was performed using FlowJo cytometry analysis software (FlowJo, Tristar, San Jose) and the median fluorescence intensity (MFI) of each bead cluster was evaluated to calculate the cytokine concentration in the sera of patients. Cytokines concentrations were extrapolated according to the standard curve created by serial dilutions of the positive control. The concentrations of cytokines were expressed in pg/mL.

Statistical analysis

Continuous data, expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) or median and interquartile range, were compared using Student's paired t-test or the Mann-Whitney test, as appropriate. Categorical variables have been reported as numbers and percentages and assessed using the chi-square test. P values <0.05 were regarded as statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). The graphs were provided by GraphPad Prism version 5.0 (San Diego, CA). Cluster analysis and heatmaps were performed using the ClustVis software (15).

RESULTS

Baseline clinical characteristics

Of the final 89 patients, 13 were male (14.6%) and 76 female (85.4%). The mean age was 41 years (standard deviation $\pm$ 11.5 years). Fifty-five patients (61.8%) were asymptomatic at the time of recruitment into the study while the remaining 34 patients (38.2%) were in NYHA functional class II or III.

At the time of enrollment in the study, 64 (71.9%) patients had previously been submitted to valve intervention, including either percutaneous or surgical

valvuloplasty or valve replacement. From these 64 patients, 9 (14.1%) underwent valve replacement (4 biological mitral prostheses, 3 mechanical mitral prostheses, 1 mechanical aortic prosthesis and 1 patient had mitral and aortic replacement, with implant of biological prostheses). The other 55 (85.9%) patients underwent percutaneous mitral valvuloplasty. Between these 64 patients, 15 (23.4%) of them performed valve intervention more than once. When comparing patients with one valve intervention versus patients with more than one valve intervention, there was no difference considering the cytokine expression (IFN- γ : $p = 0.063$; IL-17A: $p = 0.456$; TNF- α : $p = 0.272$; IL-10: $p = 0.516$; IL-6: $p = 0.815$; IL-4: $p = 0.787$; IL-2: $p = 0.191$).

The demographic and clinical characteristics of the study population are shown in Table 1, divided into patients with and without valve intervention. Atrial fibrillation was present in 25 patients (28.1%). The rates of atrial fibrillation and stroke were similar between patients that had less severe valve lesion compared to those who had been submitted to some valvular procedure (20.0% versus 31.2%, $p = 0.289$; 20.0% versus 20.3%, $p = 0.974$, respectively). The clinical status evaluated by vital signs showed that patients without valve intervention did not differ from the ones with valve intervention on regards of heart rate, systolic blood pressure and diastolic blood pressure ($p = 0.311$; $p = 0.178$; $p = 0.811$, respectively).

The body surface area (BSA) had a statistically significant difference between the groups, showing a smaller value on the patients who had valve intervention comparing to the ones who did not ($1.70 \pm 0.21 \text{ m}^2$ versus $1.80 \pm 0.18 \text{ m}^2$, $p = 0.037$, respectively), probably because of the presence of more male patients on the no intervention group.

The previous history of recurrent pharyngotonsillitis and the presence of rheumatic heart disease on siblings was not different between the groups with and without intervention ($p = 0.593$, $p = 0.519$, respectively).

Only half of subjects (49.4%) had a clinical history of ARF and this feature was not associated with the need of valve intervention ($p = 0.086$). On regards the occurrence of symptoms during the ARF, the most common one was arthritis (5

patients on the no intervention group and 18 patients on the intervention group), followed by the association of arthritis and carditis (7 patients on the no intervention group and 5 patients on the intervention group). Isolated carditis occurred only on 1 individual on each group and the same happened with isolated chorea. Chorea appeared with arthritis in 1 patient on the group without intervention and with carditis in 1 patient on the group with intervention. The skin manifestations did not occurred alone on neither group, but it was present associated with arthritis (1 patient on each group). There was 1 patient on the intervention group who had an association of carditis, arthritis and chorea. There was no statistical difference between the groups on regards the pattern of symptoms during ARF ($p = 0.089$) and, when analyzing the cytokine profile, dividing the patients into with carditis and without carditis, there was no difference on the sera concentration for none of them (IFN- γ : $p = 0.311$; IL-17A: $p = 0.457$; TNF- α : $p = 0.262$; IL-10: $p = 0.204$; IL-6: $p = 0.442$; IL-4: $p = 0.961$; IL-2: $p = 0.714$).

The rate of use of penicillin as a secondary prophylaxis at any time of the patient lives was similar when comparing the two groups with and without intervention (76.6% versus 92.0%, $p = 0.096$). However, it was observed that the age of onset of penicillin use was earlier in patients of less severe disease than in those who had required valve intervention (23.9 ± 10.2 years versus 15.7 ± 10.5 years, $p = 0.002$).

Echocardiographic data

The echocardiographic measurement comparing according to valve intervention are shown in Table 2. There were no differences of the echocardiographic parameters between the patients who required intervention and those with no intervention, except for left atrial diameter that was greater in the group with intervention (44.0 ± 9.3 mm versus 48.4 ± 7.0 mm, $p = 0.019$), but with similar values for left atrial index volume (51.1 ± 23.1 mL/m² versus 52.6 ± 10.5 mL/m², $p = 0.860$). Right ventricular dysfunction was detected in 11.5% of the patients, with similar incidence between the groups (8.0% for patients without valve intervention versus 12.9% for patients with valve intervention, $p = 0.516$). The mitral valve morphology assessed by

echo score was also similar between the groups (7.4 ± 1.7 versus 7.8 ± 1.1 , $p = 0.422$).

The systolic pressure in the pulmonary artery (SPAP) calculated from the peak velocity of the regurgitation jet from the tricuspid valve had only mild elevation on both groups considering the cut-off value of 35 mmHg (16), with no statistical difference between patients without valve intervention and with valve intervention (38.8 ± 20.5 mmHg versus 41.0 ± 14.3 mmHg, $p = 0.608$).

When analyzing the damage on the left ventricle through the measurements of ejection fraction and diastolic and systolic dimensions it was possible to see that there was no impairment on left ventricle systolic function in neither groups ($64.0 \pm 7.9\%$ versus $63.4 \pm 7.0\%$, $p = 0.717$), despite the slight enhance on the diameters in both groups (diastolic diameter: 50.9 ± 5.9 mm versus 48.4 ± 7.0 mm, $p = 0.118$; systolic diameter: 33.2 ± 5.7 mm versus 31.6 ± 4.9 mm, $p = 0.196$), considering the reference values for women with a mean age of 41 years-old (17).

Considering the type and number of valves with rheumatic disease, mitral valve was affected on all cases. Sixty patients (67.4%) had isolated mitral valve impairment, 23 (25.9%) had both mitral and aortic valves involved, and 6 (6.7%) had mitral, aortic and tricuspid valves damaged by rheumatic heart disease. There was no statistical difference between the two groups regardless the pattern of valve involvement (isolated mitral valve disease was present on 52.0% of patients without valve intervention versus 73.4% of patients with valve intervention, $p = 0.052$), but with a tendency of more mitral valve disease on the intervention group because of the recruitment site.

