

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical.

Vicente Rezende Silva

**EFEITO DA VALVOPLASTIA MITRAL PERCUTÂNEA POR BALÃO NO NÍVEL DE
CITOCINAS EM PACIENTES COM ESTENOSE MITRAL REUMÁTICA**

Belo Horizonte - MG

2019

Vicente Rezende Silva

**EFEITO DA VALVOPLASTIA MITRAL PERCUTÂNEA POR BALÃO NO NÍVEL DE
CITOCINAS EM PACIENTES COM ESTENOSE MITRAL REUMÁTICA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes

Coorientadora: Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra

BELO HORIZONTE

2019

Silva, Vicente Rezende.
SI586e Efeito da Valvoplastia Mitral Percutânea por Balão no Nível de
Citocinas em pacientes com Estenose Mitral Reumática [manuscrito]:
 subtítulo. / Vicente Rezende Silva. - - Belo Horizonte: 2019.
 50f.: il.
 Orientador (a): Maria do Carmo Pereira Nunes.
 Coorientador (a): Walderez Ornelas Dutra.
 Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
 Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
 Faculdade de Medicina.

1. Cardiopatia Reumática. 2. Estenose da Valva Mitral. 3.
 Valvuloplastia com Balão. 4. Citocinas. 5. Dissertações Acadêmicas. I.
 Nunes, Maria do Carmo Pereira. II. Dutra Walderez Ornelas. III.
 Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WG 141.5.C2



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO VICENTE REZENDE SILVA

Realizou-se, no dia 27 de junho de 2019, às 14:00 horas, sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada "EFEITO DA VALVOPLASTIA MITRAL PERCUTÂNEA COM BALÃO NO NÍVEL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM ESTENOSE MITRAL REUMÁTICA", apresentada por VICENTE REZENDE SILVA, número de registro 2017714989, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Maria do Carmo Pereira Nunes - Orientadora (UFMG), Profa. Walderez Ornelas Dutra – Coorientadora (UFMG), Prof. Kenneth John Gollob (AC Camargo Câncer Center), Prof. Lucas Lodi Junqueira (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

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

Belo Horizonte, 27 de junho de 2019.

Profa. Maria do Carmo Pereira Nunes

Profa. Walderez Ornelas Dutra

Prof. Kenneth John Gollob

Prof. Lucas Lodi Junqueira

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA

Prof. 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

SUBCOORDENADOR: Prof. Eli Iola Gurgel Andrade

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

INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho (Coordenador)

Prof. Antonio Luiz Pinho Ribeiro (Subcoordenador)

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Profa. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Unai Tupinambás

Prof. Vandack Alencar Nobre Junior

Thaís Teodoro de Oliveira Santos (Representante discente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que deu ao homem a inteligência e o livre arbítrio para poder decidir o que fazer com ela. Espero que tenhamos o discernimento para conduzir a ciência em benefício da humanidade.

Agradeço a meus pais pelos ensinamentos, conselhos, apoio e, principalmente, pelo amor e pelo carinho que me deram, desde antes mesmo do meu nascimento. Obrigado por tudo que fizeram e sacrificaram para eu poder chegar aqui hoje.

Agradeço aos meus irmãos Vinícius e Vítor pelo companheirismo. É com os irmãos que aprendemos a respeitar, a dividir e a conviver com o próximo.

Agradeço à minha esposa, Mirian, minha grande companheira e incentivadora, a pessoa que eu escolhi para passar o resto da vida ao meu lado.

Agradeço a todos os professores que contribuíram na minha formação acadêmica e pessoal, desde a pré-escola até a pós-graduação. Em especial, agradeço a meus professores do ensino médio Clóvis e Marlos, do Colégio Losango de Formiga. Agradeço aos professores da gloriosa Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, minha tão querida casa. Agradeço aos meus preceptores da residência de Clínica Médica, em especial Saulo Saturnino, Luciana Cristina e Eduardo Vilela. Agradeço aos meus preceptores da residência de Cardiologia, especialmente Marco Paulo, grande pessoa que exemplifica que liderança é muito mais do que chefia, Graziela Chequer, Luiz Guilherme, Fábio Morato e Silvio Amadeu. Agradeço também meu preceptor, colega e amigo Diego Nascimento.

Por fim, agradeço às professoras que tornaram tudo isso uma realidade, minha orientadora Maria do Carmo e minha coorientadora Walderez Dutra. Muito obrigado pela confiança e pelos ensinamentos.

