

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Julia Pereira Afonso dos Santos Tormin

Associação entre polimorfismos funcionais em genes codificadores de citocinas e sua expressão fenotípica com cardiopatia reumática clínica e latente.

Belo Horizonte

2020

Julia Pereira Afonso dos Santos Tormin

Associação entre polimorfismos funcionais em genes codificadores de citocinas e sua expressão fenotípica com cardiopatia reumática clínica e latente.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, com requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Walderez Ornelas Dutra
Co-orientador: Prof. Dr. Bruno Ramos Nascimento

**Linha de pesquisa: Cardiologia
Tropical**

Belo Horizonte – MG

Faculdade de Medicina – UFMG

2020

J94a Tormin, Julia Pereira Afonso dos Santos.
Associação entre polimorfismos funcionais em genes codificadores de citocinas e sua expressão fenotípica com cardiopatia reumática clínica e latente [recurso eletrônico]. / Julia Pereira Afonso dos Santos Tormin. - - Belo Horizonte: 2020.
68f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Walderez Ornelas Dutra.
Coorientador (a): Bruno Ramos Nascimento.
Área de concentração: Ciências da Saúde.
Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Cardiopatia reumática,. 2. Polimorfismo genético. 3. Citocinas. 4. Febre reumática. 5. Predisposição genética para doença. 6. Dissertação Acadêmica. I. Dutra, Walderez Ornelas. II. Nascimento, Bruno Ramos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WG 240

Bibliotecário responsável: Daniele Labanian de Souza CRB-6/3326



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E
MEDICINA TROPICAL

UFMG

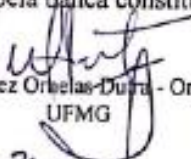
FOLHA DE APROVAÇÃO


"Associação entre polimorfismos funcionais em genes codificadores de citocinas e sua expressão fenotípica com cardiopatia reumática clínica e latente"

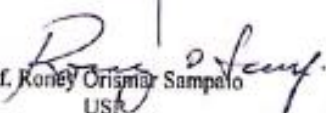
JÚLIA PEREIRA AFONSO DOS SANTOS


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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Walderez Ornelas-Dutra - Orientadora
UFMG


Prof. Bruno Ramos Nascimento - Coorientador
UFMG


Prof. Ronney Orismar Sampaio
USF


Prof. Kenneth John Gollob
AC Carhargo Câncer Center

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA

Profª. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE REITOR

Prof. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Fábio Alves da Silva Júnior

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Humberto José Alves

VICE-DIRETORA: Profª. Alamanda Kfoury Pereira

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

COORDENADOR: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

SUBCOORDENADORA: Prof. Eli Iola Gurgel Andrade

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE:

INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho (Coordenador)

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro (Subcoordenador)

Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Vandack Alencar Nobre Junior

Denise Utsch Gonçalves

Unai Tupinambás

Grasiele de Sousa Vieira Tavares (Representante discente)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Walderez pela grande disponibilidade e paciência, ao meu co-orientador Prof. Bruno pela presteza e resolutividade. À minha querida professora Carminha pelo suporte e ajuda imensuráveis, sem as quais esse projeto não seria possível. Ao meu marido, pais e irmã pelos incentivos. Sou muito pequena diante das pessoas que tenho ao meu lado.

RESUMO

Antecedentes: A resposta inflamatória associada à cardiopatia reumática crônica (CRC) é influenciada por polimorfismos gênicos e por diversas citocinas circulantes. No entanto, ainda não existem fatores imunológicos ou genéticos que possam ser usados como preditores do desenvolvimento ou da progressão das valvopatias. Utilizando análises de “*machine-learning*”, foi avaliada a presença de marcadores associados à CRC, comparando-se pacientes com a forma subclínica ou latente da doença com a CRC manifestada clinicamente, caracterizada por disfunção valvar. **Métodos:** Um total de 212 pacientes foram incluídos no estudo, 100 com CRC clínica, 77 com CR latente (CRL) (17 “definitivos” e 60 “*borderline*” segundo os critérios da World Heart Federation de 2012) e 35 controles saudáveis, sem nenhuma cardiopatia. A análise da presença de polimorfismos foi realizada para os seguintes genes: *IL2* (*rs2069762 G/T*), *IL4* (*rs2243250 C/T*), *IL6* (*rs1800795 C/G*), *IL10* (*rs1800896 T/C*), *IL17A* (*rs2275913 A/G*), *TNF-alfa* (*rs361525 A/G*) e *IL23* (*rs11209026 A/G*). O nível sérico de 27 fatores solúveis foi avaliado pelo ensaio BD-Bioplex. **Resultados:** A mediana de idade foi de 15 anos (IQR 13-16) no grupo com CRL e de 43 anos no grupo com CRC clínica (IQR 33-51). Indivíduos saudáveis eram ligeiramente mais jovens com mediana de idade de 13 anos (IQR 9-15). Níveis solúveis de todas as citocinas estiveram aumentados no plasma de pacientes com CR latente e clínica em relação aos controles. IL-4, IL-8, IL-1RA, IL-9, CCL5 e PDGF permaneceram no modelo multivariado final como fatores preditores de CRC clínica. IL-4, IL-8 e IL-1RA foram as citocinas com maior poder de predição da CRC clínica. Os polimorfismos em *IL2* e *IL4* se associaram à forma clínica da CRC. Nas análises não-guiadas, genótipos em *IL6* (GG+CG), *IL10* (CT+TT), *IL2* (CA+AA) e *IL4* (CC) foram associados a CRC clínica. **Conclusão:** Apesar dos níveis mais altos de todas as citocinas nos indivíduos com CRC clínica, IL-4, IL-8 e IL-1RA foram os melhores preditores de doença clínica, dissociando CRC clínica e CRL. Polimorfismos nos genes para *IL2*, *IL4*, *IL6* e *IL10*, analisados em conjunto, foram associados à CRC clínica. Dentre os fatores analisados, polimorfismo funcional e expressão da citocina IL-4 parecem ter um papel importante que diferencia pacientes com CRC clínica daqueles com CRL e indivíduos normais.

Palavras-chave: cardiopatia reumática; citocina; polimorfismo; interleucina.

ABSTRACT

Background: The inflammatory response associated with rheumatic heart disease (RHD) is influenced by gene polymorphisms, as well as by the levels of inflammatory cytokines. However, the identification of immunologic and genetic factors that allow predicting the establishment and progression of valve disease is still lacking. Using an unbiased machine-learning analysis, we searched for inflammatory predictive factors amongst patients with latent RHD and clinical RHD, the later distinguished by the presence of valve dysfunction according with current guidelines. **Methods:** A total of 212 individuals were included, 77 with latent RHD (17 definite, 60 borderline according to World Heart Federation criteria), 100 with clinical RHD followed in an outpatient basis, and 35 with no heart disease. Gene polymorphism analyses were performed using RT-PCR for the following genes: *IL2* (*rs2069762 G/T*), *IL4* (*rs2243250 C/T*), *IL6* (*rs1800795 C/G*), *IL10* (*rs1800896 T/C*), *IL17A* (*rs2275913 A/G*), *TNF-alfa* (*rs361525 A/G*) and *IL23* (*rs11209026 A/G*). Circulating cytokine levels of 27 soluble factors were evaluated using BD-Bioplex assay. **Results:** Median age was 15 years (IQR 13-16) in the latent RHD group and 43 years in the clinical RHD group (IQR 33-51). Healthy individuals were slightly younger with a mean age of 13 years (IQR 9-15). Serum levels of all cytokines were higher in clinical RHD and in latent RHD patients than in normal individuals. IL-4, IL-8, IL-1RA, IL-9, CCL5 and PDGF emerged in the final multivariate model as predictive factors for clinical RHD when compared with latent RHD individuals. IL-4, IL-8 and IL1RA had the greater power to predict clinical RHD in this scenario. In the univariate analysis, polymorphisms in *IL2* and *IL4* were associated to clinical RHD and in the logistic analysis via lasso, genotypes in *IL6* (GG+CG), *IL10* (CT+TT), *IL2* (CA+AA) and *IL4* (CC) were also associated with RHD. **Conclusion:** Despite higher serum levels of all cytokines in clinical RHD patients, IL-4, IL-8 and IL-1RA were the best predictors of clinical disease presence. An association of polymorphisms in the *IL2*, *IL4*, *IL6* and *IL10* genes were related to clinical RHD. Amongst the variables analyzed, gene polymorphism and phenotypic expression of IL-4 appear to have an important role in predicting clinical RHD in relation to latent RHD and normal individuals.

Key-Words: rheumatic heart disease; cytokine; single nucleotide polymorphism (SNPs); interleukin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países em que a cardiopatia reumática é endêmica _____	18
Figura 2 - Polimorfismos gênicos associados à cardiopatia reumática e proteínas codificadas por eles _____	22
Figura 3 - Ecocardiograma de rastreamento: avaliação morfológica da valva mitral_	29
Figura 4 - Ecocardiograma de rastreamento com o uso do Doppler colorido para detectar a regurgitação mitral _____	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Conceitos principais _____	17
Quadro 2 - Critérios de Jones Revisados (2015) _____	26
Quadro 3 - Alterações ecocardiográficas da cardiopatia reumática nas valvas mitral e aórtica _____	28
Quadro 4 – Profilaxia secundária para a febre reumática _____	34
Quadro 5 – Duração da profilaxia secundária para febre reumática _____	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	American Heart Association
CRC	Cardiopatía Reumática Crônica
CRL	Cardiopatía Reumática Latente
CRS	Cardiopatía Reumática Subclínica
ECG	Eletrocardiograma
FRA	Febre Reumática Aguda
iPR	Intervalo PR
PCR	Polymerase chain reaction
PROVAR	Programa de Rastreamento de Valvulopatía Reumática
VAo	Valva Aórtica
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
VM	Valva Mitral
WHF	World Heart Federation

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Definições	17
2.2 Epidemiologia	18
2.3 Fisiopatologia	19
2.3.1 Imunologia e Genética na Cardiopatia Reumática Crônica	21
2.4 Diagnóstico	25
2.4.1 Diagnóstico da Febre Reumática Aguda	25
2.4.2 Diagnóstico da cardiopatia reumática latente e subclínica	27
2.4.3 Diagnóstico da cardiopatia reumática crônica clínica	31
2.5 Tratamento e prevenção da cardiopatia reumática	32
2.5.1 Profilaxia Primária	32
2.5.2 Profilaxia Secundária	33
2.5.3 Tratamento	34
3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	36
4. OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo Geral	37
4.2 Objetivos Específicos	37
5. METODOLOGIA	38
5.1 Desenho do Estudo	38
5.2 Seleção da amostra	38
5.2.1 Critérios de Inclusão	38
5.2.2 Critérios de Exclusão	39
5.2.3 Cálculo Amostral	39
5.3 Detalhamento do Estudo	39
6. RESULTADOS	42
6.1 Artigo original:	42

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS _____ 62

REFERÊNCIAS _____ 63

1. INTRODUÇÃO

A cardiopatia reumática crônica (CRC) é o resultado de lesões valvares causadas por uma resposta imunológica anormal à infecção pelo estreptococo beta hemolítico do grupo A, mais comumente a faringite. A febre reumática aguda (FRA) é o evento que precede a CRC, mas nem sempre é diagnosticada clinicamente. A fisiopatologia exata pela qual as lesões valvares ocorrem ainda não é completamente conhecida apesar dos avanços recentes nas pesquisas sobre o assunto (2-4). Sabe-se, no entanto, que ela envolve uma tríade, caracterizada pela infecção pelo estreptococo do grupo A, hospedeiro geneticamente susceptível e sua resposta imune anormal (3).

A prevalência da CRC, em 2015, foi estimada em 33,2 milhões de casos e a doença foi apontada como causa de 319.000 mortes no mundo. A redução na mortalidade – marcadamente em países desenvolvidos – em relação a dados de 1990 veio acompanhada de aumento na morbidade por insuficiência cardíaca (1). No Brasil, em 2007, foram gastos R\$ 157.578.000,00 pelo Sistema Único de Saúde em internações decorrentes de febre reumática ou CRC, para procedimentos clínicos ou cirúrgicos. Em relação às cirurgias cardíacas realizadas no período, 31% abordaram pacientes com sequelas de febre reumática (5).

Acredita-se que, em indivíduos susceptíveis, a semelhança estrutural entre antígenos de superfície do estreptococo (especialmente regiões do carboidrato N-acetyl-glucosamina e da proteína M) e proteínas dos tecidos cardíacos leve à reação cruzada de células T CD4+ e de linfócitos B. Estas células, ativadas por reação cruzada, assim como os anticorpos produzidos pelos linfócitos B, se ligariam em estruturas como a miosina no miocárdio e a laminina presente na membrana basal e endotélio das válvulas cardíacas, o que seria patológico e levaria à inflamação tecidual gerando estenose e/ou regurgitação valvar. Tal processo é conhecido como mimetismo molecular e é a teoria dominante para explicar a fisiopatologia da CRC.

No entanto, algumas observações sobre o curso da doença suscitam dúvidas em relação ao mimetismo molecular como mecanismo fisiopatológico central. Entre elas estão a presença de autoanticorpos em indivíduos normais, que não apresentam acometimento valvar, e o fato de que as lesões histológicas típicas são granulomas

(nódulos de Aschoff), que são um tipo de reação inflamatória focal e crônica provocada por substâncias difíceis de serem degradadas (corpos estranhos, micobactérias, etc) (6). Esses aspectos, associados à efetividade do tratamento da faringite estreptocócica e da profilaxia secundária (tratamento da CRC) com penicilina, apontam para a relação da bactéria em si ou de partes de sua estrutura com a doença (6).

O aumento da frequência da doença em famílias com casos prévios e o padrão semelhante de doença entre irmãos e gêmeos monozigóticos apontam para influência genética na susceptibilidade e na manifestação da valvopatia reumática, apesar dessa relação não seguir o padrão mendeliano clássico (2). Neste sentido, estudos em polimorfismos genéticos têm sido realizados na tentativa de identificar fatores de susceptibilidade às manifestações graves da doença reumática. Polimorfismos gênicos são alterações genéticas, seja em números de cópias, seja em sequências de nucleotídeos, presentes em pelo menos 1% na população. Como a resposta imune está diretamente associada à patogênese da febre reumática, estudos de polimorfismos em genes que codificam para fatores imunológicos são de grande importância, tanto para a identificação de indivíduos suscetíveis à apresentação inicial quanto para a predição de progressão da doença naqueles com forma subclínica ou latente.

Elucidar essas questões fisiopatológicas é um passo importante para a redução do impacto da doença em países subdesenvolvidos por meio do desenvolvimento de políticas de rastreamento para detecção precoce e de intervenções que visem evitar progressão para disfunção valvar. Diagnóstico e tratamento precoces e eficientes são cruciais para que se atinja o objetivo global em relação à FRA e à CRC, que seria a sua erradicação (7).

Se o impacto da CRC já é expressivo nos países subdesenvolvidos, essa pode ser apenas a ponta do iceberg. Estima-se que para cada paciente com doença clínica existem 3 a 10 com valvopatia latente ou subclínica, diagnosticada por ecocardiograma de acordo com os critérios definidos por consenso da World Heart Federation (WHF) publicado em 2012 (7, 8). Há nova evidência de que crianças detectadas com doença latente pelo ecocardiograma estão sob risco considerável de evolução clínica ruim, especialmente as com doença moderada a grave definida por critérios ecocardiográficos (9, 10). Com os novos estudos sobre a história natural da cardiopatia reumática

subclínica, o papel da penicilina na prevenção de sua progressão tem suscitado questionamentos e atualmente encontra-se em avaliação em um grande estudo clínico em Uganda, África (GOAL – GwokO Aduno pa Lutino)(11), o que só contribui para aumentar a necessidade de mais pesquisas que visem compreender os mecanismos genéticos e imunológicos subjacentes à instalação e progressão da doença (12, 13).

Nossa hipótese de trabalho é que a gravidade da CRC está associada a polimorfismos em genes que codificam para citocinas, que, por sua vez, interferem com a expressão fenotípica dessas moléculas. Considerando-se todas essas questões e a possibilidade de analisarmos pacientes normais, pacientes subclínicos provenientes do projeto Programa de Rastreamento de Valvopatia Reumática (PROVAR) – o primeiro programa de rastreamento ecocardiográfico da CRC em larga escala na América Latina (14) – e pacientes com alterações clínicas já em acompanhamento ambulatorial, a análise do perfil imunológico e de susceptibilidade genética desses grupos é uma interessante oportunidade de pesquisa e de contribuição para a literatura mundial sobre o tema.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definições

Quadro 1 – Conceitos principais

Febre Reumática Aguda (FRA)	Doença pós-infecciosa causada por uma resposta imune exacerbada à infecção pelo estreptococo beta-hemolítico do grupo A, geralmente faringite aguda. Trata-se de um quadro sistêmico que pode acometer coração, articulações, pele, tecido subcutâneo e cérebro. O diagnóstico da FRA é baseado nos critérios revisados de Jones e a doença pode se repetir com novos surtos infecciosos.
Cardite Reumática	Inflamação aguda dos tecidos cardíacos, principalmente das valvas, que acomete de 50 -70% dos pacientes com FRA. A cardite reumática aguda pode evoluir com a lesão valvar crônica, que permanece após o episódio inflamatório agudo ter se resolvido.
Cardiopatia reumática crônica (CRC)	Lesão valvar cicatricial, progressiva, que persiste após o processo inflamatório agudo da cardite reumática, resultando em insuficiência e/ou estenose valvar. As valvas mais acometidas são a mitral e aórtica. As principais complicações da CRC incluem insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral isquêmico, endocardite infecciosa e arritmias como a fibrilação atrial.
Cardiopatia reumática latente (CRL)	Lesão valvar típica de envolvimento reumático sem história <i>clínica de FRA ou sintomas clínicos de cardiopatia reumática</i> . O diagnóstico pode ser feito através da ecocardiografia de rastreamento ou através da ausculta cardíaca com o achado de sopro patológico de valva mitral e/ou aórtica sugerindo a doença, que poderá ser confirmada pela ecocardiografia.
Cardiopatia reumática subclínica	Lesão valvar típica de envolvimento reumático sem história clínica de FRA ou sintomas clínicos de CRC. Apesar de ser bastante semelhante à CRL, neste caso o paciente também não apresenta achados no exame físico que possam sugerir a doença, sendo o seu diagnóstico feito <i>exclusivamente</i> pela ecocardiografia. Trata-se de um estágio incipiente da CRC.