When analyzing the pattern of valve involvement, among patients with only mitral valve disease, 43 had isolated mitral stenosis (17 mild disease, 13 moderate disease and 13 severe disease), 4 had mitral stenosis as the main disease (3 moderate and 1 severe disease), 6 had mitral regurgitation as the main disease (2 mild, 3 moderate and 1 severe disease) and 7 had balanced mitral disease (4 mild, 1 moderate and 2 severe disease). Five patients had both mitral and aortic valve damaged, but had a worst lesion in the aortic valve, with 2 severe aortic stenosis, 1 severe aortic

regurgitation and 2 moderate aortic regurgitation. Twenty-four patients had more than one valve with rheumatic disease, but had mitral stenosis as the main involvement, with mild disease on 10 patients, moderate in 8 and severe in 6 of them.

Taking into account all the echocardiographic parameters, when analyzing each one separately with the cytokines sera concentration, only the Wilkins-Block score showed a statistical significant correlation: the higher the score, the lower the expression of IL-17A (correlation coefficient -0.357, $p = 0.019$).

Cytokines

In order to determine if a particular cytokine profile was associated with the clinical outcome of rheumatic disease, we evaluated the expression of serum cytokines in patients who underwent or not valve intervention. When the patients were stratified according to valve intervention, it was observed that the expression of the inflammatory cytokines, analyzed by peripheral serum concentration in pg/mL, was higher in the more severe group than in those with slower disease progression (IL-6: $p = 0.007$; TNF- α : $p = 0.017$; IL-2: $p = 0.018$; IL-17A: $p = 0.019$; IFN- γ : $p = 0.026$, Figure 1). In addition, IL-4 was also higher in the more severe group (IL-4: $p = 0.007$, Figure 1). While inflammatory cytokines were increased in the intervention group, no statistical difference was observed regarding the expression of the regulatory cytokine IL-10, as compared to the non-intervention group ($p = 0.366$). Interestingly, cluster analysis of all cytokines showed distinct segregation patterns of cytokines when comparing intervention and non-intervention groups. We observed that IL-17A and IL-6 clustered together in patients who did not undergo valve intervention (Figure 2). On the other hand, IL-17A was alone in the hierarchy plot, while IL-6 grouped together with TNF- α , in patients who underwent valve intervention (Figure 3). IL-2 and IL-4 clustered together and apart from the inflammatory cytokines in both groups (Figures 2 and 3).

Cytokine analysis in sera from patients with or without intervention, stratified based on the median age of penicillin onset (19 years of age), showed that patients who underwent intervention but started penicillin at an earlier age (lower than median)

displayed higher IL-10 ($p = 0.039$) and higher IL-4 ($p = 0.043$), as compared to those who started penicillin later.

DISCUSSION

Rheumatic Heart Disease (RHD) is the most common acquired heart disease in children and young adults (1). It causes substantial morbidity in children and adults, and can affect quality of life and economic growth. According the 2004 WHO report, the number of disability-adjusted life-years (DALY) lost to the disease was as high as 5.2 million per year, worldwide (2). Severe heart valve damage is the main cause of disease mortality and morbidity. While the inflammatory nature of rheumatic fever-associated heart pathology is well-accepted (24,32), the underlying mechanisms involved in the development of severe forms is not completely understood. In this study, we sought to investigate whether a specific cytokine expression or profile was associated with disease severity that requires intervention. The population enrolled had a high rate of valvular intervention (71.9%) because the recruitment was made on a referral center for severe cases of rheumatic heart disease in Minas Gerais, Brazil.

The prevalence of females on this study (85.4%) is on agreement with epidemiological profiles from a few regions around the globe that show that women have a predominance of acute rheumatic fever and women of childbearing age do have a higher prevalence of established rheumatic heart disease than do men (3-5). There is no biological explanation for this preference of gender of the RHD to date, but some research observations affirm that women have a genetically-mediated immunological factor that predispose to autoimmune diseases (6). There was no statistical significant difference among cytokine sera concentration when comparing gender in this study.

The overall prevalence of stroke was 20.2% (18 patients), which is higher than the expected global incidence on patients with RHD, but it is in agreement when considering the rate of this complication in patients with mitral stenosis (1,8,9). The majority of patients included on this study (79.8%) had mitral stenosis as the predominant type of valvular lesion. This can be explained by the fact that the

recruitment place was a referral one for more severe cases of valve disease, especially those with indication of percutaneous mitral valvuloplasty. The pattern of valvular involvement by the rheumatic process is similar to described in the literature (1,10,13,14) with mitral valve more frequently affected.

Patients might be diagnosed with RHD after a known ARF attack, however, the disease is often diagnosed in patients who were previously asymptomatic or who do not recall ARF symptoms or episodes. The first sign of disease in most patients is shortness of breath, which occurs between 20 and 50 years of age (4). When patients have the asymptomatic profile, it is a challenge to perform an early diagnosis, leading to a late use of secondary prophylaxis with benzathine penicillin (5). Although the frequency of penicillin use at study entry was similar between the groups with and without valvular intervention, patients with no previous valvular intervention reported earlier onset of secondary prophylaxis compared to patients with more severe RHD of almost a decade, supporting the concept that streptococcal reinfections are known to be directly related to morbidity, mortality, and progression of the disease (1,7). In addition, higher concentration of IL-10 and IL-4 in the subset of patients who underwent intervention and started early secondary prophylaxis based on the median age of penicillin onset, suggest that early penicillin treatment may augment the regulatory profile and it will be important to investigate whether the patients who express higher IL-10 and IL-4 will have a better prognosis amongst the intervention group.

The cytokine profile observed in the patients enrolled in this study showed that there is an elevated concentration of inflammatory cytokines related to the progression of the disease. Furthermore, when the data was analyzed in cluster, evaluating the heatmap for cytokine profile, classified by patients without and with valve intervention (figures 2 and 3), we observed that in both maps IL-2 and IL-4 clustered together, suggesting a co-production/regulation of these cytokines during rheumatic fever, regardless the outcome. This suggests that these cytokines probably may not influence the progression of disease. In contrast, when analyzing the heatmap from the intervention group, we observed a clustering of TNF- α and IL-6 in an independent tree, which does not occur in the no intervention group, suggesting that these

cytokines may influence prognosis of rheumatic heart disease, specially because both are inflammatory cytokines with tissue damage action. Although previous studies have demonstrated that inflammatory cytokines are increased in RHD (25-27), our study shows that TNF- α and IL-6 are closely regulated and associated with the adverse outcome. An interesting point is that this association was not observed in the cluster plot for the patients without valve intervention, when IL-6 clustered together with IL-17A and TNF- α was not associated with these cytokines.

Previous studies have shown that IL-6 is important for the induction of Th17 cells (28). This association between IL-6 and IL-17A in patients with less severe disease suggests that the development of Th17 cells or, at least the coordinated production of these cytokines may be protective in RHD. It has been described that IL-17A is increased in RHD patients as compared to controls (29). However, clinical evolution of the patients was not evaluated in that study. Despite the association of IL-17A with autoimmune processes, this cytokine has been associated with protection in other diseases such as Chagas heart disease (30). The fact that patients with a less damaged valve (a lower Wilkins-Block score) had a higher expression of IL-17A can signalize that maybe on RF this cytokine also has a regulatory function. Cluster analysis also showed that IL-10, a modulatory cytokine, was not tightly linked to any other cytokine, suggesting that the control of the inflammatory response in individuals with less severe disease might be attributed to other cytokines, as shown on previous studies (31).