RESUMO

Introdução: A resposta inflamatória anormal na cardiopatia reumática pode levar a alterações estruturais na valva mitral e conseqüentemente a estenose mitral (EM). A valvoplastia mitral percutânea por balão (VMPB) é o tratamento de escolha da EM grave e pode ter impacto na liberação de citocinas. No entanto, os efeitos da intervenção valvar na secreção de citocinas não são conhecidos. **Objetivos:** O objetivo do presente estudo é determinar os efeitos da VMPB na secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em pacientes com EM reumática. **Métodos:** Foram recrutados 18 pacientes com EM grave que foram submetidos a VMPB no Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG). Um grupo controle foi composto com 12 voluntários saudáveis. A concentração de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foi mensurada no grupo controle e nos pacientes com EM imediatamente antes e de 4 a 11 dias após a VMPB utilizando o kit de imunoensaio Luminex. **Resultados:** Comparado ao grupo controle, os pacientes com EM pré procedimento apresentavam níveis mais elevados do fator de crescimento PDGF, das quimiocinas IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , eotaxina, RANTES e IL-8, das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-17 e IFN- γ e das citocinas regulatórias IL-1RA e IL-4. Por outro lado, apresentavam níveis inferiores das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-12 e da citocina Th2 IL-13. Após a VMPB, em comparação ao pré procedimento, houve queda significativa nos níveis plasmáticos dos fatores de crescimento PDGF, VEGF e FGF, dos fatores proliferativos IL-2, IL-7 e IL-15, da quimiocina eotaxina, das citocinas inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e IL-12 e das citocinas Th2 IL-4 e IL-5. Interessantemente, os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1RA não se alteraram. É importante salientar que, após o procedimento, nenhuma citocina apresentou elevação no nível sérico. **Conclusão:** Após melhora da obstrução valvar com redução da pressão atrial esquerda pela VMPB, o nível sérico de citocinas derivadas da imunidade inata reduziu significativamente. Isso sugere que a normalização de parâmetros hemodinâmicos leva a uma redução de injúria e, portanto, da inflamação. **Palavras chave:** Cardiopatia reumática, estenose mitral, valvoplastia mitral percutânea por balão, citocinas.

ABSTRACT:

Introduction: Abnormal inflammatory response in rheumatic heart disease (RHD) can lead to structural changes of mitral valve and ultimately to mitral stenosis (MS). Percutaneous mitral commissurotomy (PMC) is the main treatment of severe MS, which might have an impact on release of cytokines. However, the effects of valve intervention on cytokine secretion is unknown. **Objectives:** This study aimed to determine the effects of PMC on the secretion of cytokines, chemokines and growth factors in patients with rheumatic MS. **Methods:** We enrolled 18 patients with severe MS who underwent PMC in the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais (HC-UFGM). A control group was composed of 12 healthy volunteers. Concentrations of cytokines, chemokines and growth factors were measured in control group and in patients with MS immediately before PMC and 4-11 days after the procedure using a capture bead immunoassay. **Results:** Compared to control group, patients with MS before PMC demonstrated higher levels of growth factor PDGF, chemokines IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , eotaxin, RANTES and IL-8, inflammatory cytokines IL-1 β , IL-17 and IFN- γ and anti-inflammatory molecule IL-1RA and Th2 cytokine IL-4. On the other hand, the levels of inflammatory cytokines IL-6 and IL-12 and Th2 cytokine IL-13 were lower in patients with MS prior to PMC compared to control group. After PMC, there was a significant reduction of plasma levels of growth factors PDGF, VEGF and FGF, proliferative factors IL-2, IL-7 and IL-15, chemokine eotaxin, inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-12p70 and Th2 cytokines IL-4 and IL-5. Interestingly, there was no significant change in the levels of down-regulatory cytokine IL-10 and IL-1RA. Importantly, the levels of the measured cytokines did not increase after intervention. **Conclusion:** After relief of valve obstruction with improvement in left atrial pressure, serum levels of innate cell-derived inflammatory cytokines significantly decreased. This finding suggests that the improvement of hemodynamic parameters leads to less injury and, thus, less inflammation. **Key Words:** Rheumatic heart disease, mitral stenosis, percutaneous mitral commissurotomy, cytokines.