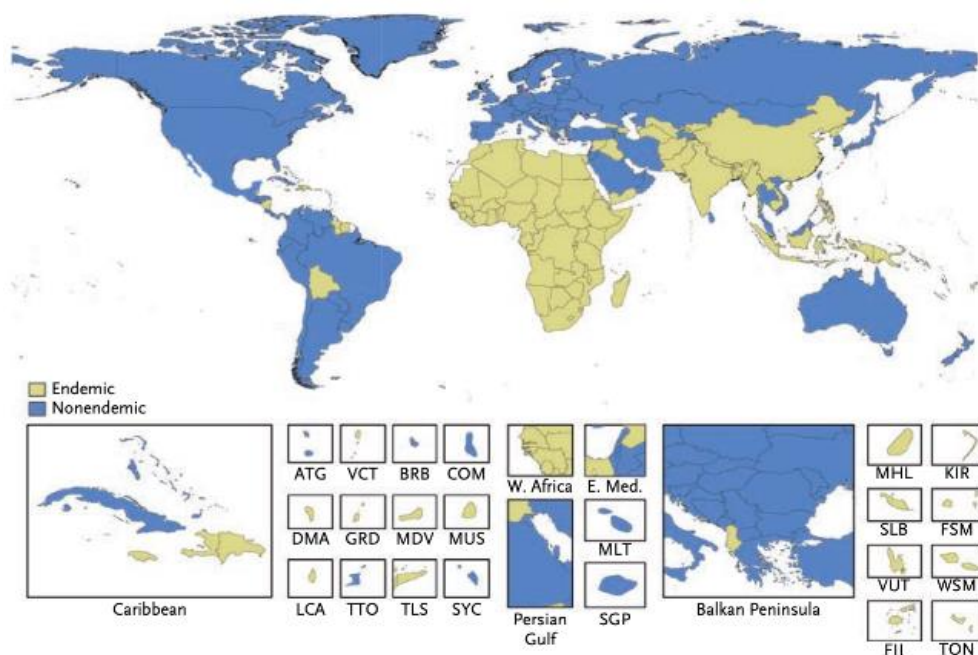
Referências: (7, 15, 16)

2.2 Epidemiologia

Em 2015, foram estimados cerca de 33 milhões de casos de CRC no mundo, sendo mais de 99% deles em áreas endêmicas da doença. Entre essas áreas, aquelas com maior prevalência padronizada por idade foram Oceania, África subsaariana e Ásia (**Figura 1**), mas dados de outras regiões, como o Brasil, podem estar subestimados

No mesmo ano, 2015, ocorreram aproximadamente 319.400 mortes por CRC no mundo. Entre 1990 e 2015 a mortalidade pela doença foi reduzida em 8.1%, mas essa redução veio acompanhada de um aumento da morbidade causada especialmente por insuficiência cardíaca (IC), sendo que os casos estimados de IC grave praticamente dobraram nesse período. A quantidade de anos de vida perdidos por incapacidade, em 2015, foi de aproximadamente 10.513.200 devido principalmente às mortes prematuras (1). Condições socioeconômicas ruins como más condições de moradia, aglomeração de pessoas, e dificuldade de acesso aos serviços de saúde aumentam a exposição da população ao estreptococo e a disseminação do mesmo (15). No entanto, mesmo em áreas em que a infecção pelo estreptococo é endêmica, menos de 6% das pessoas desenvolvem febre reumática e as razões para tal ainda não são bem compreendidas. Mulheres apresentam mais CRC, apesar de a FRA ser igualmente prevalente nos sexos masculino e feminino (15).

Figura 1: Países em que a cardiopatia reumática é endêmica.



Os países foram considerados endêmicos quando apresentaram taxa de morte de mais de 0.15 por 100.000 pessoas entre crianças de 5 a 9 anos de idade. ATG: Antígua e Barbuda, BRB: Barbados, COM: Comores, DMA: Dominica, E. Med.: região do mediterrâneo oriental, FJI: Fiji, FSM: estados federados da Micronésia, GRD: Granada, KIR: Kiribati, LCA: Santa Lúcia, MDV: Maldivas, MHL: Ilhas Marshall, MLT: Malta, MUS: Maurício, SGP: Singapura, SLB: Ilhas Salomão, SYC: Seychelles, TLS: Timor-leste, TON: Tonga, TTO: Trinidad e Tobago, VCT: São Vicente e Granadinas, VUT: Vanuatu, W. África: África ocidental e WSM: Samoa. Referência: Watkins DA et. al. 2017.(1)

No Brasil, um estudo retrospectivo mostrou que a doença foi responsável por mais de 60% dos casos de cirurgia cardíaca para troca valvar em Salvador (17), e aproximadamente 54% dos casos cirúrgicos em estudo que avaliou 78.808 pacientes através do Sistema de Informação Hospitalar e Sistema de Informação sobre Mortalidade(18). Em 2013, houve 5.169 hospitalizações relacionadas à FRA e 8.841 relacionadas à CRC. Tudo isso representou um custo aproximado de 103 milhões de reais (19).

A cardiopatia reumática latente (CRL), por sua vez, tem sido uma doença mais conhecida e explorada apenas nos últimos anos após o advento e uso disseminado no ecocardiograma. Estudos epidemiológicos de rastreamento ecocardiográfico em crianças e adolescentes em vários países demonstraram que a prevalência da CRL é até 10 vezes maior do que a prevalência da doença clínica. A CRL, assim como a clínica, tem predileção pelo sexo feminino (20-23).

No Brasil, o grupo PROVAR estudou a CRL realizando rastreamento ecocardiográfico em escolares de Minas Gerais, com aquisição de imagem por não-médicos e interpretação a distância por especialistas no Brasil e nos EUA através de Telemedicina. O estudo mostrou prevalência de aproximadamente 4,2% para a CRL sendo que 0,5% foram classificados como CRL definitiva e 3,7% foram classificados como CRL *borderline*, de acordo com os critérios ecocardiográficos estabelecidos pela WHF. Como esperado, a prevalência da doença aumentou com a idade demonstrando mais uma vez o caráter progressivo da CRC (24). Atualmente ainda não se recomenda a utilização rotineira do rastreamento ecocardiográfico fora do ambiente de pesquisa, pois as implicações clínicas destes achados são ainda incertas, e existem dúvidas sobre as taxas de progressão para doença clinicamente manifesta. Neste sentido, busca-se a identificação de marcadores prognósticos para pacientes neste estágio da doença. Alguns achados ao ecocardiograma parecem ser capazes de prever a progressão ecocardiográfica a curto prazo(10), mas as variáveis associadas ao desenvolvimento de sequelas avançadas ainda carecem de investigação.

2.3 Fisiopatologia

A FRA ocorre por uma reação do sistema imunológico do indivíduo ao contato com estreptococo beta-hemolítico do grupo A, em geral, após uma amigdalite. O diagnóstico é baseado nos critérios de Jones modificados (Quadro 2), sendo necessária a presença dois

critérios maiores ou um critério maior e dois menores.

A fisiopatologia da FRA ainda não foi totalmente esclarecida apesar de avanços recentes (2, 25). Sabe-se, no entanto, que ela envolve 3 pilares: um hospedeiro geneticamente suscetível, mimetismo molecular e resposta imune anormal (26). Desde o século XIX, observa-se que uma pessoa com história familiar de febre reumática tem uma chance significativamente maior de desenvolver a doença do que a população geral (27).

Após o contato com o estreptococo, células apresentadoras de antígenos iniciam a resposta imune adaptativa com a ativação de células T e de células B incluindo a produção de anticorpos (IgG e IgM). A partir desse momento, de alguma forma, o sistema imunológico do hospedeiro passa a reconhecer proteínas do tecido conjuntivo do indivíduo como estranhas ativando a reação cruzada contra os tecidos. Isso é conhecido como a teoria do mimetismo molecular (28).

A reação cruzada autoimune leva à artrite migratória pela formação de imunocomplexos e à coreia de Sydenham pela ligação de anticorpos aos núcleos da base. O eritema marginado e nódulos subcutâneos ocorrem pela ligação de anticorpos à queratina. No coração, o mimetismo molecular envolve proteínas do estreptococo (proteína M e regiões do carboidrato N-acetyl-glucosamina) e proteínas cardíacas (miosina, tropomiosina, queratina, laminina e vimetina) gerando cardite reumática. A cardite ocorre em cerca de 60% dos casos de FRA e envolve predominantemente a valva mitral, podendo acometer também a valva aórtica e, mais raramente, a valva tricúspide, com níveis variáveis de regressão das lesões valvares agudas (1, 15, 29).

A sequela mais grave desse quadro é a CRC, que corresponde a lesões valvares residuais fibróticas e progressivas da cardite. A doença cursa com grande morbidade levando, muitas vezes, à necessidade de cirurgia cardíaca para troca valvar. Ainda não se sabe exatamente como essa progressão ocorre e quais os principais fatores relacionados a ela (30, 31).

Em relação ao estreptococo, durante a segunda guerra mundial, as cepas isoladas nos surtos de FRA eram ricas em proteína M e bastante imunogênicas em ratos. Atualmente, no entanto, percebe-se maior diversidade entre as bactérias isoladas nas áreas endêmicas em

regiões tropicais com o predomínio de cepas associadas a infecções de pele, levantando a suspeita de que cepas associadas a infecções cutâneas poderiam sim ser responsáveis por alguns casos de FRA (32, 33).

2.3.1 Imunologia e genética na cardiopatia reumática crônica

Uma vez estabelecida a observação de que indivíduos com história familiar de febre reumática têm uma chance maior de desenvolver a doença (2, 26, 27, 34), nas últimas décadas, tem-se tentado estabelecer qual ou quais são os traços genéticos predisponentes usando técnicas modernas de biologia molecular e genética.

Polimorfismos em genes que codificam proteínas relacionados à resposta imune já foram associados à FRA e à suscetibilidade à CRC (Figura 2). Moléculas HLA classe II são expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs) e ativam as células T desencadeando a resposta imune adaptativa – específica – contra o estreptococo. O gene que codifica essa molécula é particularmente polimórfico e mais de uma variante já foi associada à doença, sendo a mais comum o HLA-DR7 (26, 35). Na África do Sul e Uganda, o HLA-DR1 é o principal (4). Novos estudos usando a tecnologia “*genome wide association*” estão analisando o DNA de grandes números de pacientes em busca de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no intuito de encontrar respostas para as muitas perguntas sobre a suscetibilidade do hospedeiro (36).

Figura 2: Polimorfismos gênicos associados à cardiopatia reumática e proteínas codificadas por eles (Retirada de Carpetis et al, 2016(15)).

Gene	Polymorphism	Effect of polymorphism	Population
MBL2	-221X,Y (promoter, exon 1) A (52C, 54G, 57G), O (52T, 54A, 57A)	High production of mannose-binding protein	Brazilian
	A (52C, 54G, 57G), O (52T, 54A, 57A)	Low level of MBL2 in sera	Brazilian
FCN2	-986G>A, -602G>A, -G>A (promoter)	Low levels of FCN2	Brazilian
TLR2	2258A>G (exon 3), resulting in 753 Arg>Gln	Low level of pathogen recognition	Turkish
FCGR2A	494A>G (exon 4), resulting in 131 His>Arg	Low ability of receptor to bind human IgG2	Turkish
IL1RN	Variable number of tandem repeats A1, A2 A3, A4 (intron 2)	Low level of receptor expression	Egyptian and Brazilian
TNF	-308G>A (promoter)	T _H 1 and T _H 2 imbalance	Mexican, Egyptian and Brazilian
	-238G>A (promoter)	High production of TNF	Turkish, Mexican and Brazilian
TGFB1	-509C>T (promoter)	T _H 1 and T _H 2 imbalance	Egyptian
	-509C>T (promoter)	Protection from developing RHD	Chinese
	869T>C (exon 1), resulting in 10 Leu>Pro	Association with elevated serum TGFβ1	Egyptian
IL10	-1082G>A (promoter)	T _H 1 and T _H 2 imbalance	Egyptian
CTLA4	49A>G (exon 1)	Transmits an inhibitory signal to T cells	Turkish
HLA class II	Diverse HLA-DR alleles located at short arm of chromosome six at DRB1 gene, including DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR6, DR7 and DR9	Antigen recognition and antigen presentation to T cells; activation of humoral and cellular immune responses	Several ethnic populations

Fonte: Retirada de Carpetis et al, 2016(15)

Legenda: CTLA4: Proteína citotóxica 4 associada ao linfócito T. FCGR2A, receptor II-a da região gama Fc de imunoglobulina de baixa afinidade. FCN2, ficolina 2; HLA, antígeno leucocitário humano; IL10, interleucina-10; IL1RN, antagonista do receptor da interleucina-1; MBL2: lectina de ligação à manose 2. RHD, cardiopatia reumática crônica. TGFB1, fator de crescimento transformador beta 1 β1; TH, T helper; TLR2, receptor toll-like 2; TNF, fator de necrose tumoral. Referências: (15, 26)

Anticorpos que reagem contra o estreptococo e contra tecidos do hospedeiro em reação cruzada são implicados na patogênese da CRC. Corroborando a teoria do mimetismo molecular, esses anticorpos reagem justamente contra a miosina no miocárdio e a laminina presente no endotélio valvar e membrana basal, além de reagirem contra a proteína M e o carboidrato do grupo A do estreptococo(28, 29). Anticorpos que se ligam às superfícies valvares desencadeiam inflamação e infiltração celular no endocárdio.

Ainda em relação à imunidade humoral, anticorpos contra o colágeno tipo I também

são produzidos na FRA(37), mas eles não fazem reação cruzada. Imagina-se que eles podem ser produzidos após a liberação do colágeno das valvas cardíacas danificadas pela CRC. Esse achado levou à formulação de hipóteses de mecanismos alternativos ao mimetismo molecular para explicar a CRC. A doença poderia ser uma resposta mediada por anticorpos à exposição do colágeno nas valvas. Provavelmente, o que ocorre, de fato, é que o mimetismo molecular dá início ao processo rompendo os mecanismos de auto tolerância e iniciando a cardite, enquanto a exposição do colágeno após o dano valvar inicial confere continuidade ao processo.

A produção de IgG que reage com o endotélio valvar leva ao aumento da expressão (“*up regulation*”) da proteína 1 de adesão da célula vascular (VCAM1) na superfície endotelial promovendo a infiltração de células T no tecido local. Tanto células T CD4+ quanto as T CD8+ infiltram as valvas na FRA, mas as CD4+ predominam na valva inflamada (38). Apenas células autorreativas, que são continuamente estimuladas por proteínas valvares sobrevivem no tecido, produzindo citocinas que permanecem causando inflamação e fibrose. A persistência das células no tecido está também associada à presença de fatores de crescimento que mantem sua sobrevivência, como PDGF, VEGF e FGF. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que estes fatores estão aumentados no plasma de pacientes com DR grave, e que seus níveis reduzem à normalidade após valvuloplastia (39).

O recrutamento de linfócitos para o tecido valvar acontece em resposta à produção de quimiocinas locais. Aparentemente, a quimiocina CXCL9/Mig é a que está mais associada ao recrutamento das células T para o tecido valvar lesionado na CRC (40). A CXCL9/Mig é uma quimiocina induzida pelo INF- γ . Ela se liga ao receptor CXCR3, expresso em vários tipos celulares, mas presente principalmente em células de memória. Já foi levantada a hipótese de que o bloqueio do CXCR3 poderia ser uma estratégia para controlar a atividade inflamatória nas valvas cardíacas, mas muitos estudos ainda são necessários para isso, já que o bloqueio pode resultar em prejuízo da função das células T efetoras (40). Os estudos sobre a expressão de quimiocinas ainda são escassos e essa é uma das importantes contribuições deste trabalho.

Em relação à resposta celular, as células auto reativas que infiltram o miocárdio e as valvas cardíacas reconhecendo proteínas do miocárdio e do endotélio valvar apresentam perfil oligoclonal, ou seja, procedem da linhagem de poucos clones de células T, corroborando a ideia de que apenas células autorreativas permanecem se multiplicando no tecido valvar (41). Células T retiradas de valvas com CRC expressam TNF e IFN- γ , citocinas que caracterizam

essas células como o subtipo Th1. São poucas as células presentes nesses tecidos que expressam IL-4, uma citocina regulatória produzida pelo subtipo Th2. As células Th1 promovem a formação de granulomas na presença de e IFN- γ , contribuindo para a formação dos nódulos de Aschoff (41).

A função das células Th17 vem apresentando crescente interesse. Na CRC, já foram identificados níveis séricos elevados de IL-17A e de células Th17 (42). As células Th17 se desenvolvem em infecções bacterianas e fúngicas e contribuem para a reação inflamatória aguda contra esses patógenos, sendo implicadas em diversas doenças inflamatórias inclusive autoimunes. Sua principal função é o recrutamento de neutrófilos (e monócitos em menor grau), induzindo inflamação (43). A diferenciação das células T CD4+ em células Th17 está intimamente ligada à produção das citocinas IL-23 e IL-6 (43). Os antígenos humanos e bacterianos implicados na reação cruzada da imunidade celular são semelhantes aos da imunidade humoral: regiões da miosina e da laminina no hospedeiro e proteína M no estreptococo.