CONCLUSIONS

Our study shows that patients with more advanced rheumatic heart disease requiring valve intervention displayed higher levels of circulating pro-inflammatory cytokines and that the dynamics of production of these cytokines is distinct comparing between the patients with milder or severe disease. The correlation between TNF- α and IL-6 on the patients who once have needed valve intervention shows that these cytokines may have participation on valve tissue damage. Besides that, the co-production of IL-17A and IL-6 on the patients with more stable disease added to the fact that IL-17A

had a negative correlation with the echo score indicates that this interleukin may have a regulatory role on RHD.

In addition, the early initiation of secondary prophylaxis of RF with the use of penicillin was more frequent in asymptomatic patients who had stable condition, supporting the hypothesis that streptococcal reinfections play a fundamental role in the progression of the disease.

These data provide insights towards the understanding of the immunoregulatory mechanisms associated with RHD and indicate inflammatory cytokine levels as a potential tool for detecting disease severity. Further longitudinal analysis will be performed to validate this data.

FIGURES AND TABLES

Table 1: Demographic and clinical features of the study population, stratified by valve intervention.

Demographic and clinical features	No intervention	Intervention	<i>p</i> Value
Mean age (years)	40.5 ± 13.0	41.4 ± 11.0	0.736
Gender female (%)	17 (68.0%)	59 (92.0%)	0.004
Body surface area (m ²)	1.80 ± 0.18	1.70 ± 0.21	0.037
History of ARF	16 (64.0%)	28 (43.8%)	0.086
Atrial fibrillation	5 (20.0%)	20 (31.2%)	0.289
Stroke	5 (20.0%)	13 (20.3%)	0.974
FC of NYHA III	4 (16.0%)	6 (9.4%)	0.374
Use of penicillin	23 (92.0%)	49 (76.6%)	0.096
Mean age of start of penicillin (years)	15.7 ± 10.5	23.9 ± 10.2	0.002
Heart rate (bpm)	72.6 ± 11.5	70.3 ± 8.6	0.311
Systolic blood pressure (mmHg)	121.7 ± 18.3	117.2 ± 12.2	0.178
Diastolic blood pressure (mmHg)	74.4 ± 12.3	75.0 ± 9.9	0.811
RHD in siblings	1 (4.0%)	5 (7.8%)	0.519
History of recurrent pharyngotonsillitis	16 (64.0%)	37 (57.8%)	0.593

ARF: acute rheumatic fever; bpm: beats per minute; FC: functional class; NYHA: New York Heart Association; RHD: rheumatic heart disease.

Table 2: Echocardiographic features of the study population, stratified by valve intervention.

Baselines values	No intervention	Intervention	<i>p</i> Value
LV diastole (mm)	50.9 ± 5.9	48.4 ± 7.0	0.118
LV systole (mm)	33.2 ± 5.7	31.6 ± 4.9	0.196
LV ejection fraction (%)	64.0 ± 7.9	63.4 ± 7.0	0.717
Normal RV function	23 (92.0%)	54 (87.1%)	0.516
IMVD	13 (52.0%)	47 (73.4%)	0.052
LA diameter (mm)	44.0 ± 9.3	48.4 ± 7.0	0.019
LA volume index (mL/m ²)	51.1 ± 23.1	52.6 ± 10.5	0.860
SPAP (mmHg)	38.8 ± 20.5	41.0 ± 14.3	0.608
Wilkins-Block score	7.4 ± 1.7	7.8 ± 1.1	0.422
Peak gradient (mmHg)	15.4 ± 7.9	15.7 ± 5.6	0.867
Mean gradient (mmHg)	8.2 ± 5.1	8.4 ± 6.1	0.914
MV area (cm ²)	1.4 ± 0.42	1.4 ± 0.37	0.764

IMVD: isolated mitral valve disease; RV: right ventricle; LA: left atrium; LV: left ventricle; SPAP: systolic pulmonary artery pressure; MV: mitral valve.

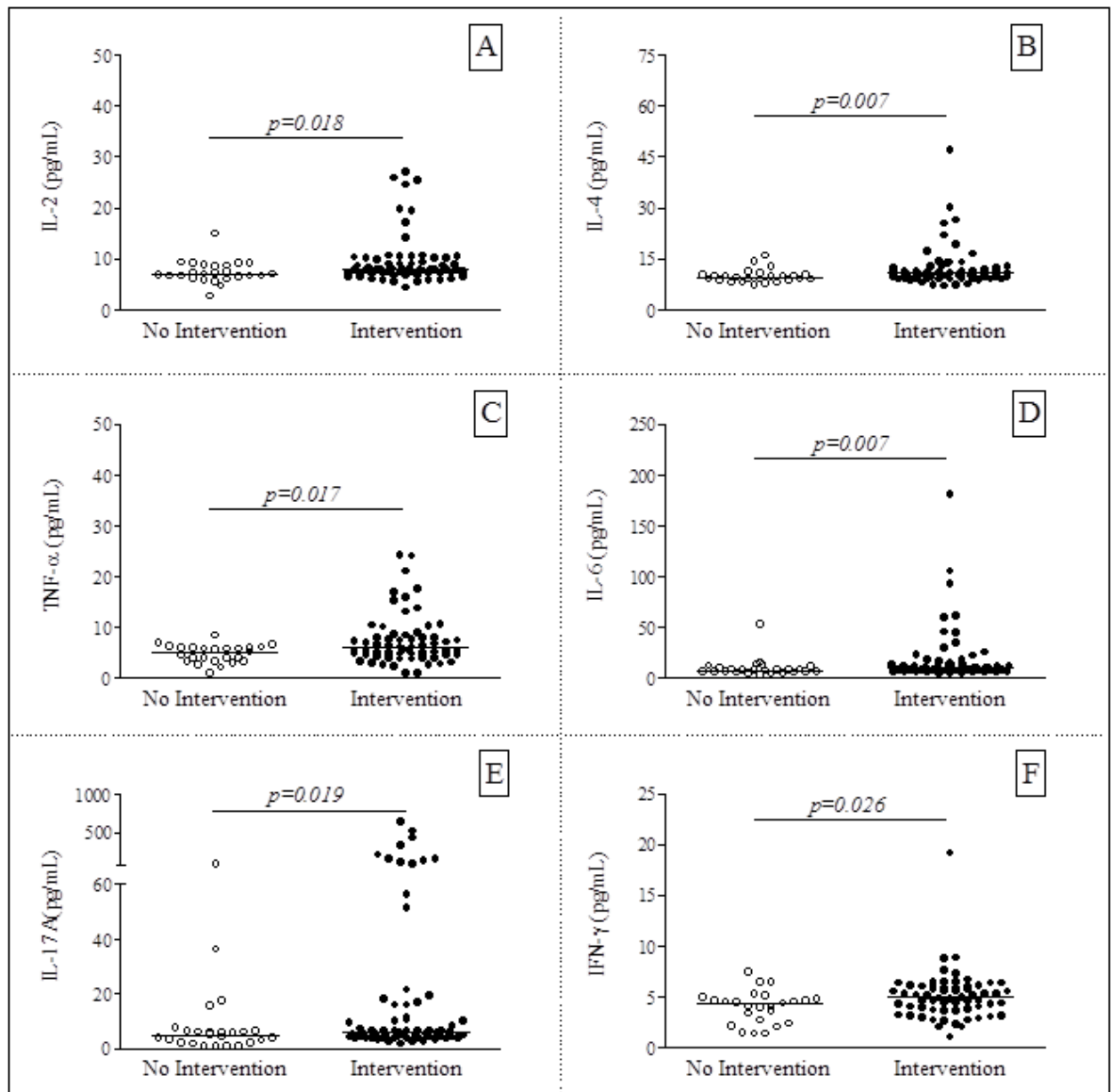


Figure 1: Cytokine serum concentration comparing rheumatic disease patients who underwent or not valve intervention.