LISTA DE QUADROS DA TESE

Quadro 1: Conceitos importantes	3
---------------------------------------	---

LISTA DE FIGURAS DA TESE

Figura 1: Valva mitral estenótica.	4
---	---

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1: Baseline characteristics of patients with mitral stenosis and healthy control subjects	27
Table 2: Echocardiographic data pre and post-PMC	27
Table 3: Levels of cytokines in control group and study group pre and post-PMC	28
Table 4: Prognosis factors in univariate analysis.	30

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1: Difference in the levels of growth factors and proliferative factors among control group and MS pre and post-PMC group.....	32
Figure 2: Difference in the levels of chemokines among control group and MS pre and post-PMC group	32
Figure 3: Difference in the levels of inflammatory cytokines among control group and MS pre and post-PMC group.....	33
Figure 4: Difference in the levels of down-regulatory and Th2 cytokines among control group and MS pre and post-PMC group	33
Figure 5: Correlation between the levels of the cytokines that presented significant variation post-PMC with the mitral valve area (MVA).....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acidente vascular encefálico.....	AVE
Ácido desoxirribonucleico.....	DNA
American College of Cardiology	ACC
American Heart Association	AHA
Antagonista do receptor de interleucina 1.....	IL-1RA
Área valvar mitral.....	AVM
Células apresentadoras de antígenos.....	APCs
Células mononucleares periféricas.....	PBMC
Célula T normal expressa e secretada, regulada por ativação.....	RANTES
Classe funcional.....	CF
Complexo principal de histocompatibilidade.....	MHC
Ecocardiograma transesofágico.....	ETE
Ecocardiograma transtorácico.....	ETT
Estenose mitral.....	EM
European Association for Cardio-Thoracic Surgery.....	EACTS
European Society of Cardiology.....	ESC
Fator de crescimento de fibrócitos.....	FGF
Fator de crescimento derivado de plaquetas.....	PDGF
Fator de crescimento endotelial vascular.....	VEGF
Fator de estimulação de colônias de granulócitos e monócitos.....	GM-CSF
Fator de estimulação de colônias de granulócitos.....	G-CSF
Fator de necrose tumoral.....	TNF
Fração de ejeção.....	FE
Febre reumática.....	FR
Fibrilação atrial.....	FA
Ficolinas.....	FCN
Gradiente valvar mitral.....	GVM
Hospital das Clínicas.....	HC
Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística	IBGE
Interferon.....	IFN
Interleucina.....	IL

Lectina ligadora de manose.....	MBL
Molécula 1 de adesão celular vascular.....	VCAM-1
Molécula de adesão intercelular-1.....	ICAM-1
N-acetil β D-glucosamina.....	GlcNAc
New York Heart Association.....	NYHA
Pressão sistólica de artéria pulmonar.....	PSAP
Pressure half-time.....	PHT
Proteína 10 induzida por interferon gama.....	IP-10
Proteína C reativa.....	PCR
Proteína inflamatória de macrófagos-1.....	MIP-1
Proteína quimiotática de monócitos-1.....	MCP-1
Receptor de células T.....	TCR
Receptores solúvel de fator de necrose tumoral.....	sTNF-R
Receptores toll-like.....	TLR
Regurgitação mitral.....	RM
Sistema Único de Saúde.....	SUS
Universidade Federal de Minas Gerais.....	UFMG
Valvoplastia mitral percutânea por balão.....	VMPB

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	2
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
<i>HEMODYNAMIC IMPROVEMENT IN PATIENTS WITH RHEUMATIC MITRAL STENOSIS FOLLOWING PERCUTANEOUS MITRAL COMMISSUROTOMY IS ASSOCIATED WITH DECREASED LEVELS OF CIRCULATING INNATE-CELL DERIVED CYTOKINES.....</i>	14
ABSTRACT:.....	15
INTRODUCTION:.....	16
METHODS:	17
RESULTS:	19
DISCUSSION:	20
STUDY LIMITATIONS:.....	23
REFERENCES:.....	24
CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A cardiopatia reumática crônica é a principal consequência da febre reumática, decorrente da faringoamigdalite causada pela bactéria *Streptococcus pyogenes*. É um importante agravo de saúde, especialmente em países em desenvolvimento, devido sua alta taxa de morbidade e mortalidade, e por acometer indivíduos jovens e em idade produtiva. A cardiopatia reumática é a principal causa de estenose mitral, embora a lesão valvar mais comum seja a dupla disfunção mitral.