A presença de células T do subtipo Th2, que pode produzir IL-4, IL-5, IL-13 e TGF-beta, parece ser protetora contra danos contínuos nas valvas. Análise do tecido valvar ressecado de pacientes com CRC mostrou que a maior parte das células mononucleares presentes em regiões não inflamadas produziam mais IL-4 do que as células em tecidos mais danificados (41).

A interação entre as respostas imune inata e adaptativa e entre a imunidade humoral e celular ocorre pela ação e coordenação de citocinas. O aumento dos níveis séricos de IL-1a, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF já foi verificado em pacientes com FRA e CRC (44). Nas células tonsilares de pacientes com CRC, níveis de IL-1, IL-2 e TNF são reduzidos apesar das células mononucleares no sangue desses mesmos pacientes apresentarem produção aumentada dessas mesmas citocinas quando estimuladas. Esses achados sugerem que a resposta imune muda conforme o compartimento avaliado apesar das células de defesa estarem persistentemente ativadas (45).

O TGF-beta inibe respostas inflamatórias agudas e leva à cicatrização, fibrose e angiogênese. Essa molécula é produzida por células do interstício valvar que assumem uma função miofibroblasto-like, sendo que sua produção crônica pode levar

a fibrose e estenose valvar na CRC. O TGF-beta também parece ter papel no desenvolvimento das células Th17 e continuidade de processos fibróticos. TNF e IFN- γ , como já mencionado acima, são produzidos pelas células Th1 e estão presentes em níveis elevados em indivíduos com doença (44).

Estudos em polimorfismos nos genes que codificam essas moléculas ainda não foram adequadamente avaliados na população brasileira, especialmente considerando-se os parâmetros de gravidade da evolução clínica da doença reumática.

2.4 Diagnóstico

2.4.1 Diagnóstico da Febre Reumática Aguda (FRA)

O diagnóstico da FRA é baseado nos critérios de Jones modificados (Quadro 2). Eles foram atualizados com a inclusão do ecocardiograma para aumentar sua acurácia diagnóstica (46). Atualmente, o risco populacional do paciente é levado em consideração, apesar dos critérios maiores e menores continuarem os mesmos. O objetivo destas recentes modificações seria aumentar a especificidade em populações de baixa incidência da doença e a sensibilidade nas populações endêmicas (47). São consideradas populações de baixo risco aquelas que apresentam incidência de FRA menor ou igual a 2/100.000 em crianças em idade escolar ou prevalência da CRC menor ou igual a 1/1.000 por ano (47).

A última revisão, realizada em 2015, trouxe uma importante atualização nestes critérios que foi a inclusão da cardite subclínica como critério maior para o diagnóstico da FRA, frente aos avanços da ecodopplercardiografia que permitiu a detecção dessa entidade (47). Para a definição do diagnóstico, além de dois critérios maiores ou um critério maior e dois menores, é preciso haver evidência de infecção estreptocócica recente. Isso pode ser feito por meio da cultura de orofaringe, da presença de títulos elevados de anticorpos anti-estreptocócicos, do teste rápido para antígeno do estreptococo ou por escarlatina recente. Os anticorpos utilizados para o diagnóstico são a antiestreptolisina O (ASLO) e anti-DNase B, mas esses exames têm baixa sensibilidade em regiões endêmicas, onde a o contato com o estreptococo é frequente (48).

Dentre as manifestações da doença que constituem os critérios maiores, as mais comuns

são cardite (50-70% dos casos), artrite (35-66%) e coréia (10-30%), sendo que os nódulos subcutâneos e o eritema marginado estão presentes em menos de 10% dos casos. A coréia de Sydenham pode se manifestar meses após a infecção inicial e por isso sua presença sem outros critérios da doença pode fechar o diagnóstico, excepcionalmente. Nos casos de pacientes com cardite considerada como critério maior, o intervalo PR no eletrocardiograma (iPR) não pode ser entrar como critério menor. As manifestações articulares podem ser consideradas como critério maior ou menor, mas não ambos para o mesmo paciente. Em caso do diagnóstico de FRA recorrente, pode-se fazer o diagnóstico com apenas 3 critérios menores (47).

Quadro 2 – Critérios de Jones Revisados para o diagnóstico de Febre Reumática (2015)

A. Critérios maiores	
Populações de baixo risco	Populações de moderado a alto risco
Cardite clínica ou subclínica	Cardite clínica ou subclínica
Poliartrite	Poliartrite, monoartrite ou poliartralgia*
Coréia	Coréia
Eritema Marginado	Eritema Marginado
Nódulos subcutâneos	Nódulos subcutâneos
B. Critérios Menores	
Populações de baixo risco	Populações de moderado a alto risco
Poliartralgia	Monoartralgia
Febre (>38,5°C)	Febre (>38°C)
Provas de atividade inflamatória: VHS >60mm e/ou PCR >3,0	Provas de atividade inflamatória: VHS >30mm e/ou PCR >3,0
Aumento do iPR no ECG	Aumento do iPR no ECG

* Considerar poliartralgia como critério maior apenas após excluídas outras possíveis causas.
Referência: adaptado de (47).

A cardite na FRA acomete, principalmente, as valvas mitral e aórtica, possivelmente pela presença maior de um centro de tecido conjuntivo envolvido pela camada de endotélio nessas valvas (49). Cerca de 10% dos pacientes desenvolvem valvulite aguda grave com insuficiências mitral ou aórtica após o primeiro episódio de FRA. As valvas tricúspide e pulmonar também podem ser acometidas, mas isso é bastante incomum e ocorre apenas na doença avançada (50).

A maioria dos pacientes com CRC avançada não relata história prévia de cardite reumática aguda (15). Com isso, o meio científico tem focado o interesse na compreensão da cardite subclínica, detectada ao ecocardiograma, que já foi incluída na última revisão dos critérios de Jones. O diagnóstico da cardite subclínica é baseado em achados ecodopplercardiográficos em pacientes com suspeita de FRA e que não apresentam sopros na ausculta cardíaca (47). Os achados ecodopplercardiográficos de alterações valvares para o diagnóstico de cardite subclínica são semelhantes aos critérios diagnósticos da cardiopatia reumática subclínica descritos pela WHF em 2012 (8).

2.4.2 Diagnóstico da cardiopatia reumática latente ou subclínica

Um paciente pode ser diagnosticado com CRC após um episódio de FRA. No entanto, quase 60% dos indivíduos que se apresentam com doença valvar sintomática não se lembra de ter tido um episódio prévio de FRA (51). A principal manifestação inicial da CRC clínica é a dispneia aos esforços entre os 20-50 anos de idade. O diagnóstico clínico é baseado na presença de sopro patológico na ausculta cardíaca, sendo o sopro de insuficiência mitral o mais comum. A estenose mitral, na maioria das vezes, se desenvolve mais tardiamente como resultado da inflamação persistente que leva a fusão das comissuras, apesar de existirem casos em adolescentes, e sua história natural pode compreender períodos assintomáticos longos, muitas vezes superiores a uma década, o que torna frequente o diagnóstico já com manifestações clínicas graves(52).

Pacientes com insuficiência mitral podem permanecer assintomáticos por até 10 anos devido às alterações anatômicas e fisiológicas compensatórias do ventrículo e átrio esquerdos antes do desenvolvimento de disfunção sistólica. Acometimento isolado das valvas tricúspide e pulmonar não são características da CRC. A doença também pode ser diagnosticada após a manifestação de outras complicações, como arritmias, eventos embólicos, insuficiência cardíaca aguda ou endocardite infecciosa (3, 16). A suspeita clínica deve ser confirmada com o ecodopplercardiograma, que vai evidenciar as alterações típicas como aumento da espessura valvar e do aparato subvalvar, fusão das comissuras, calcificação e restrição da movimentação dos folhetos (53).

Nas últimas décadas, com o advento e uso amplo do ecodopplercardiograma, a CRC vem sendo diagnosticada em pacientes completamente assintomáticos. A nomenclatura

utilizada para descrever esses casos ainda não está bem estabelecida na literatura, sendo que o termo “subclínico”, em geral, se refere aos casos em que a doença é diagnosticada pelo ecocardiograma em um paciente com exame clínico cardíaco normal. O termo “latente” é mais amplo e inclui qualquer CRC vista pelo ecocardiograma na ausência de história prévia de FRA. Apesar da CRL incluir os pacientes com doença subclínica, uma boa parte dos casos tem evolução ruim, com piora da regurgitação e/ou da estenose e óbito em menos de 3 anos. Apenas 9.5% apresentam melhora no mesmo período (13). As alterações ecocardiográficas encontradas na CRL são semelhantes às vistas na cardite aguda. São acrescentados, no entanto, aspectos morfológicos que são adquiridos com a progressão das lesões valvares. Em 2012, a WHF publicou os primeiros critérios padronizados e baseados em evidência para o diagnóstico ecocardiográfico da CRL (Quadro 3).

Quadro 3 – Alterações ecocardiográficas da cardiopatia reumática nas valvas mitral e aórtica.

Alterações morfológicas – valva mitral	Alterações morfológicas – valva aórtica
Espessura do folheto anterior $\geq 3\text{mm}^*$	Espessamento irregular ou focal
Espessamento de cordoalha	Defeito de coaptação
Redução da mobilidade do folheto posterior	Restrição da mobilidade do folheto
Excessiva mobilidade da ponta do folheto durante a sístole **	Prolapso
Regurgitação mitral patológica (deve cumprir os 4 critérios)	Regurgitação aórtica patológica (deve cumprir os 4 critérios)
Visto em pelo menos 2 incidências	Visto em pelo menos 2 incidências
Comprimento de jato $\geq 2\text{cm}$ (em pelo menos uma incidência)	Comprimento de jato $\geq 1\text{cm}$ (em pelo menos uma incidência)
Velocidade do jato $\geq 3\text{m/s}$	Velocidade de jato $\geq 3\text{m/s}$ no início da diástole
Jato holossistólico em pelo menos um registro do Doppler	Jato holodiastólico em pelo menos um registro do Doppler.

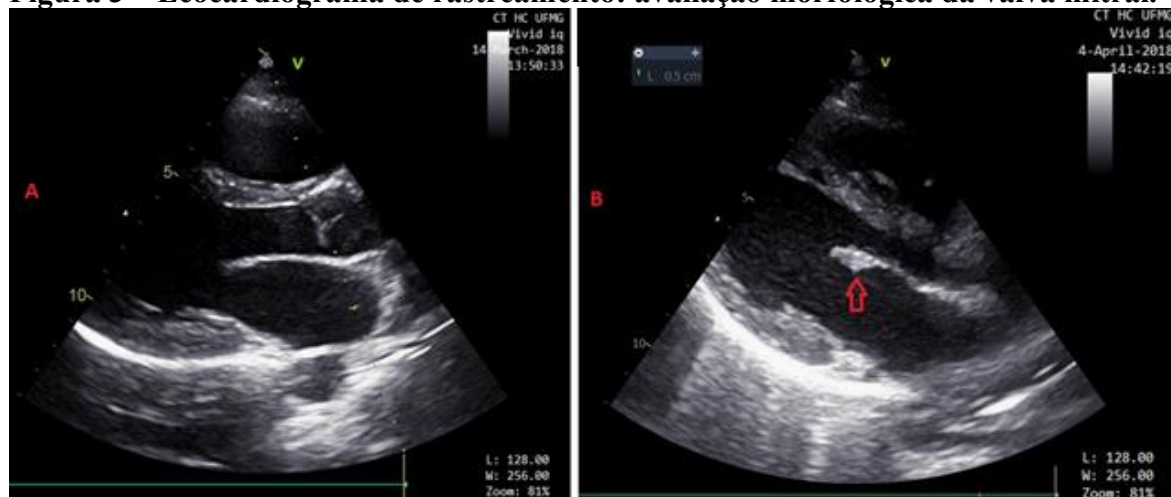
* Valor de referência específico para a idade: $> 3\text{mm}$ para indivíduos com até 20 anos; $> 4\text{mm}$ para indivíduos de 21-40 anos e $> 5\text{mm}$ para indivíduos com mais de 40 anos.

** Variável válida para indivíduos de até 35 anos.

Fonte: adaptada de (8)

A figura 3, adiante, ilustra uma das alterações morfológicas mais comuns em pacientes com CRC, o espessamento do folheto anterior da VM.

Figura 3 – Ecocardiograma de rastreamento: avaliação morfológica da valva mitral.

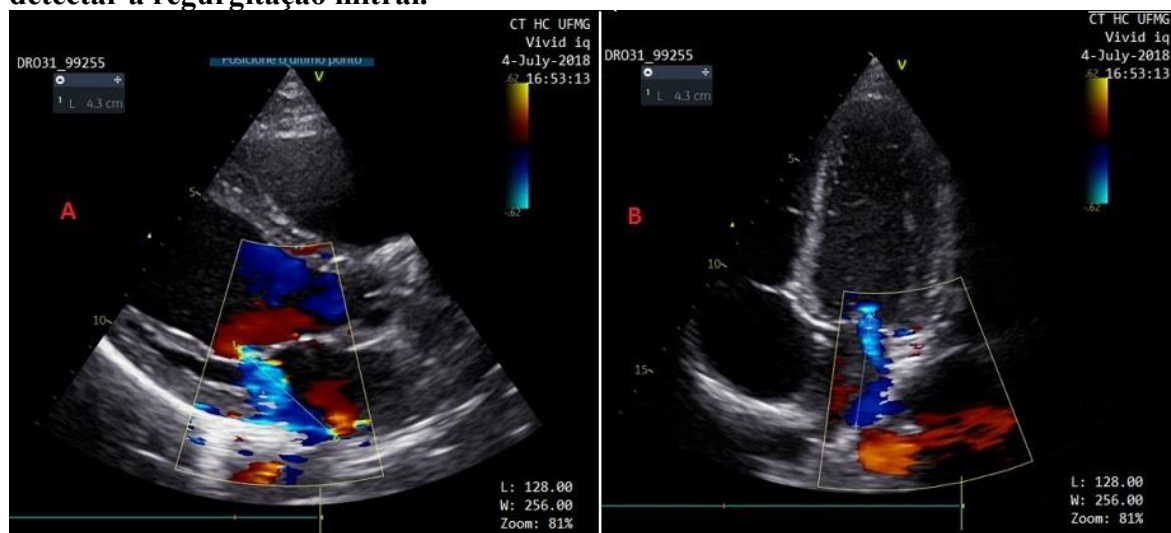


Fonte: **Bechtluft, B.M.F 2019(54).**

Legenda: Imagens ecocardiográficas paraesternais longitudinais. Imagem A (à esquerda): valva mitral normal. Imagem B (à direita): folheto anterior espessado, com 5mm de espessura. Ambas as imagens são provenientes de exames de pacientes da pesquisa, o primeiro com diagnóstico de exame normal e o segundo com diagnóstico de CRL definitiva.

A figura 4 a seguir ilustra a regurgitação mitral patológica.

Figura 4 – Ecocardiograma de rastreamento com o uso do Doppler colorido para detectar a regurgitação mitral.



Fonte: **Bechtluft, B.M.F 2019(54).**

Legenda: Imagens ecocardiográficas evidenciando regurgitação mitral patológica. A imagem A (à esquerda) mostra uma imagem no eixo paraesternal longitudinal, com um jato regurgitante mitral medindo 4,3cm e a figura B (à direita) mostra uma imagem do eixo apical de 4 câmaras evidenciando o mesmo jato regurgitante. Ambas as imagens foram extraídas do exame de um dos pacientes da pesquisa que foi diagnosticado com CR definitiva.

A partir dos critérios ecocardiográficos listados anteriormente, a WHF estabeleceu uma classificação da CRL detectada pelo ecocardiograma em *borderline* ou definitiva (8).

CRL Borderline para indivíduos com até 20 anos de idade:

- Pelo menos duas alterações morfológicas da valva mitral, sem regurgitação ou estenose patológica;
- Regurgitação mitral patológica;
- Regurgitação aórtica patológica;

CRL definitiva, para indivíduos com até 20 anos de idade:

- Regurgitação mitral patológica associada a pelo menos duas alterações morfológicas da valva mitral;
- Estenose mitral com gradiente ≥ 4 mmHg;
- Regurgitação aórtica patológica e pelo menos 2 alterações morfológicas da valva aórtica;
- Doença *borderline* em ambas as valvas, mitral e aórtica.

Para indivíduos acima de 20 anos de idade, não é utilizada a classificação *borderline*, apenas a classificação definitiva, quando preenchem os seguintes critérios:

- Regurgitação mitral patológica e pelo menos duas alterações morfológicas da valva mitral;
- Estenose mitral com gradiente maior ou igual a 4mmHg;
- Regurgitação mitral patológica e pelo menos duas alterações morfológicas na valva aórtica (apenas para indivíduos menores de 35 anos).
- Regurgitação aórtica patológica e, pelo menos, 2 alterações morfológicas na valva mitral.

Ainda são necessários estudos de acompanhamento longitudinal por períodos mais longos desses pacientes com CRL para se conhecer melhor sua evolução. Como mencionado anteriormente, alguns estudos de acompanhamento breve demonstraram progressão da doença latente em populações endêmicas, mas eles não foram uniformes nas definições de progressão ou nos desfechos avaliados (9, 16, 55-62), apontando para a necessidade do estudo de novas estratégias de diagnóstico, predição de evolução e tratamento.

A progressão ocorre principalmente nos casos de CRL definitiva, sendo que os pacientes com doença *borderline* têm curso clínico ainda incerto. A categoria *borderline*, na verdade, foi criada com o intuito de aumentar a sensibilidade do diagnóstico pelo ecocardiograma em indivíduos com menos de 20 anos, mas sabe-se que a especificidade é menor (8). A maioria dos indivíduos com doença *borderline* ou definitiva leve permanecem estáveis ou apresentam regressão da doença, mas de 10 a 24 % deles progredem. Para além das categorias diagnósticas definidas pela WHF, um grupo de variáveis ecocardiográficas compiladas em um escore parece prever a progressão ecocardiográfica a médio prazo com considerável acurácia(10), apesar de ainda não ter sido validado para desfechos clínicos. Aparentemente, quando mais avançada é a doença no momento do diagnóstico, maior é a chance de que ela avance nos anos seguintes (13).