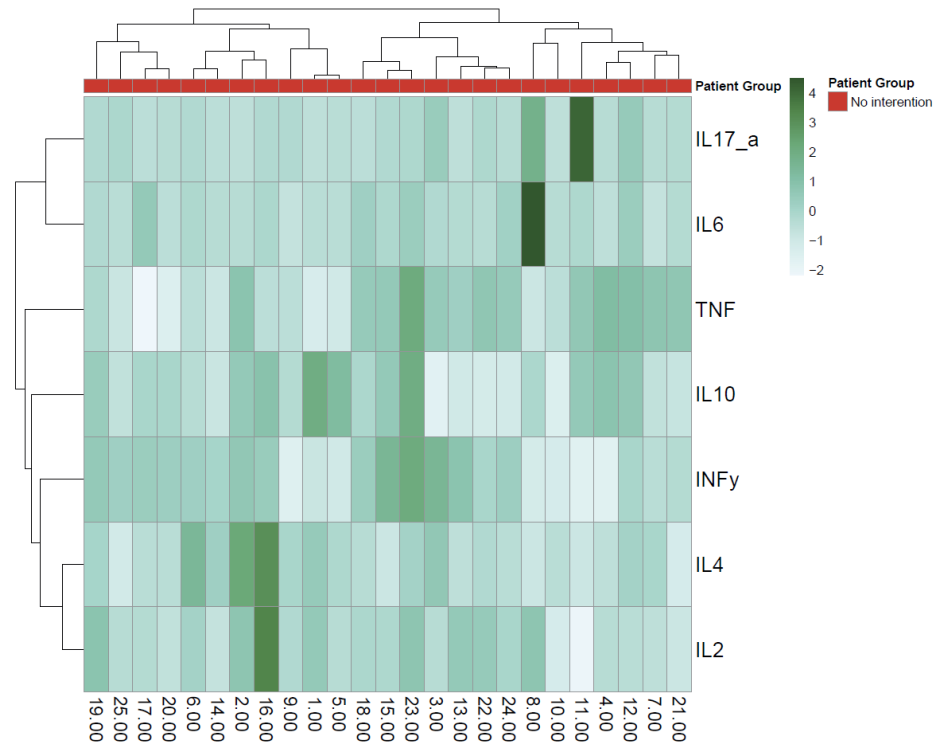


Figure 2: Heatmap with cytokine profile in rheumatic heart disease patients without valve intervention.

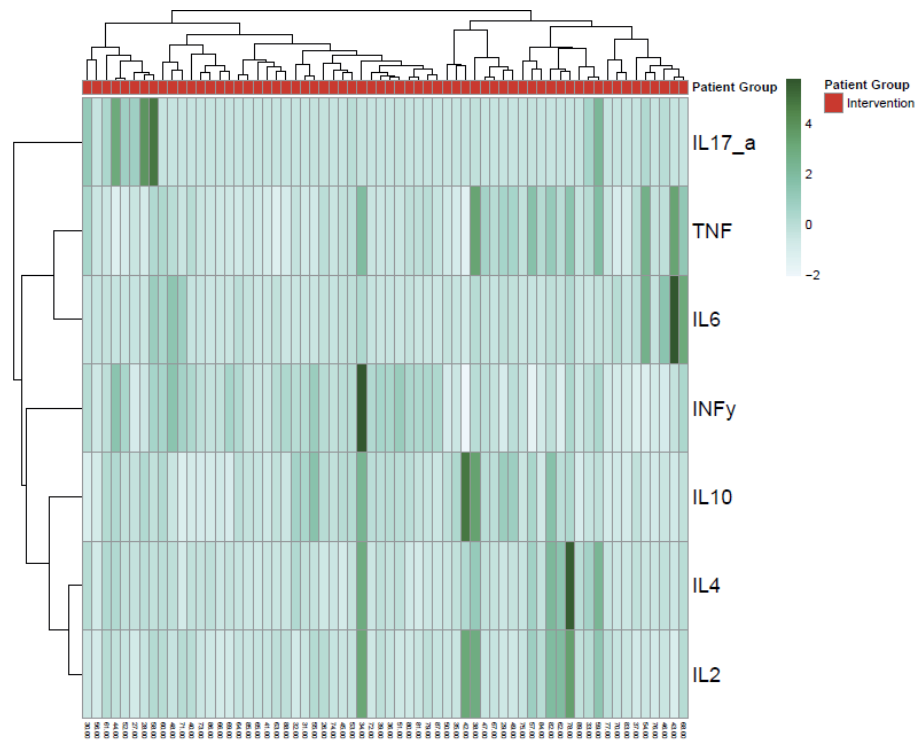


Figure 3: Heatmap with cytokine profile in rheumatic heart disease patients with valve intervention.

REFERENCES

1. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK et al. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*. 2005 Nov;5(11):685-94.
2. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO expert consultation on rheumatic fever and rheumatic heart disease. World Health Organization. Geneva, 2001 Oct 29 - Nov 1. Geneva: WHO; 2004.
3. Carapetis JR, Wolff DR, Currie BJ. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease in the top end of Australia's Northern Territory. *Med J Aust*. 1996 Feb 5;164(3):146-9.
4. Sliwa K, Carrington M, Mayosi BM, Zigiriadis E, Mvungi R, Stewart S. Incidence and characteristics of newly diagnosed rheumatic heart disease in urban African adults: insights from the heart of Soweto study. *Eur Heart J*. 2010 Mar;31(6):719-27.
5. Rizvi SF, Khan MA, Kundi A, Marsh DR, Samad A, Pasha O. Status of rheumatic heart disease in rural Pakistan. *Heart*. 2004 Apr;90(4):394-9.
6. Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, Jouven X. Rheumatic heart disease. *Lancet*. 2012 Mar 10;379(9819):953-64.
7. Meira ZM, Goulart EM, Colosimo EA, Mota CC. Long term follow up of rheumatic fever and predictors of severe rheumatic valvar disease in brazilian children and adolescents. *Heart*. 2005 Aug;91(8):1019-22.
8. Writing Group Members, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics - 2016 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Jan 26;133(4):447-54.
9. Selzer A, Cohn KE. Natural history of mitral stenosis: a review. *Circulation*. 1972 Apr;45(4):878-90.
10. Vahanian A, Iung B, Pierard L, Dion R, Pepper J. Valvular heart disease. In: Camm AJ, Lüscher TF, Serruys PW, ed. *The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine*, 2nd Edition. Malden/Oxford/Victoria: Blackwell Publishing Ltd; 2009:625-670.
11. Guilherme L, Köhler K, Kalil J. Rheumatic heart disease: mediation by complex immune events. *Adv Clin Chem*. 2011;53:31-50.
12. Sampaio RO, Fae KC, Demarchi LMF, Pomerantzeff PMA, Aiello, VD, Spina GS, et al. Rheumatic heart disease: 15 years of clinical and immunological follow-up. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(6):1007-17.

13. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP 3rd, Guyton RA, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Jul;148(1):e1-e132.
14. Tarasoutchi F, Montera MW, Grinberg M, Piñeiro DJ, Sánchez CR, Bacelar AC, et al. [Brazilian Guidelines for Valve Disease - SBC 2011 / I Guideline Inter-American Valve Disease - 2011 SIAC]. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(5 Suppl 1):1-67.
15. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jul 1;43(W1):W566-70.
16. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2010 Jul;23(7):685-713; quiz 786-8.
17. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015 Jan;28(1):1-39.e14.
18. Kaplan EL. Recent epidemiology of group A streptococcal infections in North America and abroad: an overview. *Pediatrics*. 1996 Jun;97(6 Pt 2):945-8.
19. Xavier RMA, Nolasco M, Muller R et al. PREFERE: da informação à prevenção. *Editorial Laranjeiras*. 2004;1(4):61-63.
20. Spina GS. [Rheumatic disease: neglected but still present and deadly]. *Rev Med (São Paulo)*. 2008 abr.-jun.;87(2):128-41.
21. Kaplan MH, Svec KH. Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. III. Presence in human sera of streptococcal antibody cross-reactive with heart tissue. Association with streptococcal infection, rheumatic fever, and glomerulonephritis. *J Exp Med*. 1964 Apr 1;119: 651-66.
22. Guilherme L, Cunha-Neto E, Coelho V, Snitcowsky R, Pomerantzeff PM, Assis RV, et al. Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation*. 1995 Aug 1;92(3):415-20.
23. Guilherme L, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease. *J Clin Immunol*. 2010 Jan;30(1):17-23.

24. Carapetis JR, McDonald M, Wilson NJ. Acute rheumatic fever. *Lancet*. 2005 Jul 9-15;366(9480):155-68.
25. Toor D, Vohra H. Immune responsiveness during disease progression from acute rheumatic fever to chronic rheumatic heart disease. *Microbes Infect*. 2012 Oct;14(12):1111-7.
26. Ali SK, Eldaim IN, Osman SH, Bakhite SM. Clinical and echocardiographic features of children with rheumatic heart disease and their serum cytokine profile. *Pan Afr Med J*. 2012;13:36.
27. Ozgen H, Ucar B, Yildirim A, Colak O, Bal C, Kilic Z. Plasma adiponectin levels and relations with cytokines in children with acute rheumatic fever. *Cardiol Young*. 2015 Jun;25(5):879-92.
28. Wen Y, Zeng Z, Gui C, Li L, Li W. Changes in the expression of Th17 cell-associated cytokines in the development of rheumatic heart disease. *Cardiovasc Pathol*. 2015 Nov-Dec;24(6):382-7.
29. Bas HD, Baser K, Yavuz E, Bolayir HA, Yaman B, Unlu S, et al. A shift in the balance of regulatory T and T helper 17 cells in rheumatic heart disease. *J Investig Med*. 2014 Jan;62(1):78-83.
30. Magalhães LM, Villani FN, Nunes MC, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis*. 2013 Feb 15;207(4):661-5.
31. Guilherme L, Cury P, Demarchi LMF, Coelho V, Abel L, Lopez AP, et al. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *Am J Pathol*. 2004 Nov;165(5):1583-91.
32. Azevedo PM, Pereira RR, Guilherme L. Understanding rheumatic fever. *Rheumatol Int*. 2012 May;32(5):1113-20.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo imune envolvido na cardiopatia reumática é complexo, dependente da estimulação e regulação de mais de uma via de ativação. A definição do papel das citocinas neste contexto é um desafio. O presente estudo mostrou como resultado uma associação entre a produção de citocinas inflamatórias e o desenvolvimento de uma doença com perfil de gravidade maior. Esses achados fornecem subsídio para pesquisas adicionais. A nossa perspectiva é de realizar, adicionalmente, a identificação das fontes celulares produtoras destas citocinas, assim como estudar a ocorrência de polimorfismos nos genes codificadores das citocinas, para identificar fatores genéticos de susceptibilidade às formas graves da doença reumática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO expert consultation on rheumatic fever and rheumatic heart disease. World Health Organization. Geneva, 2001 Oct 29 - Nov 1. Geneva: WHO; 2004.
2. Kaplan EL. Recent epidemiology of group A streptococcal infections in North America and abroad: an overview. *Pediatrics*. 1996 Jun;97(6 Pt 2):945-8.
3. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK et al. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*. 2005 Nov;5(11):685-94.
4. Muller RE. Estudo longitudinal de pacientes portadores de cardiopatia reumática no Rio de Janeiro [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/FIOCRUZ; 2008.
5. Xavier RMA, Nolasco M, Muller R et al. PREFERE: da informação à prevenção. *Editorial Laranjeiras*. 2004;1(4):61-63.
6. Meira ZM, Goulart EM, Colosimo EA, Mota CC. Long term follow up of rheumatic fever and predictors of severe rheumatic valvar disease in brazilian children and adolescents. *Heart*. 2005 Aug;91(8):1019-22.
7. Tarasoutchi F, Montera MW, Grinberg M, Piñeiro DJ, Sánchez CR, Bacelar AC, et al. [Brazilian Guidelines for Valve Disease - SBC 2011 / I Guideline Inter-American Valve Disease - 2011 SIAC]. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(5 Suppl 1):1-67.
8. Sociedade Brasileira de Cardiologia. [Brazilian guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of rheumatic fever]. *Arq Bras Cardiol*. 2009 Sep;93(3 Suppl 4):3-18.
9. Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, Jouven X. Rheumatic heart disease. *Lancet*. 2012 Mar 10;379(9819):953-64.
10. Spina GS. [Rheumatic disease: neglected but still present and deadly]. *Rev Med (São Paulo)*. 2008 abr.-jun.;87(2):128-41.
11. Kaplan MH, Svec KH. Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. III. Presence in human sera of streptococcal antibody cross-reactive with heart tissue. Association with streptococcal infection, rheumatic fever, and glomerulonephritis. *J Exp Med*. 1964 Apr 1;119: 651-66.
12. Willians RC Jr. Host factors in rheumatic fever and heart disease. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1982 Aug;17(8):125-9, 135-8.