A patogênese da febre reumática e da cardiopatia reumática é explicada pelo mimetismo antigênico entre proteínas do *S. pyogenes* e proteínas valvares em um hospedeiro geneticamente susceptível, levando a uma resposta autoimune exacerbada causando espessamento, fibrose e calcificação valvar, com sua consequente disfunção. Esse processo envolve a liberação de várias citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que orquestram a resposta imune, regulando a proliferação, ativação, inibição e diferenciação de células imunológicas.

A valvoplastia mitral percutânea por balão (VMPB) é o tratamento de escolha da estenose mitral grave, com uma taxa de sucesso de 80 a 90%. Sabe-se que a VMPB interfere na ativação plaquetária, função endotelial e níveis séricos de TNF- α e receptores solúveis de TNF. Ainda assim, seu efeito na liberação de citocinas inflamatórias é pouco conhecido.

O objetivo do presente estudo é determinar o efeito da valvoplastia mitral percutânea por balão no perfil inflamatório de pacientes portadores de estenose mitral reumática, expresso pelo perfil de citocinas.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Epidemiologia

A febre reumática (FR) é uma doença decorrente da faringoamigdalite causada pela bactéria *Streptococcus pyogenes* em crianças e adolescentes susceptíveis, em geral dos 3 aos 19 anos de idade (1). A cardiopatia reumática crônica é a consequência mais importante da FR e tem sido foco de décadas de estudos (2).

Em 2015, estimou-se uma incidência de 33.194.900 casos de cardiopatia reumática nos países endêmicos, definidos como aqueles com uma mortalidade estimada superior a 0,15 mortes por 100.000 crianças de 5 a 9 anos. Para países não endêmicos, a incidência estimada foi de 221.600 casos. A prevalência foi de 444 casos por 100.000 pessoas nos países endêmicos e 3,4 casos por 100.000 pessoas nos países não endêmicos. Entre os anos de 1990 e 2015, houve uma queda significativa na prevalência em várias regiões do mundo, sendo que as regiões que apresentam as maiores prevalências são Oceania, África subsaariana e sudeste asiático. Os países com a estimativa de maior número de casos de cardiopatia reumática em 2015 foram Índia (13,17 milhões de casos), China (7,07 milhões), Paquistão (2,25 milhões), Indonésia (1,18 milhão) e República Democrática do Congo (805.000 casos), respondendo por 73% do total global. Foram estimados 663.000 casos de insuficiência cardíaca grave por cardiopatia reumática no ano de 2015 e 319.400 mortes, um total de 4,8 mortes por 100.000 pessoas (3).

Diferentemente de países mais desenvolvidos, a FR é a principal etiologia das valvopatias no Brasil, responsável por até 70% dos casos (4). De acordo com o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que ocorram anualmente no Brasil cerca de 10 milhões de casos de faringoamigdalite estreptocócica, que geram aproximadamente 30.000 novos casos de FR. Desses, 15.000 poderiam apresentar envolvimento cardíaco (5). Estudos realizados na população de escolares em algumas capitais brasileiras estimaram a prevalência de cardiopatia reumática entre 1 e 7 casos/1.000 pessoas (6). As mulheres são mais acometidas que os homens na proporção de duas mulheres para cada homem (7). No ano de 2016, ocorreram, no Brasil, 1951 mortes por cardiopatia reumática crônica, segundo dados do Ministério da Saúde disponíveis na plataforma DATASUS (8). Ainda de acordo com o DATASUS, em 2018, a cardiopatia reumática crônica foi causa de

6920 internações pelo Sistema Único de Saúde (SUS), com gasto total de R\$77.791.205,75 (9).

Quadro 1: Conceitos importantes (10)

Febre reumática aguda: Doença aguda causada por uma resposta autoimune à infecção pelo estreptococo beta-hemolítico do grupo A, levando a uma série de sintomas e sinais decorrentes do envolvimento do coração, articulações, cérebro, pele e tecidos subcutâneos. A febre reumática aguda é diagnosticada de acordo com os Critérios Revisados de Jones e tem tendência a se repetir com novo surto infeccioso.

Cardite reumática: Inflamação ativa dos tecidos cardíacos, principalmente das valvas mitral e/ou aórtica, causadas pela febre reumática aguda. A cardite reumática pode levar lesão valvar crônica que permanece após o episódio inflamatório agudo ter se resolvido.

Cardiopatía reumática crônica: Lesão valvar persistente resultando em insuficiência das valvas mitral e/ou aórtica, ou em estenose valvar em uma fase mais tardia, que permanece como resultado de febre reumática aguda com cardite reumática. As complicações da cardiopatía reumática incluem insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral isquêmico, endocardite infecciosa e fibrilação atrial.