2.4.3 Diagnóstico da cardiopatia reumática crônica clínica

Define-se como CRC manifestada clinicamente a presença de disfunção valvar decorrente do processo patológico reumático ao exame físico e ao ecocardiograma. A classificação da gravidade das lesões valvares baseia-se em vários critérios, incluindo os achados de disfunção valvar ao exame físico, confirmados ao ecocardiograma, conforme recomendado pelas diretrizes de doenças valvares (63). A CRC clínica é classificada em 4 estágios (A a D) conforme presença de sintomas, a gravidade da lesão valvar, resposta do ventrículo esquerdo e direito à sobrecarga de volume ou pressão causada pela disfunção valvar e efeito na circulação pulmonar ou sistêmica. A principal manifestação clínica resultante das alterações morfológicas e funcionais valvares é insuficiência cardíaca.

O intervalo entre o episódio inicial de FRA e a evidência clínica da CRC é variável, desde poucos anos até mais de 2 décadas. 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 de insuficiência da valva mitral ou em combinação com outras valvas. 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%.(64)

2.5 Tratamento e Prevenção da cardiopatia Reumática Crônica

2.5.1 Profilaxia primária

Nos países desenvolvidos, a prevalência da CRC começou a diminuir antes do advento da penicilina. Isso demonstra que melhores condições socioeconômicas e acesso aos serviços de saúde se associam à redução da incidência da doença, apesar disso não ser suficiente para erradicá-la (3).

A profilaxia primária da CRC consiste no reconhecimento e no tratamento adequados da faringite estreptocócica, o que reduz o risco de FRA em pacientes de alto risco. Ainda é necessária mais investigação para avaliar se cepas estreptocócicas associadas a infecções de pele podem ou não estar implicadas no surgimento da FRA. A penicilina G benzatina intramuscular ainda é o tratamento mais usado para a infecção (65).

Uma meta-análise de ensaios clínicos demonstrou que o tratamento adequado da faringite estreptocócica reduz o risco de FRA em até 80%. A maioria dos estudos incluídos, no entanto, foi feito em homens jovens, militares americanos nas décadas de 50 e 60 e apresentam baixa qualidade se comparados com os padrões atuais, com pouca evidência avaliando os efeitos da terapia em mulheres ou outras populações (66).

O diagnóstico adequado da faringite estreptocócica ainda é um desafio nos países endêmicos. O custo elevado dos exames para detecção do estreptococo (cultura e teste rápido) ainda dificulta sua ampla distribuição. Além disso, alguns indivíduos são apenas hospedeiros da bactéria, não apresentam doença e a conduta nesses casos não é clara. Diretrizes para o diagnóstico clínico da faringite bacteriana têm baixa sensibilidade e/ou especificidade dependendo dos critérios usados (16, 66). Outro ponto importante é a conscientização da população, especialmente em áreas de risco, sobre a necessidade de avaliação e tratamento adequados das faringites ressaltando a associação entre a doença amigdaliana e a CRC (16, 67).

Por fim, uma nova possibilidade para a prevenção primária da CRC é o desenvolvimento de vacinas contra o estreptococo. O maior desafio no desenvolvimento das vacinas tem sido sua segurança, já que existe o receio de que ela possa induzir autoimunidade

e o surgimento paradoxal de surtos de FRA e da cardiopatia associada. Algumas versões já foram desenvolvidas tendo como alvo imunogênico a região variável da proteína M da bactéria, e ensaios clínicos de fase II mostraram que ela é segura e imunogênica em seres humanos (44, 68). Outro desafio é a criação de uma vacina que contemple as cepas da bactéria presentes nas regiões endêmicas, que em geral são diferentes daquelas encontradas nos países desenvolvidos onde a maioria dos estudos são conduzidos (68, 69).

2.5.2 Profilaxia secundária

Surto recorrentes de FR podem ser desencadeados por infecções estreptocócicas assintomáticas ou até após seu tratamento adequado, sendo que a recorrência após o primeiro episódio pode ser de até 50%. A prevenção secundária envolve tratamento profilático prolongado com antibióticos na tentativa de evitar novos episódios da doença e prevenir a progressão das valvopatias no caso de acometimento cardíaco (16, 70).

O tratamento padrão é o uso intramuscular de penicilina G benzatina a cada 4 semanas ou 3 semanas em pacientes de maior risco (Quadro 4) (16, 70). O uso da profilaxia secundária com penicilina reduz a recorrência da FRA e possivelmente a progressão das valvopatias (71, 72). A duração desse tratamento (Quadro 5) é baseada na opinião de especialistas, não havendo ensaios clínicos envolvendo pacientes com mais de 25 anos (16).

Em relação à CRL, a profilaxia secundária com penicilina não demonstra os mesmos efeitos. Estudos em coortes australianas e em Uganda demonstraram algum aumento do risco de progressão da doença com o uso de penicilina (9, 12). Na ausência de melhor investigação sobre esse assunto, a maioria das crianças diagnosticadas com CRL definitiva iniciam o uso da penicilina a cada 3-4 semanas. Atualmente, um ensaio clínico de dois anos está sendo conduzido com esses pacientes para ajudar a responder qual o papel da profilaxia secundária com penicilina na CRL (Determining the Impact of Penicillin in Latent RHD: The GOAL Trial; NCT03346525)(11).

Quadro 4 – Profilaxia secundária para a Febre Reumática

Antibiótico	Dose	Via
Penicilina G benzatina – 1ª escolha	600.000 U para pacientes com até 27kg e 1.200.000 U para pacientes com mais de 27kg, a cada 4 semanas*.	Intramuscular
Penicilina V	250mg de 12 em 12 horas.	Via oral
Sulfadiazina (para pacientes alérgicos a penicilina)	0,5g uma vez ao dia para pacientes com até 27kg; 1g, uma vez ao dia, para pacientes maiores de 27kg.	Via oral
Macrolídeos (para pacientes alérgicos a penicilina e sulfadiazina)	Variável	Via oral

Fonte: adaptada de (70)

* Em situações de alto risco, é recomendado o uso da penicilina G benzatina a cada 3 semanas, conforme detalhado no texto.

Quadro 5 – Duração da profilaxia secundária para Febre Reumática

FRA com cardite e doença valvar persistente	10 anos ou até 40 anos de idade (o que for mais longo, podendo se estender a profilaxia vitalícia).
FRA com cardite mas sem doença valvar residual	10 anos ou até 21 anos (o que for mais longo).
FRA sem cardite	5 anos ou até 21 anos (o que for mais longo).

Fonte: adaptada de (70).

2.5.3 Tratamento

O tratamento da CRC é focado nas complicações da doença, não existindo tratamento específico quando ela já está estabelecida (7, 53). As principais complicações são insuficiência cardíaca, fibrilação atrial, eventos embólicos isquêmicos e endocardite.

A insuficiência cardíaca sintomática se instala com a progressão para a valvopatia avançada. Nesse caso, a cirurgia de troca valvar nem sempre poderá reverter o quadro.

Clinicamente, o tratamento deve ser iniciado a partir do momento em que o indivíduo apresentar sintomas conforme as orientações-padrão de tratamento da insuficiência cardíaca. Beta bloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina e diuréticos devem ser usados de acordo com a tolerância do paciente.

Para os pacientes nos quais é possível acompanhar a progressão da valvopatia, a correção cirúrgica deve ser programada antes do início dos sintomas em indivíduos com insuficiência mitral e aórtica graves de acordo com os índices de disfunção ventricular e aumento de câmaras ao ecocardiograma (53, 73). Indivíduos com estenose aórtica grave devem ser submetidos à terapia intervencionista após o início dos sintomas ou quando surgem sinais de dilatação ou disfunção sistólica do ventrículo esquerdo aos exames complementares, e aqueles com estenose mitral têm grande benefício com a valvoplastia percutânea, com crescente indicação mesmo em cenários anatômicos mais complexos e antes elegíveis apenas para a intervenção cirúrgica (52, 53, 73).

Fibrilação atrial, endocardite, e eventos cardioembólicos também devem ser conduzidos conforme as diretrizes vigentes. Em relação à anticoagulação para fibrilação atrial em pacientes com CRC, a varfarina ainda é a opção recomendada, mas isso pode mudar nos próximos anos, com os resultados de ensaios clínicos que estão avaliando o benefício dos novos anticoagulantes na doença (16).

O tratamento invasivo envolve intervenções percutâneas e cirurgia convencional. Pacientes com estenose mitral grave se beneficiam mais de procedimentos percutâneos do que abertos, particularmente da comissurotomia percutânea por balão (53, 73), com crescente indicação e bons resultados a curto e longo prazo. Os tratamentos cirúrgicos da CRC consomem a maior parte dos recursos destinados à doença e a dificuldade de acesso aos procedimentos é uma das grandes barreiras à redução de sua morbimortalidade (16).

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A CRC é uma doença com alta morbimortalidade que afeta principalmente jovens e adultos em idade produtiva. O impacto econômico global das mortes prematuras em decorrência da doença foi estimado em 65 bilhões de dólares em 2015(16).

Apesar da prevalência da doença ter se reduzido nos países desenvolvidos, ela permanece sendo importante causa de perda de anos produtivos em populações com piores condições socioeconômicas. Um recente esforço de pesquisa mundial vem mostrando grandes resultados, que estão levando a uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença, das variáveis implicadas no estabelecimento e na progressão das valvopatias e de entidades pouco conhecidas até agora e com implicações clínicas ainda incertas, como a CRL.

Nesse sentido, a melhor compreensão desses mecanismos pode levar ao desenvolvimento de um marcador diagnóstico e prognóstico para a CRC e ao desenvolvimento de terapias direcionadas aos agentes do sistema imunológico que coordenam a inflamação e fibrose nas valvas cardíacas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Avaliar aspectos do perfil imunológico (genético e fenotípico) de pacientes em dois grupos em relação à CRC: pacientes portadores de doença latente (subclínica) e aqueles com doença clínica, correlacionando os achados à apresentação clínica.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar, clinicamente, pacientes sem doença reumática, com CRC subclínica e com doença clínica, utilizando-se os seguintes parâmetros: história clínica, incluindo sintomatologia e exame cardiovascular, eletrocardiograma e ecocardiograma.
- Avaliar a presença de polimorfismos funcionais nos genes de *IL10*, *IL17*, *IL23R*, *IL6*, *IL4*, *IL2*, *TNF*.
- Avaliar a associação entre: a presença de polimorfismos funcionais nos genes de *IL10*, *IL17*, *IL23R*, *IL6*, *IL4*, *IL2*, *TNF* e os diferentes espectros de CRC - ausência de doença, doença latente e doença clínica.
- Avaliar a expressão fenotípica de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas e sua associação com os diferentes espectros da CRC: ausência de doença, doença subclínica e doença clínica.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho do Estudo

Trata-se de estudo observacional, transversal. O perfil de polimorfismos funcionais e expressões fenotípicas das citocinas IL-10, IL-17, IL-23R, IL-6, IL-4, IL-2, TNF, assim como dos outros fatores solúveis analisados, serão comparados entre dois grupos: 1. Pacientes com CRL diagnosticados por rastreamento ecocardiográfico. 2. Pacientes com CRC clínica. Também serão avaliados, como grupo controle, indivíduos normais, sem CRC após estudo ecocardiográfico realizado pelo projeto PROVAR.

5.2 Seleção da amostra

Os indivíduos com cardiopatia reumática subclínica e os indivíduos saudáveis foram selecionados entre os participantes (crianças e adolescentes entre 5 e 18 anos de idade) do Programa de Rastreamento de Valvopatia Reumática (PROVAR), que realizou rastreamento ecocardiográfico em 12.056 crianças e adolescentes, com idade de 13 ± 3 anos, em 54 escolas de Minas Gerais entre 2014 e 2017(74).

Os indivíduos com CRC clínica foram selecionados entre os pacientes que fazem acompanhamento clínico e cirúrgico no ambulatório de CRC do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

5.2.1 Critérios de inclusão

- Grupo 1- CRL, definida como alterações morfológicas e funcionais das valvas cardíacas esquerdas, evidenciadas através do rastreamento ecocardiográfico de acordo com os critérios da WHF de 2012 (8).
- Grupo 2 – CRC clínica, definida pela presença de disfunção valvar reumática decorrente da febre reumática prévia, em acompanhamento no ambulatório de cardiologia do Hospital das Clínicas da UFMG para tratamento das lesões valvares (estágios B a D da diretriz(63).

- Grupo 3 - Indivíduos saudáveis incluídos como controles normais, com características demográficas semelhantes aos indivíduos com CRL, porém com rastreamento ecocardiográfico normal, sem evidências de lesões valvares ou outras cardiopatias.

5.2.2 Critérios de exclusão

- Outras alterações diagnosticadas ao ecocardiograma de rastreamento, incluindo cardiopatia congênita.
- Pacientes com rastreamento ecocardiográfico positivo para CRL, mas com história de FRA relatada ou sintomas prévios.

5.2.3 Cálculo Amostral

O cálculo amostral foi realizado a partir de estudo anterior incluindo 89 pacientes com CRC que determinou os valores das citocinas conforme a gravidade da apresentação clínica da doença. Selecionou-se a IL-4 para os cálculos, verificando-se um aumento na concentração sérica dessa citocina nos pacientes mais graves que necessitaram intervenção valvar em relação aos demais ($12,2 \pm 6,2$ pg/mL vs $9,8 \pm 2,0$ pg/mL, respectivamente). Estimou-se que a diferença nos valores dessa citocina seria mantida comparando-se cardiopatia estável e subclínica. Assim, considerando-se erro alfa de 0,05, poder estatístico de 90%, proporção de 1:1 cardiopatia subclínica/clínica, obteve-se uma amostra total de 166 pacientes (83 indivíduos em cada grupo). Para os cálculos, utilizou-se software G Power, versão 3.1.

5.3 Detalhamento do Estudo

Durante o rastreamento do projeto PROVAR, imagens captadas nas escolas por não-médicos com aparelhos de ecocardiografia portáteis (GE Vivid Q e Vivid IQ) e ultraportáteis (GE VSCAN) foram lidas através de telemedicina por cardiologistas experientes no Brasil e nos EUA que estabeleceram o diagnóstico de CRC conforme os critérios da WHF de 2012, através de consenso. Baseando-se nesses critérios, 549 apresentaram exame de rastreamento alterado (486 foram classificados com borderline e 63 como CRL definitiva).

Entre os pacientes que apresentaram critérios para CRL, 77 assinaram um termo de consentimento para que fosse coletada uma amostra de sangue e para que fossem incluídos

neste estudo. Entre aqueles sem alterações, 35 fizeram o mesmo. Pacientes com CRC clínica acompanhados ambulatorialmente concordaram em participar do estudo e 100 deles foram submetidos à coleta de sangue em tubo com EDTA.

Após as coletas, o sangue foi centrifugado e DNA foi extraído do pellet celular pelo método da sílica. O material genético obtido foi diluído para gerar uma solução com concentração padronizada e então uma alíquota de 1 microlitro foi retirada para as análises de polimorfismos funcionais. Foi utilizada PCR em tempo real com iniciadores e tampões Thermo Fisher, seguindo metodologia sugerida pelo fabricante e já estabelecida no Laboratório de Interações Celulares do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (LABIC). Os polimorfismos pesquisados foram os dos genes *IL2* (rs2069762 G/T), *IL4* (rs2243250 C/T), *IL6* (rs1800795 C/G), *IL10* (rs1800896 T/C), *IL17A* (rs2275913 A/G), TNF-alfa (rs361525 A/G) and *IL23* (rs11209026 A/G).

A avaliação do nível sérico de 27 fatores solúveis associados à resposta imune foi feita com o soro remanescente após a centrifugação inicial das amostras. Foi utilizado o kit Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay da Bio-Rad, seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. Os fatores avaliados foram: FGF basic, CCL11, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, CCL2 (MCAF), CCL3, CCL4, PDGF-BB, CCL5, TNF- α , VEGF.

Todos os resultados foram catalogados em um banco de dados e posteriormente analisados no software estatístico R, com o auxílio dos pacotes tidyverse (manipulação dos dados), foreign (leitura dos dados), ggplot2, corrplot, gridExtra e GGally (gráficos), glmnet (ajuste dos modelos via lasso), e pROC (cálculo da área sob a curva ROC). Para comparação nos níveis séricos das citocinas entre os grupos foi usado o teste de Mann-Whitney e para a comparação dos genótipos foi usado o teste exato de Fisher.

Dentre os polimorfismos e os níveis séricos de citocinas analisados, buscou-se encontrar a presença de padrões que diferenciasssem os grupos de pacientes com CRC e com CRC clínica. Para isso, foi usado o modelo logístico via lasso. Neste, os dados são padronizados numericamente e aleatoriamente separados em conjunto de treinamento (80% dos dados) e em conjunto de teste (20% dos dados). Os dados do conjunto de treinamento (80%), são usados para fornecer informações ao software que vão permitir a identificação das variáveis mais

relacionadas com a resposta desejada – nesse caso, a presença de CRC clínica. Essa fase tem o objetivo de construir um modelo de análise estatística utilizando os próprios dados da pesquisa.

Posteriormente, na fase de teste, os outros 20% dos dados são analisados a partir do modelo construído na fase anterior (de treinamento). O resultado desse processo é um conjunto de variáveis que, associadas, podem explicar um fenômeno. O impacto de cada variável na resposta desejada é demonstrado no coeficiente s_0 , que traduz uma associação diretamente proporcional quando positivo e uma relação inversamente proporcional quando negativo.