13. Kemeny E, Grieve T, Marcus R, Sareli P, Zabriskie JB. Identification of mononuclear cells and T cell subsets in rheumatic valvulitis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989 Aug;52(2):225-37.
14. Raizada V, Williams RC Jr, Chopra P, Gopinath N, Prakash K, Sharma KB, et al. Tissue distribution of lymphocytes in rheumatic heart valves as defined by monoclonal anti-T cell antibodies. *Am J Med*. 1983 Jan;74(1):90-6.
15. Bryant PA, Robins-Browne R, Carapetis JR, Curtis N. Some of the people, some of the time: susceptibility to acute rheumatic fever. *Circulation*. 2009 Feb 10;119(5):742-53.
16. Engel ME, Stander R, Vogel J, Adeyemo AA, Mayosi BM. Genetic susceptibility to acute rheumatic fever: a systematic review and meta-analysis of twin studies. *PLoS One*. 2011;6(9):e25326.
17. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schrieffer A, Machado PR, Lessa H, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):7853-9.
18. Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis*. 2009 Feb 1;199(3):451-4.
19. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP 3rd, Guyton RA, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Jul;148(1):e1-e132.
20. Sampaio RO, Fae KC, Demarchi LMF, Pomerantzeff PMA, Aiello, VD, Spina GS, et al. Rheumatic heart disease: 15 years of clinical and immunological follow-up. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(6):1007-17.
21. Carapetis JR, McDonald M, Wilson NJ. Acute rheumatic fever. *Lancet*. 2005 Jul 9-15;366(9480):155-68.
22. Nascimento BR, Beaton AZ, Nunes MC, Diamantino AC, Carmo GA, Oliveira KK, et al. Echocardiographic prevalence of rheumatic heart disease in Brazilian schoolchildren: Data from the PROVAR study. *Int J Cardiol*. 2016 Sep 15;219:439-45.
23. Rizvi SF, Khan MA, Kundi A, et al. Status of rheumatic heart disease in rural Pakistan. *Heart*. 2004 Apr;90(4):394-9.
24. Guilherme L, Cunha-Neto E, Coelho V, Snitcowsky R, Pomerantzeff PM, Assis RV, et al. Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation*. 1995 Aug 1;92(3):415-20.

25. Rehman S, Akhtar N, Saba N, Munir S, Ahmed W, Mohyuddin A, et al. A study on the association of TNF- α (-308), IL-6(-174), IL-10(-1082) and IL-1Ra(VNTR) gene polymorphisms with rheumatic heart disease in Pakistani patients. *Cytokine*. 2013 Feb;61(2):527-31.
26. Col-Araz N, Pehlivan S, Baspinar O, Oguzkan-Balci S, Sever T, Balat A. Role of cytokine gene (IFN- γ , TNF- α , TGF- β 1, IL-6, and IL-10) polymorphisms in pathogenesis of acute rheumatic fever in Turkish children. *Eur J Pediatr*. 2012 Jul;171(7):1103-8.
27. A. Settin, H. Abdel-Hady, R. El-Baz, I. Saber. Gene polymorphisms of TNF- α - 308, IL-10 -1082 IL-6 -174, and IL-1Ra VNTR related to susceptibility and severity of rheumatic heart disease. *Pediatr Cardiol*, 2007, 28:363-371.
28. Carapetis JR, Currie BJ, Mathews JD. Cumulative incidence of rheumatic fever in an endemic region: a guide to the susceptibility of the population? *Epidemiol Infect*. 2000 Apr;124(2):239-44.
29. Carapetis JR1, Kilburn CJ, MacDonald KT, Walker AR, Currie BJ. Ten-year follow up of a cohort with rheumatic heart disease (RHD). *Aust N Z J Med*. 1997 Dec;27(6):691-7.
30. Seckeler MD, Hoke TR. The worldwide epidemiology of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Clin Epidemiol*. 2011 Feb 22;3:67-84.
31. Otto CM, Bonow RO. Doença valvar cardíaca. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E, editors. *Braunwald tratado de doenças cardiovasculares*. São Paulo: Elsevier; 2010:1713-33.
32. Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation An update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J*. 2012 Nov;33(21):2719-47.
33. Toor D, Vohra H. Immune responsiveness during disease progression from acute rheumatic fever to chronic rheumatic heart disease. *Microbes Infect*. 2012 Oct;14(12):1111-7.
34. Leão SC, Lima MR, Nascimento HM, Octacilio-Silva S, Rodrigues TM. IL-10 and ET-1 as biomarkers of rheumatic valve disease. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2014 Jan-Mar;29(1):25-30.
35. Abdallah AM, Alnuzha A, Al-Mazroea AH, Eldardear AE1, AlSamman AY1, Almohammadi Y3, et al. IL10 promoter polymorphisms are associated with rheumatic heart disease in Saudi Arabian patients. *Pediatr Cardiol*. 2016 Jan;37(1):99-105.
36. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Citocinas. In: Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, editors. *Imunologia de Kuby*. Porto Alegre: Artmed, 2008: 331-54.

37. Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Propriedades Gerais das Respostas Imunes. In: Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011:1-14.
38. Kelso A. Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol*. 1998 Aug;76(4):300-17.
39. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37 Suppl 1:S34-45.
40. Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Ativação dos linfócitos T. In: Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011:203-23.
41. Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade inata. In: Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011:55-88.
42. Saenz SA, Noti M, Artis D. Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses. *Trends Immunol*. 2010 Nov;31(11):407-13.
43. Henson PM. Dampening inflammation. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1179-81.
44. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Imunidade inata. In: Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, editors. *Imunologia de Kuby*. Porto Alegre: Artmed, 2008:76-97.
45. Walczak H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev*. 2011 Nov;244(1):9-28.
46. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*. 2001;19:163-96.
47. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets: an updated view. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:165974.
48. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Ativação e migração de leucócitos. In: Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, editors. *Imunologia de Kuby*. Porto Alegre: Artmed, 2008: 367-77.
49. Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol*. 2012 Nov;33(11):571-7.
50. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012;52:199-219.
51. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175(6):3463-8.

52. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:165-90.
53. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71-109.
54. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008 Dec;226:205-18.
55. Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol.* 2013 May 31;4:129.
56. Guilherme L, Köhler K, Kalil J. Rheumatic heart disease: mediation by complex immune events. *Adv Clin Chem.* 2011;53:31-50.
57. Guilherme L, Faé KC, Oshiro SE, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Kalil J. T cell response in rheumatic fever: crossreactivity between streptococcal M protein peptides and heart tissue proteins. *Curr Protein Pept Sci.* 2007 Feb;8(1):39-44.
58. Ali SK, Eldaim IN, Osman SH, Bakhite SM. Clinical and echocardiographic features of children with rheumatic heart disease and their serum cytokine profile. *Pan Afr Med J.* 2012; 13:36. Epub 2012 Oct 19.
59. Guilherme L, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease. *J Clin Immunol.* 2010 Jan;30(1):17-23.
60. Dutra WO, Moreira PR, Souza PE, Gollob KJ, Gomez RS. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: lessons learned from oral diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Jun;20(3):223-32.
61. Wen Y, Zeng Z, Gui C, Li L, Li W. Changes in the expression of Th17 cell-associated cytokines in the development of rheumatic heart disease. *Cardiovasc Pathol.* 2015 Nov-Dec;24(6):382-7.
62. Bas HD, Baser K, Yavuz E, Bolayir HA, Yaman B, Unlu S, et al. A shift in the balance of regulatory T and T helper 17 cells in rheumatic heart disease. *J Investig Med.* 2014 Jan;62(1):78-83.
63. Ozgen H, Ucar B, Yildirim A, Colak O, Bal C, Kilic Z. Plasma adiponectin levels and relations with cytokines in children with acute rheumatic fever. *Cardiol Young.* 2015 Jun;25(5):879-92.
64. Kütükçüler N, Karaca NE, Sözeri BY, Koturoğlu G, Kurugöl Z, Ozyürek RA, et al. Human soluble tumor necrosis factor receptor I (sTNF-RI) and interleukin-I receptor antagonist (IL-I Ra) in different stages of acute rheumatic fever. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2008 Apr;8(2):139-42.