Fonte: Sika-Paotonu D, Beaton A, Raghu A, Steer A, Carapetis J. Acute Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease. 2017.

Patogênese

A cardiopatía reumática crônica é uma complicação tardia da FR aguda, levando no mínimo dois anos após o primeiro episódio para o desenvolvimento de lesão grave. Usualmente, há um longo intervalo, de 10 a 20 anos, entre um episódio de cardite reumática e o início de sintomas causados pelas lesões valvares. A lesão valvar inicial da FR aguda consiste em uma valvulite, que se manifesta com a formação de uma série de nódulos translúcidos ao longo da linha da comissura valvar. Com a cronificação da lesão, a valva se espessa, fibrosa e geralmente se calcifica, causando anormalidades no fluxo sanguíneo transvalvar, o que perpetua a lesão sobre a valva (11) (Figura 1).

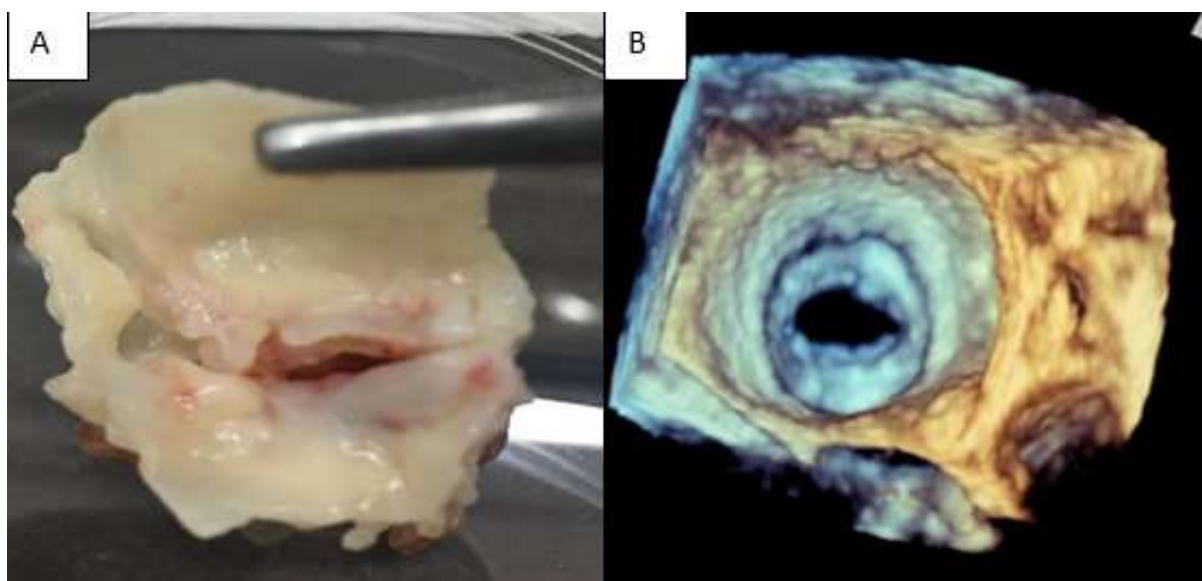


Figura 1: Valva mitral estenótica. A: Aspectos morfológicos macroscópicos da valva mitral reumática com estenose grave. A valva mitral apresenta intenso espessamento dos folhetos com pontos de calcificação e importante redução do orifício valvar. B: Imagem de ecocardiografia transesofágica tridimensional de estenose mitral reumática, com a valva vista do átrio esquerdo. Observa-se redução da área valvar com espessamento comissural simétrico

A patogênese da cardiopatia reumática está relacionada ao padrão de resposta imune após exposição ao *S. pyogenes*. Apesar dos avanços nos estudos histológicos, a patogenia precisa da cardiopatia reumática não está totalmente esclarecida. O mecanismo atualmente proposto para o desenvolvimento da FR envolve o mimetismo antigênico, definido como o compartilhamento de epítomos entre antígenos do hospedeiro e do agente infeccioso, associado a uma resposta imune anormal. A patogênese da doença se baseia na seguinte tríade: presença do *S. pyogenes*, um hospedeiro geneticamente susceptível e uma resposta imune exacerbada (12).