Este projeto conta com o financiamento parcial do projeto PROVAR através da Edwards Lifesciences Foundation, EUA, e do CNPq, além de apoio de pesquisadores do Children's National Medical Center em Washington, DC, e do Cincinnati Childrens Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, Estados Unidos. Toda a infra-estrutura necessária para sua realização esteve disponível no laboratório de Biologia das Interações Celulares, ICB, UFMG e do Ambulatório Bias Fortes na Faculdade de Medicina da UFMG.

6. RESULTADOS

6.1 Artigo Original

Interleukin gene functional polymorphisms and their phenotypic expression discriminate latent from clinical Rheumatic Heart Disease.

Julia Pereira Afonso dos Santos Tormin, MD^{1,2}, Bruno Ramos Nascimento, MD, MSc, PhD, FACC^{1,2}, Craig A Sable, MD³, Jose Luiz Padilha da Silva, PhD⁴, Camilo Brandao-de-Resende², Luiz Paulo C. Rocha⁵, Cecília H. R. Pinto⁵, Andrea Teixeira⁵, Frederico Vargas Botinha Macedo², MD, Kaciane Krauss Bruno Oliveira, BSN, MSc, PhD^{1,2} Adriana Diamantino, MD, MSc¹, Antônio Luiz P Ribeiro, MD, PhD^{1,2}, Andrea Z Beaton, MD⁶, Maria Carmo P Nunes, MD, PhD^{1,2}, Walderez Ornelas Dutra, PhD^{5,7}.

On behalf of the PROVAR (*Programa de Rastreamento da Valvopatia Reumática*) investigators.

¹ Serviço de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular e Centro de Telessaúde do Hospital das Clínicas da UFMG, Belo Horizonte - MG, Brazil; ² Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, Brazil; ³ Children's National Health System, Washington – DC, United States; ⁴ FIPMoc University Center, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil; ⁵ Laboratory of Cell-Cell Interactions, Institute of Biological Sciences, Department of Morphology, Belo Horizonte, Brazil. ⁶ The Heart Institute, Cincinnati Childrens Hospital Medical Center, and the University of Cincinnati School of Medicine, Cincinnati - OH, United States, ⁷ National Institute of Science and Technology in Tropical Diseases (INCT-DT), Salvador – BA, Brazil.

This study was funded by Edwards Lifesciences Foundation, USA.

The funder did not have any relationship with the conduct of the study, the collection, analysis, and interpretation of the data, and the preparation, review, or approval of this manuscript.

The abstract of this study was presented in the American College of Cardiology Scientific Sessions 2020, in Chicago, IL, EUA, from March 28 to 30, 2020.

Corresponding author:

Bruno Ramos Nascimento, MD, MSc, PhD, FACC

Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Rua Tenente Garro 137/1202, Santa Efigênia

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, CEP 30.240-360

Tel.: +55 31 3409 9437; Fax: +55 31 32847298.

Introduction:

Rheumatic Heart Disease (RHD) is a high morbidity condition, particularly in developing countries. Disease prevalence was estimated in 33.2 million cases in 2015, when it was responsible for 319,000 deaths worldwide, and associated with numerous cases of significant disability caused by heart failure, stroke and atrial fibrillation (1). RHD is the most common acquired cardiovascular disease in children and young adults and it results from a complex and still not fully understood interaction between group A streptococcus (GAS) infection and the host's immune system.

The wide spread of echocardiography in the last decades led to RHD being increasingly diagnosed in asymptomatic individuals who did not recall previous episodes of acute rheumatic fever (ARF), markedly in screening programs. This new clinical form was named latent RHD, and epidemiological studies estimated that for every symptomatic RHD patient, there were 10 latent RHD individuals. Although the clinical course of latent RHD is uncertain, short term follow-up studies showed that 10-24% of valvular lesions progress overtime. Apparently, the more severe the disease manifestations at the time of diagnosis, the greater the chance of progression (2-5), also associated with certain echocardiographic findings(6). Currently, there are still no clear immunological or clinical markers that predict poorer outcomes in these patients.

Autoimmunity is a central pathophysiologic component of RHD as demonstrated during decades of research (7-16). Streptococcus antigens activate the innate immune cells which in turn present the antigens to T CD4+ lymphocytes triggering the adaptive immune response. Both cellular and humoral immune responses are implicated in the pathogenesis: there are direct valvular lesions caused by activated T cells and by antibody production by B lymphocytes (8). In susceptible individuals, structural resemblance between streptococcus surface antigens and the hosts' cardiac tissue proteins leads to a cross reaction, in which activated T cells and antibodies bind to cardiac connective tissue causing inflammation and fibrosis particularly of heart valves. This is the molecular mimicry theory, and the 2 main streptococcal antigens implicated are the surface M protein and N-acetyl-glucosamine, the immunodominant epitope of group A carbohydrate(9).

In recent years, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes that encode molecules involved with the immune response and their association with ARF were studied (13). SNPs associated with RHD include variations in genes related with the innate and with the adaptive immune responses, including genes that encode cytokines responsible for coordinating both (13). However, those studies did not evaluate the association of the polymorphisms with the permanence in latent forms, nor with evolution to clinical disease. In this study, we evaluated the presence of SNPs in genes that encode IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α and IL-23 and the serum levels of the coded cytokines and other soluble factors in patients with latent and patent RHD. The goal was to evaluate whether the presence of polymorphisms and the serum levels of soluble factors could impact disease progression.

Methods:

Data analytic methods and study materials will be made available to other researchers for purposes of reproducing the results or replicating the procedure, from the corresponding author upon reasonable request. Data from 3 groups of patients were collected and analyzed: (1) clinical RHD, (2) latent RHD and (3) no heart disease. We considered as having clinical RHD patients who presented with valvular dysfunction in accordance with current guidelines (33) and were followed in the RHD outpatient clinic of a university hospital in Brazil. Patients with latent RHD and normal individuals were enrolled from the PROVAR (*Programa de Rastreamento da Valvopatia Reumática*) project, a collaboration between the Children's National Health System, Washington – DC, US, the Universidade Federal de Minas Gerais and the Telehealth Network of Minas Gerais(17), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. This screening program has already screened more than 12,000 children and adolescents from 21 schools in Minas Gerais, Brazil, between October 2014 and December 2016, and its detailed methodology and results have been described elsewhere(18-20). Latent RHD was diagnosed utilizing the 2012 echocardiographic World Heart Federation Criteria (WHF). All included patients signed the informed consent prior to enrollment. When appropriate, consent was given by a parent. This study was approved by the institutional review boards of the participant institutions (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP#510.091) and Children's National Health System Institutional Review Board) and conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

Whole blood was collected in EDTA tubes and then centrifuged. For polymorphism analysis, DNA was extracted using the silica method, as previously done by us (21). Afterwards, the genetic material was quantified, and an aliquot of 100 ng was used for real time PCR with specific primers and probes for the following gene polymorphisms: *IL2* (rs2069762 G/T), *IL4* (rs2243250 C/T), *IL6* (rs1800795 C/G), *IL10* (rs1800896 T/C), *IL17A* (rs2275913 A/G), *TNF-alfa* (rs361525 A/G) and *IL23* (rs11209026 A/G). *TaqMan*® *SNP Genotyping Master Mix* and *TaqMan*® *SNP Genotyping assay* were used for amplification and polymorphism detection.

Circulating cytokine levels were evaluated using BD-Bioplex assay, measuring 27 different molecules: IL-1beta, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, CCL11, basic FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN-gamma, IP-10, CCL2 (MCAF), CCL3, CCL4, PDGF-BB, CCL5, TNF-alpha, VEGF. Serum levels were reported as median fluorescence intensity (MFI). Genomes and cytokine levels were cataloged on a database and then the statistical analysis was performed comparing disease groups: clinical RHD, latent RHD and healthy individuals (controls).

Statistical analysis:

All clinical and echocardiographic data were entered to the RedCap® online database(22). Sample size calculation was performed using data from a previous study that included 89 patients with clinical RHD. This study evaluated serum cytokine levels according with the clinical presentation of the disease. For calculation purposes, findings regarding IL-4 levels were used. An increase in IL-4 levels was verified in patients who had more severe disease, requiring valve intervention, when compared to individuals who did not require an invasive procedure ($12,2 \pm 6,2$ pg/mL vs $9,8 \pm 2,0$ pg/mL, respectively). These differences in IL-4 values were expected to be maintained in the comparison between patients with clinical RHD and latent RHD in the present study. Therefore, considering an alfa error of 0.05, statistical power of 90%, proportion of 1:1 subclinical/ clinical heart disease, a total sample of 166 patients (83 individuals in each group) was obtained. Software G power, version 3.1 was used for calculations.

Results were analyzed using the statistical software R, and the packages tidyverse (data manipulation), foreign (data read), ggplot2, corrplot, gridExtra e GGally (graphics), glmnet

(model adjustment via lasso), and pROC (area under the ROC curve calculation). Categorical variables were expressed as numbers and percentages and compared between groups using Fisher's exact test, whereas continuous data were expressed as mean \pm SD or median or Q1/Q3 (25%/75%). The logistic model via lasso was applied for the analysis. In this model, data is numerically standardized and randomly split into training (80% of data) and test samples (20%). Training samples are used to feed the software with information that allows the identification of the most important variables for the response we are looking for – in this case, the presence of clinical RHD. This phase aims to construct a statistical analysis model using the database itself. Subsequently the remaining 20% of data is analyzed with the application of the previously constructed model. Results are displayed as a set of variables that, in association, can explain a phenomenon. Variable impact on the desired response is exhibited as an s_0 coefficient which translates a directly proportional association when positive and an inversely proportional association when negative.

Results:

A total of 212 patients were included, 77 of them with latent RHD (17 definite and 60 borderline), 100 with clinical RHD and 35 with no heart disease. Median age was 15 (IQR 13-16) years in the latent RHD group and 43 (IQR 33-51) years in the clinical RHD group, being healthy individuals slightly younger than those with latent disease, with a mean age of 13 (IQR 9-15) years. The percentage of female patients was 60 and 65 respectively in the normal and latent groups ($p=0.615$) and 82 in the clinical RHD group. Clinical features of the studied population are shown in **Table 1**.

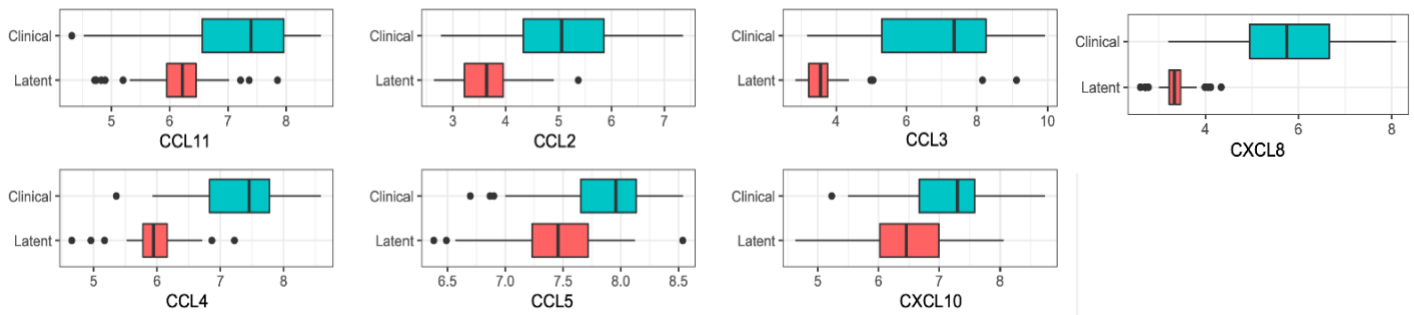
All clinical RHD patients had mitral valve disease, being 32 with stable disease not requiring valve intervention and 68 with severe disease requiring percutaneous or surgical valve intervention to improve hemodynamics or symptoms. Isolated mitral disease was present in 45% of the cases. Mixed mitral and aortic disease were present in 49% whereas 6% of patients had mitral, aortic and tricuspid disease. Most patients had New York Heart Association (NYHA) functional class I heart failure (HF) (62%) and 11% had class III HF. None of them had class IV HF. Atrial fibrillation was present in 28% of the individuals and 20% had had a stroke (**Table 1**).

Serum levels of all evaluated soluble factors were higher among clinical RHD patients, as compared to latent RHD patients ($p<0.005$) (**Figure 1**). When compared to healthy individuals, soluble factors were also higher in clinical RHD patients ($p<0.005$), except for IL-6, IL-7, IL-13 and IL-15. (**Figure 2**).

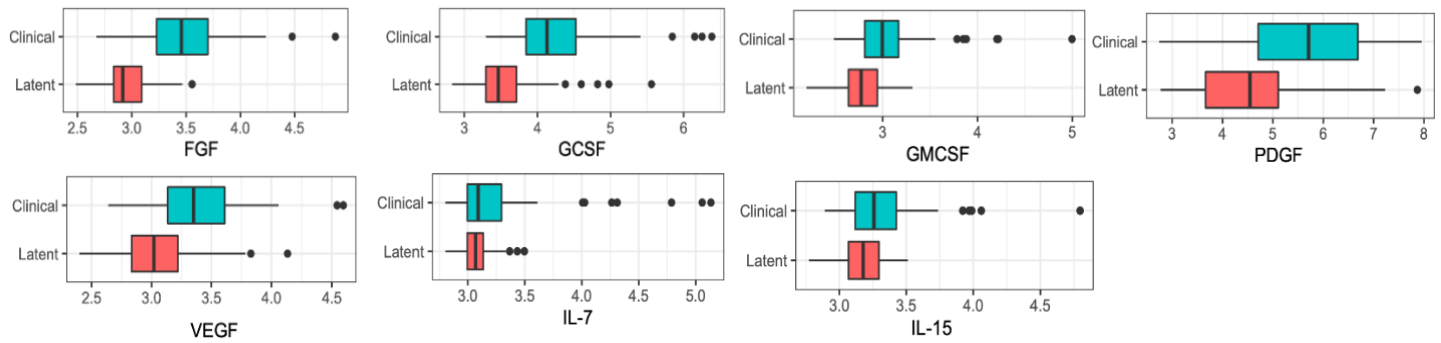
Diagnosis	N (females in %)
Clinical Rheumatic Heart Disease	100 (82)
Latent Rheumatic Heart Disease	77 (65)
Borderline	60
Definite	17
Normal	35 (60)
Age	Median (IQR)
Clinical Rheumatic Heart Disease	43 (33-51)
Latent Rheumatic Heart Disease	15 (13-16)
Normal	13 (9-15)
Valvular Lesions in Clinical RHD Patients (N=100)	N
Mitral Disease	100
Stable	32
Required percutaneous or surgical valve intervention	68
Isolated Mitral Disease	45
Mitral and Aortic Disease	49
Mitral, Aortic and Tricuspid Disease	6
NYHA Functional Class in Clinical RHD Patients (N=100)	N
I	62
II	27
III	11

Table 1:

Clinical features of the studied population.