65. Faé KC, Palacios SA, Nogueira LG, Oshiro SE, Demarchi LM, Bilate AM, et al. CXCL9/Mig mediates T cells recruitment to valvular tissue lesions of chronic rheumatic heart disease patients. *Inflammation*. 2013 Aug;36(4):800-11.
66. Guilherme L, Alba MP, Ferreira FM, Oshiro SE, Higa F, Patarroyo ME, et al. Anti-group A streptococcal vaccine epitope: structure, stability, and its ability to interact with HLA class II molecules. *J Biol Chem*. 2011 Mar 4; 286(9):6989-98.
67. Guilherme L, Cury P, Demarchi LMF, Coelho V, Abel L, Lopez AP, et al. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *Am J Pathol*. 2004 Nov;165(5):1583-91.
68. Guilherme L, Ramasawmy R, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: genetics and pathogenesis. *Scand J Immunol*. 2007 Aug-Sep;66(2-3):199-207.
69. Azevedo PM, Pereira RR, Guilherme L. Understanding rheumatic fever. *Rheumatol Int*. 2012 May;32(5):1113-20.
70. He VY, Condon JR, Ralph AP, Zhao Y, Roberts K, de Dassel JL, et al. Long-term outcomes from acute rheumatic fever and rheumatic heart disease: a data-linkage and survival analysis approach. *Circulation*. 2016 Jul 19;134(3):222-32.
71. Zheng RL, Zhang H, Jiang WL. Tumor necrosis factor-alpha 308G>A polymorphism and risk of rheumatic heart disease: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2014 Apr 22;4:4731.
72. Gewitz MH, Baltimore RS, Tani LY, Sable CA, Shulman ST, Carapetis J, et al. Revision of the Jones Criteria for the diagnosis of acute rheumatic fever in the era of Doppler echocardiography: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2015 May 19;131(20):1806-18.
73. Pato MF, Gelape CL, Cassiano TJM, Carvalho A, Cintra PR, Passaglia LG, et al. Determinants of prolonged length of hospital stay after cardiac surgery: impact of rheumatic heart disease. *Medical Express*. 2015 Jun;2(3):M150304.
74. Narin F, Narin N, Pasaoğlu H, Halici C, Aslan D. Nitric oxide metabolites in acute rheumatic fever. *Tohoku J Exp Med*. 2003 Mar;199(3):135-9.
75. Narin N, Kütükçüler N, Ozyürek R, Bakiler AR, Parlar A, Arcasoy M. Lymphocyte subsets and plasma IL-1 alpha, IL-2, and TNF-alpha concentrations in acute rheumatic fever and chronic rheumatic heart disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995 Nov;77(2):172-6.
76. Morris K, Mohan C, Wahi PL, Anand IS, Ganguly NK. Enhancement of IL-1, IL-2 production and IL-2 receptor generation in patients with acute rheumatic fever and active rheumatic heart disease; a prospective study. *Clin Exp Immunol*. 1993 Mar;91(3):429-36.

77. Zedan MM, el-Shennawy FA, Abou-Bakr HM, al-Basousy AM. Interleukin-2 in relation to T cell subpopulations in rheumatic heart disease. *Arch Dis Child*. 1992 Nov;67(11):1373-5.
78. Bhatnagar A, Grover A, Ganguly NK. Superantigen-induced T cell responses in acute rheumatic fever and chronic rheumatic heart disease patients. *Clin Exp Immunol*. 1999 Apr;116(1):100-6.
79. Miller LC, Gray ED, Mansour M, Abdin ZH, Kamel R, Zaher S, Regelman WE. Cytokines and immunoglobulin in rheumatic heart disease: production by blood and tonsillar mononuclear cells. *J Rheumatol*. 1989 Nov;16(11):1436-42.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participar de uma Pesquisa Clínica

TÍTULO:

Avaliação do perfil inflamatório dos pacientes com doença reumática da valva mitral

INTRODUÇÃO:

Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o procedimento proposto. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconforto e precauções do estudo.

OBJETIVO:

O objetivo desse estudo é analisar o perfil inflamatório dos pacientes com cardiopatia reumática, correlacionando-se com parâmetros clínicos e ecocardiográficos de gravidade da doença.

RESUMO:

A doença reumática é uma complicação decorrente de amigdalite causada por uma bactéria denominada estreptococo. Apesar do mecanismo não estar bem esclarecido, os pacientes que apresentam a infecção de garganta pelo estreptococo podem ter uma resposta inflamatória intensa e causar lesão nas valvas do coração. Com o desenvolvimento da disfunção da valva, começam os sintomas de falta de ar, cansaço exagerado, palpitações, além de edema nos membros inferiores e outras manifestações menos frequentes. Quando esta lesão é importante, está indicada a cirurgia para retirada da valva e colocação de uma valva substituta (prótese valvar).

A pesquisa visa analisar de todos os pacientes a valva doente através do ecodopplercardiograma e o sangue periférico com os marcadores inflamatórios. Nos pacientes que forem submetidos à cirurgia de troca valvar será analisado um fragmento da valva retirada.

PROCEDIMENTO:

A sua participação neste estudo requer que você concorde e autorize que façamos uma entrevista com perguntas clínicas e um exame físico com enfoque no aparelho cardiovascular. Além disso, executaremos um ecodopplercardiograma e coleta de sangue periférico. Finalmente, se for o caso, fragmentos de sua valva serão analisados. A pesquisa não determinará nenhuma interferência no seu tratamento e nenhum custo.

DESCONFORTO:

A coleta de sangue pode ocasionar desconforto mínimo no momento da punção e pode ocasionalmente gerar pequeno hematoma no local. As cirurgias, quando indicadas, serão realizadas no bloco cirúrgico do Hospital das Clínicas da UFMG e as valvas serão encaminhadas ao Setor de Biópsias do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG, conforme rotina estabelecida pelo Serviço de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular. Você não terá nenhum desconforto adicional pela pesquisa.

BENEFÍCIOS:

A sua participação poderá contribuir para uma melhor compreensão da sua doença e possivelmente para uma melhora no seu tratamento, podendo você também beneficiar-se disto no futuro. Além disto, vale dizer que todos os procedimentos serão realizados por profissionais treinados e sem custo para você.

CONFIDENCIALIDADE:

Os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, o orientador da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa UFMG, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza a pesquisadora a fornecer seus registros para o pesquisador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

DESLIGAMENTO:

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu tratamento.

CONTATO COM PESQUISADOR:

Pode ser feito pelo telefone 3409-9438 (Setor de Cardiologia do Hospital das Clínicas da UFMG) com o pesquisador principal. Também poderá ser feito o contato com o Comitê de Ética e Pesquisa Humana, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005, CEP: 31270-901 - BH-MG, Telefax (31) 3409-4592, e-mail: coep@prpq.ufmg.br.