Fatores genéticos, principalmente relacionados a genes envolvidos na resposta imune, tem papel importante tanto na suscetibilidade quanto na gravidade da cardiopatia reumática (13). Vários alelos HLA classe II foram associados à doença, em especial o HLA-DR7 (14).

O *S. pyogenes* apresenta em sua parede celular carboidratos como a N-acetil β D-glucosamina (G1cNAc) ligados a proteínas de membrana. Dentre elas, a mais importante do ponto de vista antigênico é a proteína M, composta por duas cadeias de polipeptídeos com aproximadamente 450 aminoácidos em α -hélice formando uma super-hélice. Enquanto a G1cNAc induz reação cruzada contra laminina, uma proteína presente na matriz extracelular do tecido valvar, as proteínas de membrana apresentam estrutura homóloga a proteínas

humanas como miosina cardíaca, tropomiosina, ceratina, vimentina e várias outras proteínas valvares (15).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra infecções. Várias proteínas plasmáticas, incluindo a lectina ligadora de manose (MBL), receptores toll-like (TLR), em especial TLR-2, ficolinas (FCN) e proteínas do sistema do complemento, se ligam a várias estruturas bacterianas, incluindo a GlcNAc, e são reconhecidas por receptores celulares, promovendo a produção de citocinas, recrutamento de células para o local de infecção, fagocitose da bactéria e ativação da resposta imune adaptativa através da apresentação de antígenos (16).

Três tipos de mimetismo mediado por anticorpos contra o *S. pyogenes* foram descritos: 1- sequências de aminoácidos idênticas, 2- sequências homólogas, mas não idênticas, e 3- epítomos de diferentes moléculas, como de carboidratos, DNA e gangliosídeos (1).

Já o mimetismo que induz resposta imunológica mediada por células T se inicia com o reconhecimento de antígenos bacterianos ou do próprio hospedeiro via receptor de células T (TCR), apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, através do MHC de classe I ou II. Os linfócitos T CD4⁺ são os principais efetores da reação autoimune na cardiopatia reumática. São ativados a partir da apresentação de antígenos estreptocócicos via MCH classe II. Epítomos patogênicos que apresentam similaridade estrutural ou sequencial com autoepítomos podem ativar linfócitos T autorreativos (1, 11). São descritos linfócitos T capazes de reconhecer epítomos estreptocócicos derivados da proteína bacteriana M5 e os autoepítomos miosina, laminina e tropomiosina. Linfócitos T que reconhecem epítomos M5 são encontrados mais frequentemente em pacientes com cardiopatia reumática do que em indivíduos normais. Além disso, uma alta proporção de clones de células T presentes no tecido valvar são reativos contra miosina. Esses dados suportam a ideia de que células T periféricas migram para o tecido cardíaco, se expandem localmente e se tornam capazes de reconhecer autoantígenos distintos do epítomo patogênico, mecanismo conhecido por espalhamento de epítomos (1, 11, 16).

Células T CD4⁺ ativadas polarizam para subpopulações funcionalmente distintas, dentre elas as denominadas Th1, Th2 ou Th17, de acordo com as citocinas secretadas. Células Th1 estão envolvidas com a imunidade celular e produzem IL-2, IFN γ e TNF α . Células Th2 desenvolvem imunidade humoral e produzem IL-4, IL-5 e IL-13. Células Th17 desempenham uma resposta proinflamatória mediada pela IL-17 (17).

A faringoamigdalite por *S pyogenes* desencadeia uma resposta inflamatória que envolve várias citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF α . Após estímulo, células mononucleares periféricas (PBMC) de pacientes com febre reumática aguda produzem maiores quantidades de IL-1 e IL-2 e apresentam maior expressão de receptores de IL-2 quando comparadas com PBMC de indivíduos normais, indivíduos com faringoamigdalite estreptocócica sem FR e indivíduos com cardiopatia reumática crônica. A produção aumentada de IL-2 se mantém por 48 semanas após o episódio de febre reumática aguda (16).

Na cardiopatia reumática, as imunidades humoral e celular se interagem, de forma que anticorpos que reagem de forma cruzada contra proteínas estreptocócicas e humanas se ligam à superfície endotelial valvar, levando ao aumento da produção da molécula de adesão VCAM-1, que, por sua vez, promove inflamação, infiltração celular e lesão valvar. Acredita-se que a FR aguda resulte de um dano inicial mediado por anticorpos, que mais tarde é perpetuado pela imunidade celular (1, 18).