Growth Factors



Cytokines

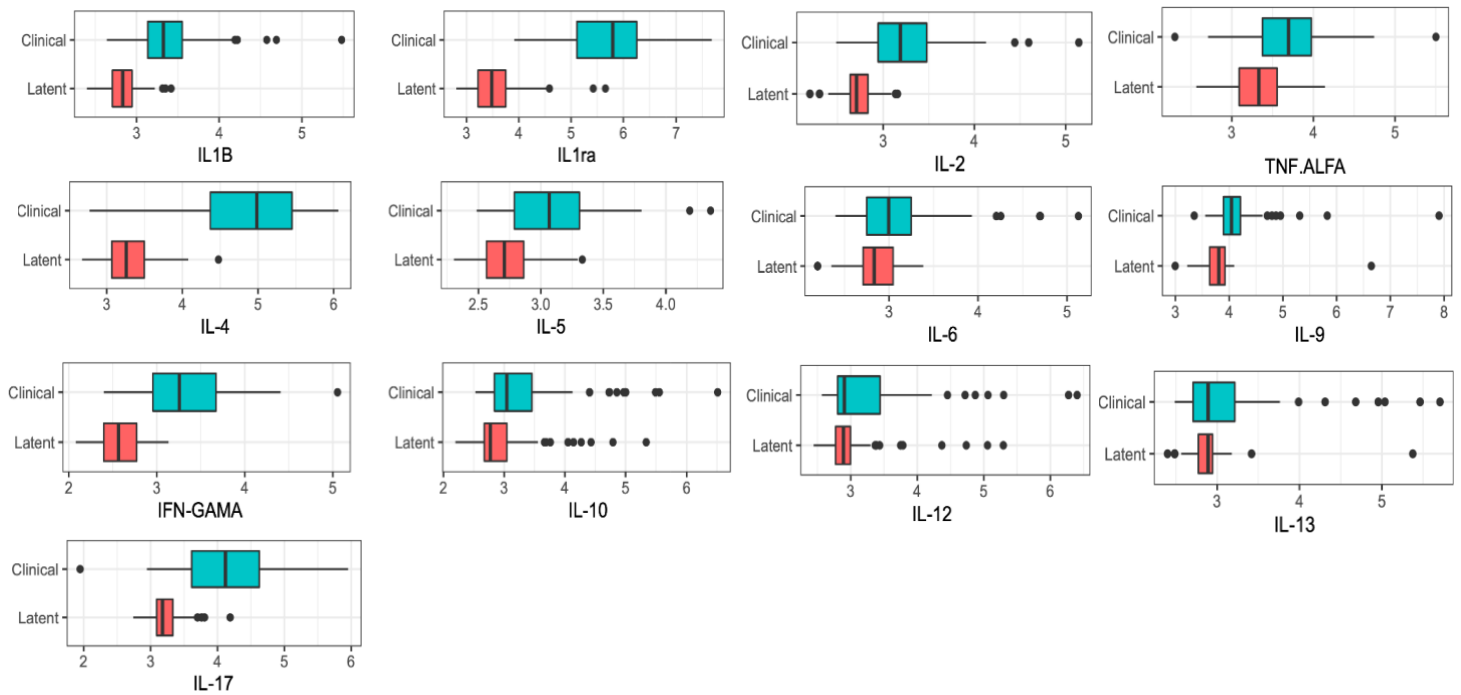
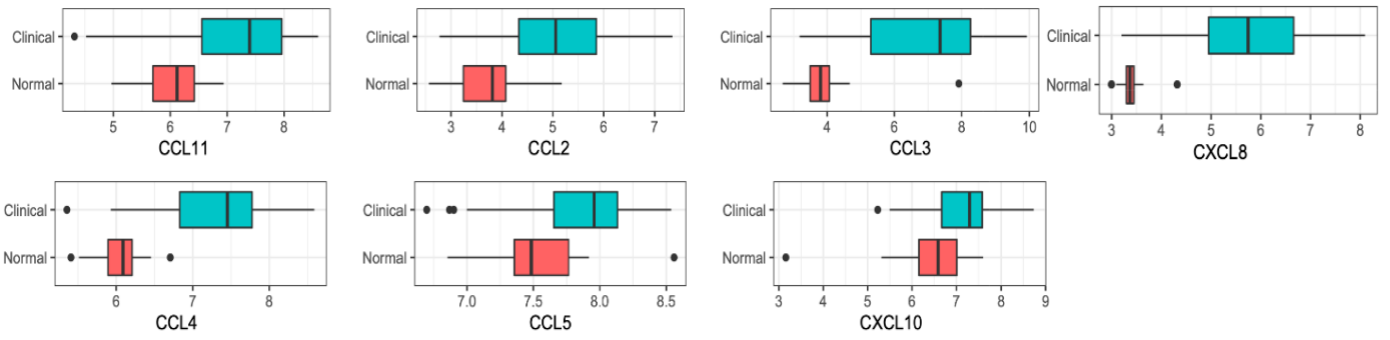
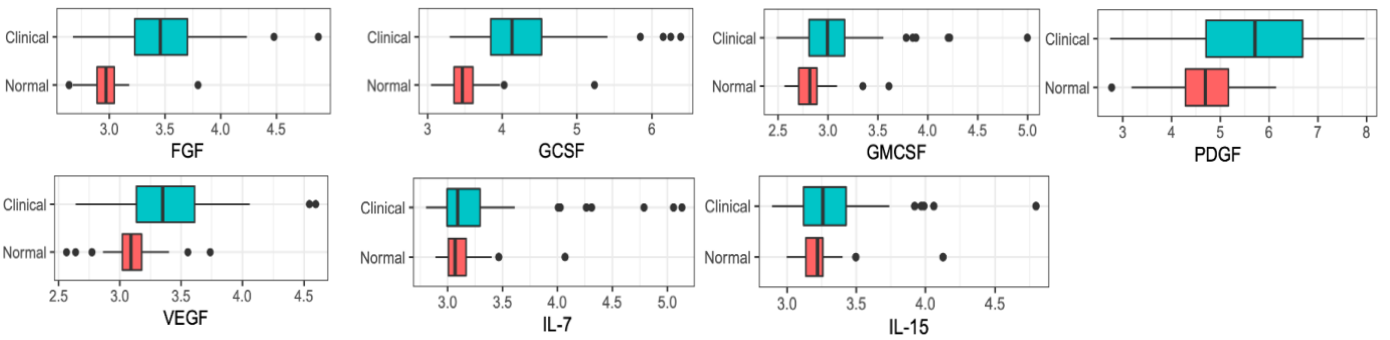


Figure 1. Serum levels of all evaluated soluble factors comparing between clinical and latent RHD patients. Results are presented as median and interquartile intervals, with outliers shown. CCL:chemokine (C-C motif) ligand. CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand. FGF: Fibroblast Growth Factor. GCSF: Granulocyte colony-stimulating factor. GMCSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. PDGF: Platelet-derived growth factor. VEGF: Vascular endothelial growth factor. IL: Interleukin. IL1ra: Interleukin-1 receptor antagonist. TNF: Tumor necrosis factor. INF: Interferon.



Growth Factors



Cytokines

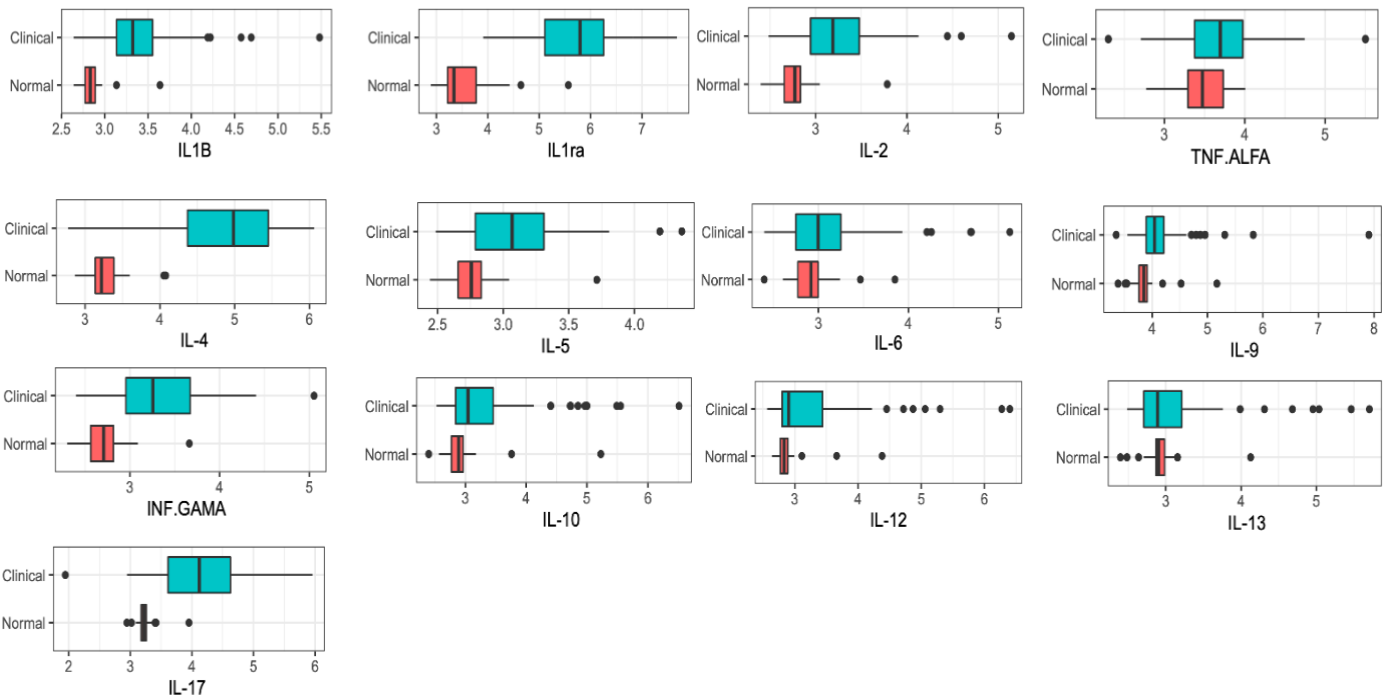


Figure 2. Serum levels of all evaluated soluble factors comparing between clinical RHD and patients without heart disease. Results are presented as median and interquartile intervals, with outliers shown. CCL:chemokine (C-C motif) ligand. CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand. FGF: Fibroblast Growth Factor. GCSF: Granulocyte colony-stimulating factor. GMCSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. PDGF: Platelet-derived growth factor. VEGF: Vascular endothelial growth factor. IL: Interleukin. IL1ra: Interleukin-1 receptor antagonist. TNF: Tumor necrosis factor. INF: Interferon.

The logistic model via lasso showed that levels of CCL5, CXCL8, IL1ra, IL4, IL9 and PDGF were able to differentiate between patients with clinical and latent RHD with 100% sensitivity and specificity (**Figures 3A and 3B on the left**). Amongst these factors, IL-4, IL-8 and IL-1RA showed the strongest ability to segregate the groups (**Figure 3A on the left**). **Figure 3C** shows the correlation indexes, distribution and dispersion graphics for these six variables in patients with latent RHD and manifested disease showing a stronger correlation between IL-8 and IL-1RA, IL-4 and IL-8, IL-4 and IL-1RA.

When clinical RHD and normal individuals were compared, IL-8, G.CSF, IL-15, IL1RA, IL-4 and IL-7 remained in the final model with 100% power to discriminate between the two groups (**Figure 3A on the right and 3B**). The area under the ROC curve was 1.0, equal to the one found in the prior analysis (latent RHD x clinical RHD) (**Figure 3B**). **Figure 3C** on the right shows the correlation indexes, distribution and dispersion graphics for these six variables in normal individuals and in patients with manifested RHD showing a stronger correlation between G-CSF and IL-8, IL-8 and IL-1RA, G.CSF and IL-7.

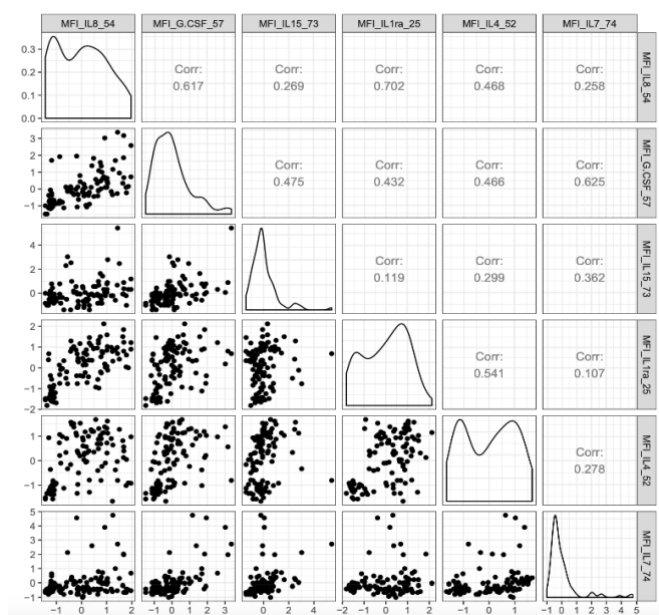
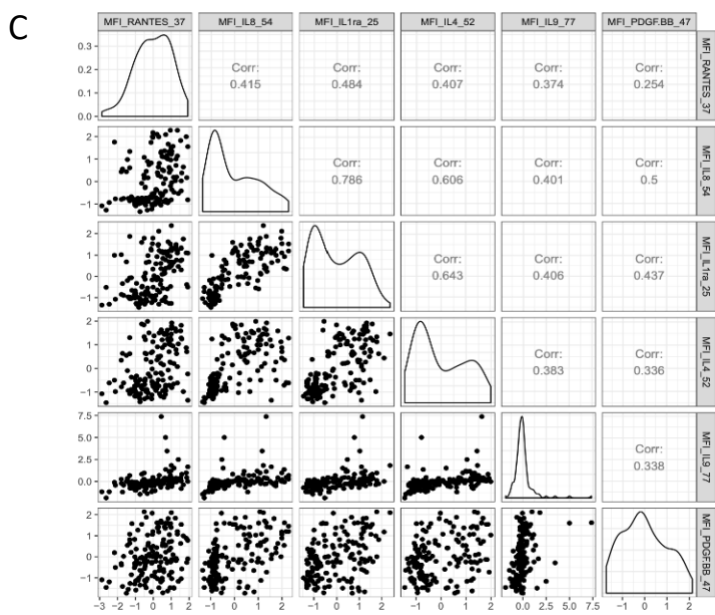
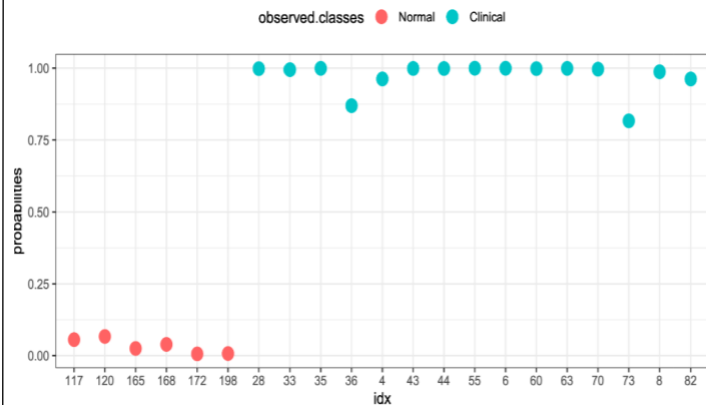
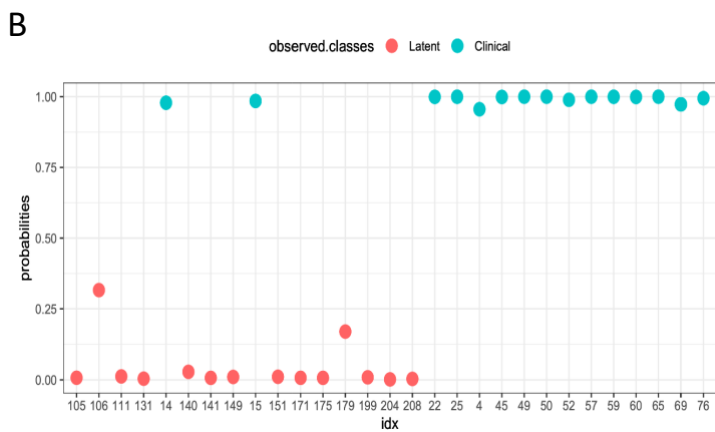
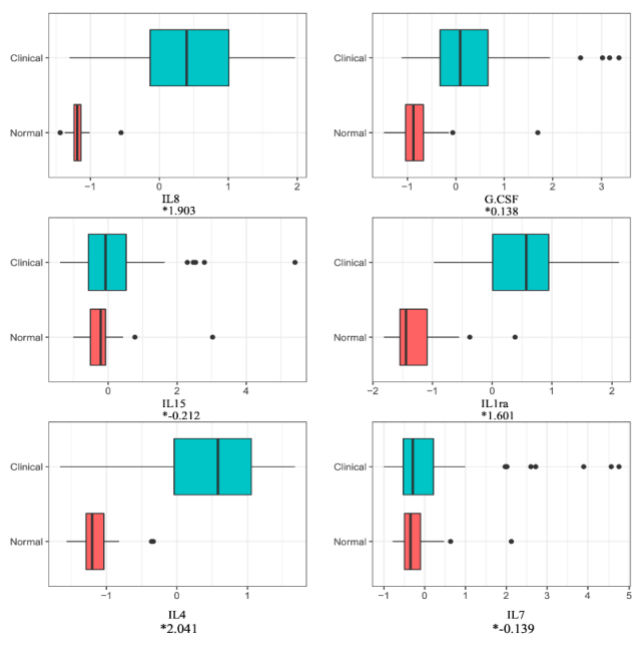
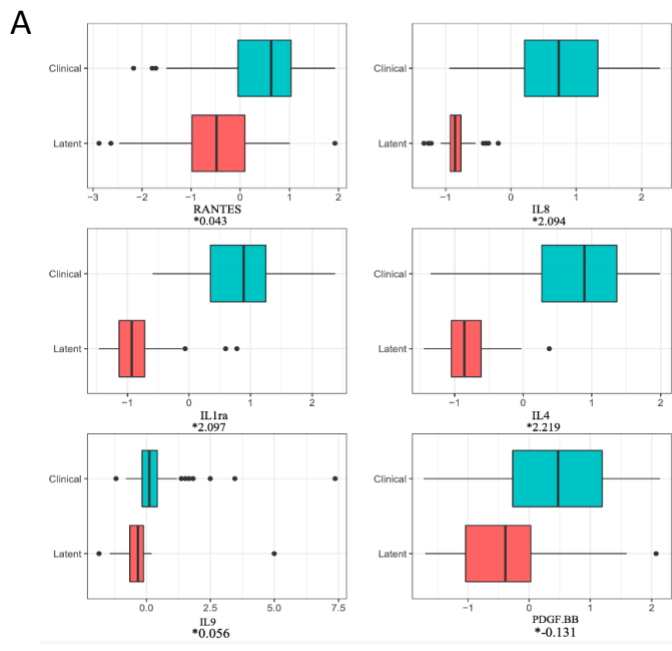


Figure 3: Analysis of soluble factors in healthy, latent RHD and patent RHD patients. Results of the latent x clinical RHD analysis are on the left and results of the normal x clinical RHD analysis are on the right. [Figure 3A](#) shows the remaining variables in the final model via lasso. These variables were the best association that could additionally and independently predict the presence of clinical RHD. [Figure 3B](#) Plot to demonstrate the ability of the models to differentiate clinical RHD individuals from latent RHD and normal patients. In the x axis, each “idx” identifies an individual in the database. Only 20% of individuals are displayed in the graphics because they represent the actual test data in the model, the other 80% of data was used as training samples to build the model. [Figure 3C](#): shows the correlation, distribution and dispersion graphics for the variables in the figure 2A. *Estimated s0coefficients in the final model.

Polymorphisms

Genotypes and allele frequencies are shown in Table 2. IL-23 and TNF results were not shown since the polymorphisms were not in Hardy-Weinberg equilibrium. Also, p value is only shown for the comparison between clinical and latent RHD patients because they were the patients who were actually exposed to the disease. Genotypes and allele frequencies for *IL2* were significantly different between groups. In the latent RHD group, more patients were homozygote for the A allele in the *IL2* gene. For *IL4*, the T allele was more prevalent in latent RHD patients. Genotype differences were not significant of the other evaluated genes (Table 2). Logistic analysis via lasso pointed to a set of genotypes that emerged as being associated with clinical RHD when clinical RHD individuals were compared with latent RHD patients. They corresponded to specific genotypes in *IL6*, *IL10*, *IL2*, and *IL4* that, when present in association in an individual could predict the presence of clinical RHD with an area under the ROC curve of 0.657 (**Table 3A**). When clinical RHD individuals were compared with healthy, *IL17*, *IL2* and *IL4* genotypes were associated with clinical RHD with an area under the curve of 0.8 (**Table 3B**). Table 3 shows the genotypes that in association can predict the presence of clinical RHD.