CONSENTIMENTO:

Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para que eu próprio participe do estudo, até que eu decida o contrário.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____

Assinatura do paciente ou responsável: _____

Assinatura do pesquisador: _____

ANEXO B - Protocolo de Pesquisa

IDENTIFICAÇÃO:

Nome:						
Data de inclusão no estudo:				Número no estudo:		
Endereço:						
Cidade:				Outros telefones:		
Telefone fixo:				Telefone cel:		
Nascimento:		Idade:		1- Feminino ()		2- Masculino ()
Raça:	1- Branco ()	2- Negro ()	3- Pardo ()	3- Asiático ()	4- Outras ()	
Peso (Kg):		Altura (cm):		Superfície corporal (m²):		

HISTÓRIA CLÍNICA:

CF NYHA:	1- Classe I ()	2- Classe II ()	3- Classe III ()	4- Classe IV ()			
Hemoptise:	1- Sim ()		2- Não ()				
Precordialgia:	1- Sim ()		2- Não ()				
Disfunção VD:	1- Sim ()		2- Não ()				
Eventos embólicos:	1- Não ()	2- Pulmon. ()	3- AIT ()	4- AVC ()	5- Sistêmica ()	6- Outros ()	
Data do evento:	Recorrência:		1- Sim ()		2- Não ()		
Plastia percutânea prévia:	1- Não ()	2- Uma ()	3- Duas ou mais ()		Data último procedimento:		
Plastia aberta prévia:	1- Não ()	2- Uma ()	3- Duas ou mais ()		Data último procedimento:		
Co-morbidades:	1- Não ()	2- HAS ()	3- DM ()	4- DCC ()	5- Outras () Quais:		
Episódios prévios de FA paroxística:	1- Não ()		2- Sim ()				
Medicações atuais:	IECA:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Diuréticos:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Beta-bloqueadores:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Digitálicos:		1- Sim ()		2- Não ()		
	BRA:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Espironolactona:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Anticoagulantes:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Bloqueador canal de Ca:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Inibidor plaquetário:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Penicilina benzatina:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Corticóides:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Anti-inflamatórios:		1- Sim ()		2- Não ()		
	Outros:		1- Sim ()		2- Não () Quais:		
Uso de penicilina benzatina:	1- Sim ()		2- Não ()		Por quanto tempo:		
					Qual intervalo:		
Amigdalites de repetição:	1- Sim ()		2- Não ()				
F. reumática em irmãos:	1- Sim ()		2- Não ()				
Data do diagnóstico da doença reumática:	Idade:		Data:				
Data do diagnóstico do acometimento cardíaco:	Idade:		Data:				
Manifestações da febre reumática:	1- Nenhuma ()	1- Cardite ()	2- Artrite ()	3- Coreia ()	4- Eritema marginatum ()	5- Nódulos subcutâneos ()	6- Duas ou mais ()
Comentários:	Quais:						

PRESENÇA DE ALGUM CRITÉRIO DE EXCLUSÃO:

CRITÉRIO	SIM	NÃO	
Lesão valvar secundária à outras patologias	()	()	
Doenças sistêmicas ou autoimunes	()	()	
Doenças infecciosas associadas (ex: AIDS, Chagas)	()	()	
Gravidez - DUM:	()	()	

EXAME FÍSICO CARDIOVASCULAR:

FC (bpm):		Ritmo cardíaco regular: 1- Sim () 2- Não ()	
PAS (mmHg):		PAD (mmHg):	
Ausculta respiratória:	1- MVF ()	2- Crepitações 1/3 inferior ()	3- Crepitações 2/3 () 4- Crepitações até ápice ()
Lesão predominante:	1- EM ()	2- IM ()	3- DLM bal. ()
	4- EAo ()	5- IAo ()	6- DLAo bal. ()

ELETROCARDIOGRAMA:

Data:			
Ritmo:	1- Sinusal ()	2- Fibrilação atrial ()	3- Outros ()

RAIO-X DE TÓRAX:

Data:			
ICT:	1- Normal ()	2- Aumentado ()	3- Ignorado ()
Congestão:	1- Sim ()	2- Não ()	3- Ignorado ()

DADOS ECOCARDIOGRÁFICOS:

Diâmetro VD (mm)		AVM planimetria (cm²)	
AO (mm)		AVM PHT (cm²)	
AE (mm)		Mobilidade folhetos (1-4)	
Volume AE (ml)		Espessamento folhetos (1-4)	
Volume AE ind. (ml/m²)		Aparato subvalvar (1-4)	
dVSVE (mm)		Calcificação (1-4)	
DdVE (mm)		Gradiente máx. mitral (mmHg)	
DsVE (mm)		Gradiente méd. mitral (mmHg)	
SIV (mm)		TVI VM (cm)	
PP (mm)		AVA Bernoulli (cm²)	
FEVE (%)		Gradiente máx. aórtico (mmHg)	
FEVE Simpson (%)		Gradiente méd. aórtico (mmHg)	
AD área (cm²)		TVI VAo (cm)	
AD volume ind. (ml/m²)		TVI VSVE (cm)	
VD área frac. diást. (cm²)		Reg. aórtica PHT (ms)	
VD área frac. sist. (cm²)		Reg. tricúspide (m/s)	
VD Doppler Tec. e' (cm/s)		VCI repouso (mm)	
VD Doppler Tec. a' (cm/s)		VCI inspiração (mm)	
VD Doppler Tec. S (cm/s)		Variação: 1- < 50% () 2- > 50% ()	
TAPSE (mm)		PAD estimada (mmHg)	
Índice Tei: A: B:		Gradiente máx. tricúspide (mmHg)	
		Gradiente méd. tricúspide (mmHg)	
Função VD:	1- Normal ()	2- Leve ()	3- Moderada () 4- Grave ()
Acometimento reumático:	1- VM ()	2- VM e VAo ()	3- VM, VAo, VT () 4- VM e VT ()
Regurgitação mitral:	1- Não ()	2- Leve ()	3- Moderada () 4- Grave ()
Regurgitação tricúspide:	1- Não ()	2- Leve ()	3- Moderada () 4- Grave ()
Regurgitação tricúspide:	1- Reumática ()	2- Funcional ()	
Regurgitação aórtica:	1- Não ()	2- Leve ()	3- Moderada () 4- Grave ()
Lesão predominante:	1- EM ()	2- IM ()	3- DLM bal. () 4- EAo () 5- IAo () 6- DLAo bal. ()

ANEXO C - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE - 32715214.9.0000.5149

Interessado(a): Prof^a. Maria do Carmo Pereira Nunes
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina- UFMG

DECISÃO

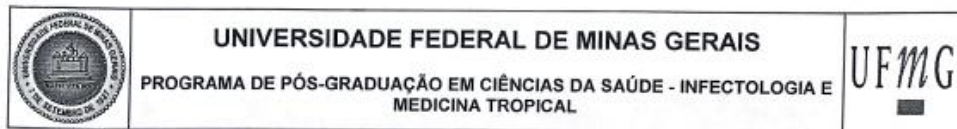
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de janeiro de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo anatomopatológico e imunológico da valva mitral acometida pela doença reumática**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O projeto será encaminhado, com o devido parecer, à CONEP, para avaliação final. O pesquisador deverá aguardar esta aprovação final para iniciar a pesquisa.

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


Prof^a. Dr^a. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO D - Aprovação pela Banca Examinadora



FOLHA DE APROVAÇÃO

"Avaliação do Perfil Inflamatório de Pacientes com Cardiopatia Reumática"

ADRIANA COSTA DIAMANTINO

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

Aprovada em 23 de fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Prof.ª Maria do Carmo Pereira Nunes - Orientador

UFMG

Prof.ª Walderez Ometas Dutra - Coorientador

UFMG

Prof. Roney Orsimar Sampaio
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Dra. Márcia de Melo Barbosa
SOCOR

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2017.