Um a dois terços dos pacientes com FR irão desenvolver cardite reumática, e apenas uma porção desses irão desenvolver cardiopatia grave e persistente. Os fatores que determinam a evolução da cardiopatia não são completamente conhecidos, mas é possível que alguns pacientes com FR irão desenvolver uma resposta imune celular intensa e duradoura pelo fenômeno de espalhamento de epítipo, enquanto outros irão desenvolver preferencialmente uma resposta humoral. Dessa forma, acredita-se que a cardite leve, a coréia de Sydenham e a artrite são mediadas pela resposta humoral (resposta tipo Th2), enquanto a cardite grave seja mediada pela resposta celular (tipo Th1) (16).

A resposta inflamatória iniciada pela autoimunidade leva à liberação de várias citocinas inflamatórias, e essas citocinas modulam a resposta imune, regulando a proliferação, ativação, inibição e diferenciação de células imunológicas (19). Essa resposta apresenta ainda variações em diferentes estágios da doença. Toor *et al* demonstrou que, durante a fase de FR aguda, tanto as células T CD4+ quanto as T CD8+ produzem predominante IL-2 e IFN- γ , sugerindo que esta resposta deve ser responsável pela cronificação com lesões valvares permanentes. Nessa fase, há um predomínio de células CD4+, com uma relação CD4+/CD8+ de 1,84. Esse perfil se altera na fase inicial da cardiopatia reumática crônica, quando há um aumento na concentração de TNF- α e uma queda na concentração de IL-6 e na relação CD4+/CD8+ para 1,06. Já na fase crônica quiescente, são detectados níveis baixos de IL-6 e

TNF- α , com uma relação CD4+/CD8+ de 0,96. No entanto, mesmo em níveis mais baixos, essas citocinas ainda contribuem na manutenção do processo inflamatório (20).

A citocina imunorreguladora IL-10 tem papel importante nessa mudança de resposta inflamatória. Diversos estudos encontraram níveis séricos elevados de IL-10 em relação a controles saudáveis (21, 22), mas seus níveis são ainda mais elevados na fase crônica em relação à fase de FR aguda, 1287 e 126.2 pg/ml, respectivamente. Sabe-se que a IL-10 inibe a produção de citocinas Th1, inibindo a ativação de linfócitos e a apresentação de antígenos, ao mesmo tempo em que induz a produção de autoanticorpos (22) e promove a diferenciação e proliferação de linfócitos T CD8+. Células CD8+ infiltradas no tecido valvar podem contribuir com o aumento da citotoxicidade, causando lesão valvar (19).

Acredita-se que a relação entre TNF- α e IL-10 possa ser determinante na forma como a doença evolui em diferentes pacientes, já que alguns evoluem com cardiopatia grave sintomática com necessidade de abordagem cirúrgica e outros permanecem com doença estável assintomática (19, 21, 22).

A resposta Th17 também apresenta importante papel na patogênese da cardiopatia reumática. Bas *et al* demonstrou que a porcentagem de linfócitos Th17 e a relação Th17/linfócitos T reguladores estão significativamente elevadas em pacientes com cardiopatia reumática crônica (23). Bilik *et al* identificou níveis séricos de IL-17 e IL-23 significativamente maiores nesses pacientes em relação aos controles saudáveis. É sabido que essas citocinas são potentes moléculas proinflamatórias que desempenham importante papel na mediação da inflamação crônica e no desenvolvimento de doenças autoimunes, como esclerose múltipla, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, asma e psoríase (24).

No tecido cardíaco de indivíduos com cardite aguda e com cardiopatia reumática crônica se encontra um grande número de células mononucleares capazes de secretar as citocinas inflamatórias TNF- α e IFN- γ e a citocina reguladora IL-10. São encontradas poucas células produtoras da citocina reguladora IL-4, e a falta dessa citocina provavelmente contribui para a progressão da doença levando a dano valvar permanente (16, 25). Davutoglu *et al* demonstrou também que esses indivíduos apresentam níveis elevados de IL-6, IL-8, IL-2, TNF- α e proteína C reativa (PCR), e que os níveis de fibrinogênio, PCR, IL-6, TNF α e IL-2 se correlacionam com a gravidade da classe funcional de NYHA, enquanto os níveis de IL-6 e TNF- α também apresentam correlação forte com a calcificação valvar (26).

Estenose mitral reumática

A principal causa de estenose mitral (EM) é a cardiopatia reumática (4), sendo que o acometimento mais comum é a dupla disfunção mitral não balanceada (insuficiência no estágio inicial e estenose na fase mais tardia).