Genes and Genotypes	Clinical RHD (n=100)	Latent RHD (n= 77)	p value	Normal (n=35)
<i>IL2</i>				
Genotypes				
AA	54 (54%)	55 (72%)	0.005	18 (51%)
CC	1 (1%)	4 (5%)		3 (9%)
CA	45 (45%)	18 (23%)		14 (40%)
Alleles				
C + (CC/CA)	46 (46%)	22 (29%)	0.020	50 (71%)
C – (AA)	54 (54%)	55 (71%)		20 (29%)
<i>IL4</i>				
Genotypes				
CC	45 (45%)	22 (28%)	0.081	8 (23%)
TT	17 (17%)	16 (21%)		5 (14%)
CT	38 (38%)	39 (51%)		22 (63%)
Alleles				
T+ (CT/TT)	55 (55%)	55 (71%)	0.029	38 (54%)
T – (CC)	45 (45%)	22 (29%)		32 (46%)
<i>IL6</i>				
Genotypes				
CC	8 (8%)	2 (3%)	0.193	1 (3%)
GG	57 (57%)	41 (53%)		21 (60%)
CG	35 (35%)	34 (44%)		13 (37%)
Alleles				
G+ (CG/GG)	92 (92%)	75 (97%)	0.190	15 (21%)
G – (CC)	8 (8%)	2 (3%)		55 (79%)
<i>IL10</i>				
Genotypes				
CC	16 (16%)	6 (8%)	0.245	5 (14%)
TT	39 (39%)	31(40%)		16 (46%)
TC	45 (45%)	40 (52%)		14 (40%)
Alleles				
T + (TT/CT)	84 (84%)	71(92%)	0.113	46 (66%)
T – (CC)	16 (16%)	6 (8%)		24 (34%)
<i>IL17</i>				
Genotypes				
AA	8 (8%)	4 (5%)	0.486	-
GG	62 (62%)	44 (57%)		26 (74%)
AG	30 (30%)	29 (38%)		9 (26%)
Alleles				
A+ (AG/AA)	38 (38%)	33 (43%)	0.539	9 (13%)
A - (GG)	62 (62%)	44 (57%)		61 (87%)

Table 2: Genotypes and allelic frequencies for the analyzed polymorphisms. *TNF* and *IL23* frequencies were not on Hardy-Weinberg equilibrium and thus were not shown.

Genome	Coefficient (s0)
A. Latent x Clinical RHD	
<i>IL6</i> GG+CG	-0.646
<i>IL10</i> CT+TT	-0.398
<i>IL2</i> CA+CC	0.600
<i>IL2</i> CA+AA	1.246
<i>IL4</i> CC	0.032
B. Normal x Clinical RHD	
<i>IL17</i> GG+AG	-0.483
<i>IL2</i> CA+AA	1.150
<i>IL4</i> CC	0.070

Table 3: Genotypes associated with clinical RHD after the logistic analysis. The presence of these genotypes, in association, in an individual of our sample of patients, could predict clinical RHD with moderate to high sensitivity and specificity (area under the ROC curve 0.657 in relation to latent RHD and 0.800 in relation to normal subjects). The s0 coefficient represents the magnitude of impact of each genotype in the patient being classified as having clinical RHD.

Discussion

In this study we evaluated serum levels of 27 soluble factors, and the presence of polymorphisms in 7 different genes that encode important cytokines of the immune response related to RHD. Regarding soluble factors, we observed that serum levels of almost all cytokines were higher in patients with clinical RHD. Also, levels of CCL5, CXCL8, IL1RA, IL4, IL9 and PDGF could predict with 100% sensitivity and specificity if a patient had clinical or latent RHD, and levels of IL-8, G.CSF, IL-15, IL1RA, IL-4 and IL-7 could predict with 100% sensitivity and specificity whether a patient had clinical RHD or no heart disease. Regarding polymorphism analysis, our data showed that *IL4* and *IL2* gene polymorphisms were associated with the disease. Unbiased combined genotypic analysis showed that the presence of the set of genomes for *IL6*, *IL10*, *IL2*, and *IL4* in an individual, could predict clinical RHD with an area under the ROC curve of 0.657 comparing clinical and latent patients. Moreover, the combined set of genomes for *IL17*, *IL2* and *IL4*, when present in an individual, could predict clinical RHD with an area under the ROC curve of 0.800 in a sample of clinical RHD and normal patients. Thus, our data show that soluble factors and genotypes can predict, with high precision, if an individual is likely to maintain latent disease or develop clinical RHD.

Serum levels of all the evaluated soluble factors were higher in clinical RHD patients than in latent RHD individuals, demonstrating a more activated immune response in those with established symptomatic disease. The difference in the median age of both populations cannot solely explain this result since, although higher in RHD, the magnitude of the difference would likely not influence serum levels of most soluble factors measured (23). In fact, growth factors, which were increased in the older group in this work, usually even decrease with aging - granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF), and monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) are some examples. (23)

Increased levels of IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8 and TNF have been found in RHD patients as compared to healthy individuals (15). This was also observed in the present study. In addition, our study showed that the levels of these molecules are also higher in clinical RHD patients when compared with latent RHD. Importantly, using serum levels of CCL5, IL-8, IL-1RA, IL-4, IL-9 and PDGF in association allowed to more precisely determine the probability of a patient having clinical RHD or latent RHD and serum levels of IL-8, G-CSF, IL-15, IL-1RA, IL-4 and IL-7 is best to determine the probability of a patient having clinical RHD or being disease free. In both cases, IL-4, IL-8 e IL-1RA had the greatest impact in predicting the presence clinical RHD (higher s_0 coefficients). The association of these factors allows to discriminate the groups, with 100% accuracy. This strongly suggests that plasma levels of these factors, which presents a quick and non-invasive measure, can be studied as predictors of development of clinical RHD, which may have impact to guide clinical management.

The IL-4 cytokine had an important association with clinical RHD and the presence of the C allele in the *IL4* gene polymorphic region had a similar effect though in a lesser magnitude than the soluble cytokine. In the *IL4* rs2243250 polymorphism, the C allele is associated with lower transcriptional activity both in vitro and in vivo (24). In this study, the C allele, associated with lower IL-4 transcriptional activity, was associated with clinical RHD. The fact that this polymorphism is associated with low phenotypic expression of IL-4 in other models, and that we found high levels of this cytokine in RHD is an apparent discrepancy. However, it is important to note that factors other than solely the gene polymorphism influence the expression of a given cytokine, such as epigenetic factors, for example (25). While *IL4* functional polymorphism was not directly associated with phenotypic expression of IL-4 here, this does not invalidate the use of the gene polymorphism as a marker. IL-4 is a central cytokine of Th2 lymphocytes, and regulates humoral immune response (26). Acting on T cells and

macrophages, IL-4 stimulates tissue repair and fibrosis thus being an anti-inflammatory molecule. Studies have shown that in the heart valves, IL-4 producing cells are more present in less inflamed regions (11, 15). In B cells, IL-4 stimulates the production of IgE antibodies participating in allergic reactions. Thus, in addition to being a strong predictor of RHD, high expression of IL-4 may be associated with pathology of RHD.

While the levels of IL-2 did not segregate the groups, the *IL2* polymorphism was associated with clinical RHD in comparison to both latent RHD and normal individuals. Previous studies showed that IL-2 is produced when the T cell is activated by the streptococcal antigen presented by MHC molecules (26). IL-2 is responsible for the expansion of antigen specific T cell clones including the development of memory cells, which can remain for months or years in the circulation ready to respond to new exposures to the streptococcus(26). IL-2 also contributes to the maintenance of peripheral T-cell tolerance and the absence of this molecule is implicated in autoimmunity(27). Our data showed that the presence of a CA and AA genotypes had the greatest association with clinical RHD. Similar results were found in patients with multiple sclerosis, another disease related to autoimmunity (28). In vitro, using cells from healthy donors, the A allele leads to significantly less production of IL-2 than the C allele (29). In vivo, however, results conflict, suggesting that there may be additional factors mediating the relation of the A and C alleles with IL-2 production in diseases (28). A theory that could explain this phenomenon is that patients with CA and AA genomes would naturally produce less IL-2 making them susceptible to autoimmunity like in RHD. Once the disease is established the immune system manages to trigger more production of IL-2 through unknown mechanisms in an attempt to elevate serum levels of this cytokine and increase T-cell tolerance. IN accordance with this hypothesis, we verified that serum levels of IL-2 are in fact higher in RHD patients.

In our study involving a Brazilian population, we did not find any association of RHD with the *TNF* polymorphism at position -238 (rs361525 G/T), as was previously described in individuals of Mexican origin (30, 31), nor with the *IL10* polymorphism as also previously described (13). Our results resemble the ones found in the south Indian population and in a metanalysis that also did not find any association between RHD and *TNF* polymorphism at position -238. (30, 32). In addition, the other analyzed polymorphisms were not associated with the disease in its different clinical forms.

Genetic associations have not been consistent among studies of RHD, as it can be influenced by the genetic background of the different populations (25). Pathophysiology is not yet precisely understood, and most studies look for genes that could be somewhat involved with current theories of disease development. Future research on the genetics of RHD should focus on larger populations of various backgrounds and use wide association technologies to get to more robust and reliable results(15) .

Limitations:

This study has limitations. We highlight that latent RHD is still not a fully understood disease, that the condition has an uncertain prognosis and that the benefits of interventions to slow disease progression are unclear. Long term follow-up studies are lacking and should be carried out to answer these questions. Also, borderline RHD have been increasingly considered by specialists as only a physiologic variant of the normal heart, therefore our results should be interpreted with caution since most patients in our sample of latent RHD individuals had borderline disease. In the present study, controls were not matched with clinical RHD patients, only with latent RHD individuals and we still do not have long term follow-up data on the evaluated patients. All the aforementioned aspects could bias our conclusions.

Conclusion:

This logistic analysis revealed that serum levels of CCL5, IL-8, IL-1RA, IL-4, IL-9 and PDGF could predict clinical RHD in a sample of patients with clinical and latent disease with 100% sensitivity and specificity. Levels of IL-8, GCSF, IL-15, IL-1RA, IL-4 and IL-7 could do the same in a sample of clinical RHD and normal patients. In both cases, IL-4, IL-8 e IL-1RA had the greatest impact in predicting the presence clinical RHD (higher s_0 coefficients).

Importantly, IL-4 emerges as a phenotypic and genotypic marker to discriminate latent and clinical disease and predict the development of the clinical form. Thus, the use of soluble IL-4 measurement, as well as IL4 genotyping provide critical information and may be used to guide clinical management of RHD in Brazil. This merits studies in other populations to confirm its validity as general marker of RHD susceptibility.

References:

1. Watkins DA, Johnson CO, Colquhoun SM, Karthikeyan G, Beaton A, Bukhman G, et al. Global, Regional, and National Burden of Rheumatic Heart Disease, 1990-2015. *The New England journal of medicine*. 2017;377(8):713-22.
2. Beaton A, Okello E, Aliku T, Lubega S, Lwabi P, Mondo C, et al. Latent rheumatic heart disease: outcomes 2 years after echocardiographic detection. *Pediatr Cardiol*. 2014;35(7):1259-67.
3. Bertaina G, Rouchon B, Huon B, Guillot N, Robillard C, Noel B, et al. Outcomes of borderline rheumatic heart disease: A prospective cohort study. *Int J Cardiol*. 2017;228:661-5.
4. Engelman D, Wheaton GR, Mataika RL, Kado JH, Colquhoun SM, Remenyi B, et al. Screening-detected rheumatic heart disease can progress to severe disease. *Heart Asia*. 2016;8(2):67-73.
5. Mirabel M, Fauchier T, Bacquelin R, Tafflet M, Germain A, Robillard C, et al. Echocardiography screening to detect rheumatic heart disease: A cohort study of schoolchildren in French Pacific Islands. *Int J Cardiol*. 2015;188:89-95.
6. Nunes MCP, Sable C, Nascimento BR, Lima EM, da Silva JLP, Diamantino AC, et al. Simplified Echocardiography Screening Criteria for Diagnosing and Predicting Progression of Latent Rheumatic Heart Disease. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2019;12(2):e007928.
7. Carapetis JR, Beaton A, Cunningham MW, Guilherme L, Karthikeyan G, Mayosi BM, et al. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:15084.
8. Cunningham MW. Molecular mimicry, autoimmunity and infection in the pathogenesis of rheumatic fever. *International Congress Series*. 2006;1289(Supplement C):14-9.
9. Cunningham MW. Post-Streptococcal Autoimmune Sequelae: Rheumatic Fever and Beyond. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center
(c) The University of Oklahoma Health Sciences Center.; 2016.
10. 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.

11. Guilherme L, Cury P, Demarchi LM, Coelho V, Abel L, Lopez AP, et al. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *The American journal of pathology*. 2004;165(5):1583-91.
12. Guilherme L, de Barros SF, Kohler KF, Santos SR, Ferreira FM, Silva WR, et al. Rheumatic Heart Disease: Pathogenesis and Vaccine. *Curr Protein Pept Sci*. 2018;19(9):900-8.
13. Guilherme L, Kohler KF, Postol E, Kalil J. Genes, autoimmunity and pathogenesis of rheumatic heart disease. *Ann Pediatr Cardiol*. 2011;4(1):13-21.
14. Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, Jouven X. Rheumatic heart disease. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9819):953-64.
15. Martin WJ, Steer AC, Smeesters PR, Keeble J, Inouye M, Carapetis J, et al. Post-infectious group A streptococcal autoimmune syndromes and the heart. *Autoimmun Rev*. 2015;14(8):710-25.
16. Watkins DA, Beaton AZ, Carapetis JR, Karthikeyan G, Mayosi BM, Wyber R, et al. Rheumatic Heart Disease Worldwide: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(12):1397-416.
17. Alkmim MB, Figueira RM, Marcolino MS, Cardoso CS, Pena de Abreu M, Cunha LR, et al. Improving patient access to specialized health care: the Telehealth Network of Minas Gerais, Brazil. *Bulletin of the World Health Organization*. 2012;90(5):373-8.
18. Nascimento BR, Beaton AZ, Nunes MCP, Diamantino AC, Carmo GAL, Oliveira KKB, et al. Echocardiographic Prevalence of Rheumatic Heart Disease in Brazilian Schoolchildren: Data from the PROVAR Study. *International Journal of Cardiology*. 2016;219:439-45.
19. Nascimento BR, Sable C, Nunes MCP, Diamantino AC, Oliveira KKB, Oliveira CM, et al. Comparison Between Different Strategies of Rheumatic Heart Disease Echocardiographic Screening in Brazil: Data From the PROVAR (Rheumatic Valve Disease Screening Program) Study. *Journal of the American Heart Association*. 2018;7(4).
20. Santos J, Carmo G, Beaton AZ, Lourenco TV, Diamantino AC, Nunes M, et al. Challenges for the Implementation of the First Large-Scale Rheumatic Heart Disease Screening Program in Brazil: The PROVAR Study Experience. *Arq Bras Cardiol*. 2017;108(4):370-4.
21. 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;199(3):451-4.

22. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009;42(2):377-81.
23. Kim HO, Kim HS, Youn JC, Shin EC, Park S. Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. *J Transl Med.* 2011;9:113.
24. Nakashima H, Miyake K, Inoue Y, Shimizu S, Akahoshi M, Tanaka Y, et al. Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. *Genes Immun.* 2002;3(2):107-9.
25. 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;20(3):223-32.
26. Abbas AKL, Andrew H. *Basic Immunology: Functions And Disorders Of The Immune System.* . Philadelphia, Pa.: Saunders; 2011.
27. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(9):665-74.
28. Sayad A, Movafagh A. The association of -330 interleukin-2 gene polymorphism with its plasma concentration in Iranian multiple sclerosis patients. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:724653.
29. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation.* 2001;72(8):1444-50.
30. Shen Y-C, Yang T, Wan C, Wang T, Chen L, Wen F-Q. Tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and rheumatic heart disease risk: a meta-analysis. *International journal of cardiology.* 2013;168(3):2878-80.
31. Hernández-Pacheco G, Flores-Domínguez C, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Frago JM, Saul A, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with rheumatic heart disease. *J Autoimmun.* 2003;21(1):59-63.
32. Poomarimuthu M, Elango S, Solomon PR, Soundarapandian S, Mariakuttikan J. Lack of Association Between TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10 Gene Polymorphisms and Rheumatic Heart Disease in South Indian Population. *Fetal Pediatr Pathol.* 2018;37(5):309-18.
33. 63. 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:

executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(23):2440-92.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A CRC é uma doença de alta morbimortalidade que afeta principalmente países e populações socioeconomicamente desfavorecidas. A redução da incidência da doença para níveis irrisórios é um objetivo tangível para as próximas décadas, mas para isso é necessário um esforço global de pesquisa e de implementação dos resultados, que já vem ocorrendo nos últimos anos.

As profilaxias primária e secundária precisam ser bem implementadas, com melhoria nos registros do uso da penicilina para aumentar a aderência ao tratamento. Pesquisas sobre a fisiopatologia da doença devem cada vez mais se direcionarem para a busca de um marcador biológico que facilite o diagnóstico e ajude na definição prognóstica. Além disso, uma vez compreendendo melhor a gênese da doença, pode-se considerar a possibilidade de tratamentos alternativos que impeçam a progressão da cardiopatia, como o desenvolvimento de imunomoduladores específicos.

No presente estudo, percebemos claramente que os indivíduos com cardiopatia latente, em conjunto, são uma categoria independente, diferentes dos indivíduos clinicamente doentes em termos imunológicos. A presença do alelo A no gene de *IL2* parece influenciar no risco de desenvolvimento de doença clínica. A *IL-4* teve associação com doença mais grave. Sabe-se que as regiões mais doentes das valvas são as que apresentam menos *IL-4*.

A CRL é uma entidade relativamente recente que vem sendo amplamente estudada após o surgimento e ampla disponibilidade do ecocardiograma. Essa ainda é uma categoria com diferentes perfis de gravidade e estudos de acompanhamento vão esclarecer melhor sua história natural e o papel da penicilina na progressão das valvopatias.

REFERÊNCIAS

1. Watkins DA, Johnson CO, Colquhoun SM, Karthikeyan G, Beaton A, Bukhman G, et al. Global, Regional, and National Burden of Rheumatic Heart Disease, 1990-2015. *The New England journal of medicine*. 2017;377(8):713-22.
2. Azevedo PM, Pereira RR, Guilherme L. Understanding rheumatic fever. *Rheumatology international*. 2012;32(5):1113-20.
3. Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, Jouven X. Rheumatic heart disease. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9819):953-64.
4. Mocumbi AO. Rheumatic heart disease in Africa: is there a role for genetic studies? *Cardiovascular journal of Africa*. 2015;26(2 Suppl 1):S21-6.
5. [Brazilian guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of rheumatic fever]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2009;93(3 Suppl 4):3-18.
6. Bright PD, Mayosi BM, Martin WJ. An immunological perspective on rheumatic heart disease pathogenesis: more questions than answers. *Heart (British Cardiac Society)*. 2016;102(19):1527-32.
7. Marijon E, Celermajer DS, Jouven X. Rheumatic Heart Disease - An Iceberg in Tropical Waters. *The New England journal of medicine*. 2017;377(8):780-1.
8. Remenyi B, Wilson N, Steer A, Ferreira B, Kado J, Kumar K, et al. World Heart Federation criteria for echocardiographic diagnosis of rheumatic heart disease--an evidence-based guideline. *Nature reviews Cardiology*. 2012;9(5):297-309.
9. Beaton A, Aliku T, Dewyer A, Jacobs M, Jiang J, Longenecker CT, et al. Latent Rheumatic Heart Disease: Identifying the Children at Highest Risk of Unfavorable Outcome. *Circulation*. 2017;136(23):2233-44.
10. Nunes MCP, Sable C, Nascimento BR, Lima EM, da Silva JLP, Diamantino AC, et al. Simplified Echocardiography Screening Criteria for Diagnosing and Predicting Progression of Latent Rheumatic Heart Disease. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2019;12(2):e007928.
11. Determining the Impact of Penicillin in Latent RHD: The GOAL Trial (GOAL), NCT03346525. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03346525>.
12. Rémond M, Atkinson D, White A, Brown A, Carapetis J, Remenyi B, et al. Are minor echocardiographic changes associated with an increased risk of acute rheumatic fever or progression to rheumatic heart disease? *International Journal of Cardiology*. 2015;198:117-22.

13. Beaton A, Aliku T, Dewyer A, Jacobs M, Jiang J, Longenecker CT, et al. Latent Rheumatic Heart Disease: Identifying the Children at Highest Risk of Unfavorable Outcome. *Circulation*. 2017.
14. Santos J, Carmo G, Beaton AZ, Lourenco TV, Diamantino AC, Nunes M, et al. Challenges for the Implementation of the First Large-Scale Rheumatic Heart Disease Screening Program in Brazil: The PROVAR Study Experience. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2017;108(4):370-4.
15. Carapetis JR, Beaton A, Cunningham MW, Guilherme L, Karthikeyan G, Mayosi BM, et al. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:15084.
16. Watkins DA, Beaton AZ, Carapetis JR, Karthikeyan G, Mayosi BM, Wyber R, et al. Rheumatic Heart Disease Worldwide: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(12):1397-416.
17. Ribeiro GS, Tartof SY, Oliveira DW, Guedes AC, Reis MG, Riley LW, et al. Surgery for valvular heart disease: a population-based study in a Brazilian urban center. *PLoS One*. 2012;7(5):e37855.
18. de Aquino Xavier RM, Azevedo VMP, Godoy PH, Migowski A, Ribeiro ALP, Chaves RBM, et al. Medium-term outcomes of 78,808 patients after heart valve surgery in a middle-income country: a nationwide population-based study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017;17(1):302.
19. Ribeiro AL, Duncan BB, Brant LC, Lotufo PA, Mill JG, Barreto SM. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. *Circulation*. 2016;133(4):422-33.
20. Engel ME, Haileamlak A, Zuhlke L, Lemmer CE, Nkepu S, van de Wall M, et al. Prevalence of rheumatic heart disease in 4720 asymptomatic scholars from South Africa and Ethiopia. *Heart (British Cardiac Society)*. 2015;101(17):1389-94.
21. Marijon E, Ou P, Celermajer DS, Ferreira B, Mocumbi AO, Jani D, et al. Prevalence of rheumatic heart disease detected by echocardiographic screening. *The New England journal of medicine*. 2007;357(5):470-6.
22. Mirabel M, Tafflet M, Noel B, Parks T, Braunstein C, Rouchon B, et al. Prevalence of Rheumatic Heart Disease in the Pacific: From Subclinical to Symptomatic Heart Valve Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(12):1500-2.
23. Paar JA, Berrios NM, Rose JD, Caceres M, Pena R, Perez W, et al. Prevalence of rheumatic heart disease in children and young adults in Nicaragua. *Am J Cardiol*. 2010;105(12):1809-14.

24. 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;219:439-45.
25. Guilherme L, de Barros SF, Kohler KF, Santos SR, Ferreira FM, Silva WR, et al. Rheumatic Heart Disease: Pathogenesis and Vaccine. *Curr Protein Pept Sci.* 2018;19(9):900-8.
26. Guilherme L, Kohler KF, Postol E, Kalil J. Genes, autoimmunity and pathogenesis of rheumatic heart disease. *Ann Pediatr Cardiol.* 2011;4(1):13-21.
27. Barbeian Lectures ON THE VARIOUS MANIFESTATIONS OF THE RHEUMATIC STATE AS EXEMPLIFIED IN CHILDHOOD AND EARLY LIFE. *The Lancet.* 1889;133(3426):821-7.
28. Cunningham MW. Post-Streptococcal Autoimmune Sequelae: Rheumatic Fever and Beyond. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations.* Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center
(c) The University of Oklahoma Health Sciences Center.; 2016.
29. Cunningham MW. Molecular mimicry, autoimmunity and infection in the pathogenesis of rheumatic fever. *International Congress Series.* 2006;1289(Supplement C):14-9.
30. Gao G, Xuan C, Yang Q, Liu XC, Liu ZG, He GW. Identification of altered plasma proteins by proteomic study in valvular heart diseases and the potential clinical significance. *PLoS One.* 2013;8(8):e72111.
31. Fae KC, Diefenbach da Silva D, Bilate AM, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Kiss MH, et al. PDIA3, HSPA5 and vimentin, proteins identified by 2-DE in the valvular tissue, are the target antigens of peripheral and heart infiltrating T cells from chronic rheumatic heart disease patients. *J Autoimmun.* 2008;31(2):136-41.
32. Smeesters PR, Vergison A, Campos D, de Aguiar E, Miendje Deyi VY, Van Melderen L. Differences between Belgian and Brazilian group A *Streptococcus* epidemiologic landscape. *PLoS One.* 2006;1:e10.
33. Bessen DE, Carapetis JR, Beall B, Katz R, Hibble M, Currie BJ, et al. Contrasting molecular epidemiology of group A streptococci causing tropical and nontropical infections of the skin and throat. *J Infect Dis.* 2000;182(4):1109-16.

34. 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.
35. Bryant PA, Robins-Browne R, Carapetis JR, Curtis N. Some of the people, some of the time: susceptibility to acute rheumatic fever. *Circulation*. 2009;119(5):742-53.
36. Parks T, Mirabel MM, Kado J, Auckland K, Nowak J, Rautanen A, et al. Association between a common immunoglobulin heavy chain allele and rheumatic heart disease risk in Oceania. 2017;8:14946.
37. Martins TB, Hoffman JL, Augustine NH, Phansalkar AR, Fischetti VA, Zabriskie JB, et al. Comprehensive analysis of antibody responses to streptococcal and tissue antigens in patients with acute rheumatic fever. *Int Immunol*. 2008;20(3):445-52.
38. Tandon R, Sharma M, Chandrashekar Y, Kotb M, Yacoub MH, Narula J. Revisiting the pathogenesis of rheumatic fever and carditis. *Nature reviews Cardiology*. 2013;10(3):171-7.
39. Silva VR. Efeito da Valvoplastia Mitral Percutânea por Balão no Nível de Citocinas em Pacientes com Estenose Mitral. : Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2019
40. Fae 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;36(4):800-11.
41. Guilherme L, Cury P, Demarchi LM, Coelho V, Abel L, Lopez AP, et al. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *The American journal of pathology*. 2004;165(5):1583-91.
42. 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;62(1):78-83.
43. Abbas AKL, Andrew H. *Basic Immunology: Functions And Disorders Of The Immune System*. . Philadelphia, Pa.: Saunders; 2011.
44. Martin WJ, Steer AC, Smeesters PR, Keeble J, Inouye M, Carapetis J, et al. Post-infectious group A streptococcal autoimmune syndromes and the heart. *Autoimmun Rev*. 2015;14(8):710-25.
45. Miller LC, Gray ED, Mansour M, Abdin ZH, Kamel R, Zaher S, et al. Cytokines and immunoglobulin in rheumatic heart disease: production by blood and tonsillar mononuclear cells. *J Rheumatol*. 1989;16(11):1436-42.

46. Gewitz M. The Jones Criteria for the Diagnosis of Acute Rheumatic Fever: Updated but Not Abandoned. *J Pediatr*. 2018;198:7-8.
47. 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;131(20):1806-18.
48. Carapetis JR, Currie BJ. Rheumatic fever in a high incidence population: the importance of monoarthritis and low grade fever. *Arch Dis Child*. 2001;85(3):223-7.
49. Remenyi B, ElGuindy A, Smith SC, Jr., Yacoub M, Holmes DR, Jr. Valvular aspects of rheumatic heart disease. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10025):1335-46.
50. Sultan FA, Moustafa SE, Tajik J, Warsame T, Emani U, Alharthi M, et al. Rheumatic tricuspid valve disease: an evidence-based systematic overview. *J Heart Valve Dis*. 2010;19(3):374-82.
51. Zuhlke L, Engel ME, Karthikeyan G, Rangarajan S, Mackie P, Cupido B, et al. Characteristics, complications, and gaps in evidence-based interventions in rheumatic heart disease: the Global Rheumatic Heart Disease Registry (the REMEDY study). *Eur Heart J*. 2015;36(18):1115-22a.
52. Nunes MC, Nascimento BR, Lodi-Junqueira L, Tan TC, Athayde GR, Hung J. Update on percutaneous mitral commissurotomy. *Heart (British Cardiac Society)*. 2016;102(7):500-7.
53. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Fleisher LA, et al. 2017 AHA/ACC Focused Update of the 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 Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2017;135(25):e1159-e95.
54. Bechtluft BMF. Progressão da Cardiopatia Reumática Latente Detectada ao Ecocardiograma de Rastreamento. : Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2019.
55. Beaton A, Okello E, Aliku T, Lubega S, Lwabi P, Mondo C, et al. Latent rheumatic heart disease: outcomes 2 years after echocardiographic detection. *Pediatr Cardiol*. 2014;35(7):1259-67.
56. Bertaina G, Rouchon B, Huon B, Guillot N, Robillard C, Noel B, et al. Outcomes of borderline rheumatic heart disease: A prospective cohort study. *Int J Cardiol*. 2017;228:661-5.

57. Bhaya M, Beniwal R, Panwar S, Panwar RB. Two years of follow-up validates the echocardiographic criteria for the diagnosis and screening of rheumatic heart disease in asymptomatic populations. *Echocardiography*. 2011;28(9):929-33.
58. Engelman D, Wheaton GR, Mataika RL, Kado JH, Colquhoun SM, Remenyi B, et al. Screening-detected rheumatic heart disease can progress to severe disease. *Heart Asia*. 2016;8(2):67-73.
59. Mirabel M, Fauchier T, Bacquelin R, Tafflet M, Germain A, Robillard C, et al. Echocardiography screening to detect rheumatic heart disease: A cohort study of schoolchildren in French Pacific Islands. *Int J Cardiol*. 2015;188:89-95.
60. Remond M, Atkinson D, White A, Brown A, Carapetis J, Remenyi B, et al. Are minor echocardiographic changes associated with an increased risk of acute rheumatic fever or progression to rheumatic heart disease? *Int J Cardiol*. 2015;198:117-22.
61. Saxena A, Ramakrishnan S, Roy A, Seth S, Krishnan A, Misra P, et al. Prevalence and outcome of subclinical rheumatic heart disease in India: the RHEUMATIC (Rheumatic Heart Echo Utilisation and Monitoring Actuarial Trends in Indian Children) study. *Heart (British Cardiac Society)*. 2011;97(24):2018-22.
62. Zühlke L, Engel ME, Lemmer CE, van de Wall M, Nkepu S, Meiring A, et al. The natural history of latent rheumatic heart disease in a 5 year follow-up study: a prospective observational study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2016;16:46.
63. 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: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(23):2440-92.
64. edited by Douglas L. Mann DPZPLROB, founding e, online editor Eugene B. Braunwald's heart disease : a textbook of cardiovascular medicine: Tenth edition. Philadelphia, PA : Elsevier/Saunders, [2015] ©2015; 2015.
65. Zühlke LJ, Karthikeyan G. Primary Prevention for Rheumatic Fever: Progress, Obstacles, and Opportunities. *Global Heart*. 2013;8(3):221-6.
66. Robertson KA, Volmink JA, Mayosi BM. Antibiotics for the primary prevention of acute rheumatic fever: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2005;5(1):11.
67. Fever WHOSGoR, Rheumatic Heart D, World Health O. Rheumatic fever and rheumatic heart disease : report of a WHO expert consultation, Geneva, 20 October - 1 November 2001. Geneva: World Health Organization; 2004.

68. Gandhi GD, Krishnamoorthy N, Motal UMA, Yacoub M. Towards developing a vaccine for rheumatic heart disease. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2017;2017(1):e201704.
69. Steer AC, Carapetis JR, Dale JB, Fraser JD, Good MF, Guilherme L, et al. Status of research and development of vaccines for *Streptococcus pyogenes*. *Vaccine*. 2016;34(26):2953-8.
70. Gerber MA, Baltimore RS, Eaton CB, Gewitz M, Rowley AH, Shulman ST, et al. Prevention of rheumatic fever and diagnosis and treatment of acute Streptococcal pharyngitis: a scientific statement from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, the Interdisciplinary Council on Functional Genomics and Translational Biology, and the Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*. 2009;119(11):1541-51.
71. Manyemba J, Mayosi BM. Penicillin for secondary prevention of rheumatic fever. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002(3):Cd002227.
72. Mota CC, Meira ZM, Graciano RN, Graciano FF, Araujo FD. Rheumatic Fever prevention program: long-term evolution and outcomes. *Front Pediatr*. 2014;2:141.
73. Tarasoutchi F, Montera MW, Ramos AIdO, Sampaio RO, Rosa VEE, Accorsi TAD, et al. Atualização das Diretrizes Brasileiras de Valvopatias: Abordagem das Lesões Anatomicamente Importantes. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2017;109:1-34.
74. Nascimento BR, Sable C, Nunes MCP, Diamantino AC, Oliveira KKB, Oliveira CM, et al. Comparison Between Different Strategies of Rheumatic Heart Disease Echocardiographic Screening in Brazil: Data From the PROVAR (Rheumatic Valve Disease Screening Program) Study. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(4).
75. Alkmim MB, Figueira RM, Marcolino MS, Cardoso CS, Pena de Abreu M, Cunha LR, et al. Improving patient access to specialized health care: the Telehealth Network of Minas Gerais, Brazil. *Bulletin of the World Health Organization*. 2012;90(5):373-8.
76. Nascimento BR, Beaton AZ, Nunes MCP, Diamantino AC, Carmo GAL, Oliveira KKB, et al. Echocardiographic Prevalence of Rheumatic Heart Disease in Brazilian Schoolchildren: Data from the PROVAR Study. *International Journal of Cardiology*. 2016;219:439-45.
77. Nascimento BR, Sable C, Nunes MCP, Diamantino AC, Oliveira KKB, Oliveira CM, et al. Comparison Between Different Strategies of Rheumatic Heart Disease Echocardiographic Screening in Brazil: Data From the PROVAR (Rheumatic Valve Disease Screening Program) Study. *Journal of the American Heart Association*. 2018;7(4).

78. 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;199(3):451-4.
79. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009;42(2):377-81.
80. Kim HO, Kim HS, Youn JC, Shin EC, Park S. Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. *J Transl Med.* 2011;9:113.
81. Nakashima H, Miyake K, Inoue Y, Shimizu S, Akahoshi M, Tanaka Y, et al. Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. *Genes Immun.* 2002;3(2):107-9.
82. 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;20(3):223-32.
83. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(9):665-74.
84. Sayad A, Movafagh A. The association of -330 interleukin-2 gene polymorphism with its plasma concentration in Iranian multiple sclerosis patients. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:724653.
85. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation.* 2001;72(8):1444-50.
86. Shen Y-C, Yang T, Wan C, Wang T, Chen L, Wen F-Q. Tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and rheumatic heart disease risk: a meta-analysis. *International journal of cardiology.* 2013;168(3):2878-80.
87. Hernández-Pacheco G, Flores-Domínguez C, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Fragoso JM, Saul A, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with rheumatic heart disease. *J Autoimmun.* 2003;21(1):59-63.
88. Poomarimuthu M, Elango S, Solomon PR, Soundarapandian S, Mariakuttikan J. Lack of Association Between TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10 Gene Polymorphisms and Rheumatic Heart Disease in South Indian Population. *Fetal Pediatr Pathol.* 2018;37(5):309-18.