O diagnóstico da EM é feito ao exame clínico e o ecocardiograma confirma o diagnóstico, avalia a anatomia valvar, define gravidade e repercussão da estenose. Segundo as definições do *2014 AHA/ACC Valvular Heart Disease Guideline*, a gravidade da EM é melhor caracterizada pela área valvar medida por meio da planimetria ou pelo cálculo do *diastolic pressure half-time* (PHT). A definição de gravidade é baseada na intensidade dos sintomas e na perspectiva de que uma intervenção irá melhorar os sintomas. Dessa forma, a EM grave é definida pela presença de uma área valvar mitral menor ou igual a $1,5\text{cm}^2$ (ou um PHT maior ou igual a 150ms), geralmente correspondendo a um gradiente transmitral médio maior que 5 a 10 mmHg em uma frequência cardíaca normal (27).

Os pacientes com EM leve, na maioria das vezes, estão assintomáticos em repouso. Contudo, diante de um aumento no fluxo transmitral ou uma diminuição no período de enchimento diastólico, pode ocorrer um aumento da pressão atrial esquerda com desenvolvimento de sintomas. Consequentemente, os primeiros sintomas de dispnéia em pacientes com EM leve serão desencadeados pelo esforço, estresse emocional, gravidez ou fibrilação atrial (FA) com resposta ventricular elevada. À medida que a obstrução ao fluxo da valva mitral aumenta, a tolerância ao esforço vai reduzindo (7). Ainda assim, muitos pacientes com EM permanecem assintomáticos mesmo após exercícios extenuantes. Em pacientes com EM grave pode ocorrer um aumento súbito na pressão venosa pulmonar pelo aumento da frequência cardíaca e do débito cardíaco, levando ao edema pulmonar.

Valvoplastia mitral percutânea por balão

Em 1984, Inoue *at al* descreveu uma técnica de comissurotomia transmitral percutânea como uma alternativa à valvoplastia mitral cirúrgica (28). Nesse procedimento, é realizada punção da veia femoral e introdução de um fio guia até a veia cava inferior. Sob fluoroscopia, é introduzida até o átrio direito a bainha de punção transeptal, pela qual é passada a agulha de Brockenbrough que é utilizada para realizar a punção do septo atrial pela fossa ovalis, atingindo o átrio esquerdo. É então introduzido um fio guia pela bainha até o átrio esquerdo,

sob o qual é inserido o cateter balão de Inoue. Em seguida, é introduzido outro fio guia que irá auxiliar o avanço do cateter balão até o ventrículo esquerdo através da valva mitral. A porção distal do balão é inflada e ele é puxado para trás até se estabilizar no nível do anel mitral. Infla-se a porção proximal do balão e, finalmente, a porção central, causando descolamento da comissura valvar fundida e consequente aumento do orifício valvar. Neste momento é realizado um ecocardiograma transtorácico para avaliação da área valvar mitral e da presença (ou aumento) de regurgitação mitral (RM). Caso não haja piora da RM e a área valvar ainda esteja menor que 1,5 cm², é realizada nova insuflação do cateter balão com o incremento de 1 ml no volume do balão.

De acordo com o *2014 AHA/ACC Valvular Heart Disease Guideline* e o *The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)*, a valvoplastia mitral percutânea com balão (VMPB) é a forma de tratamento preferencial nas seguintes situações: (1) pacientes sintomáticos com área valvar mitral (AVM) $\leq 1,5\text{cm}^2$ e morfologia favorável, (2) pacientes assintomáticos com AVM $\leq 1,0\text{cm}^2$ e morfologia favorável, (3) pacientes assintomáticos com AVM $\leq 1,5\text{cm}^2$ com morfologia favorável e FA de início recente ou pressão sistólica na artéria pulmonar $\geq 50\text{mmHg}$, (4) pacientes sintomáticos com AVM $> 1,5\text{cm}^2$ com evidência de estenose hemodinamicamente significativa durante exercício, (5) pacientes muito sintomáticos com AVM $\leq 1,5\text{cm}^2$, anatomia desfavorável mas que não são candidatos ou apresentem alto risco para intervenção cirúrgica (27, 29).

Os principais preditores ecocardiográficos de sucesso são área valvar, espessamento subvalvar e calcificação valvar, embora as características dos pacientes, as estratégias de intervenção e a experiência da equipe envolvida no procedimento também interfiram nos resultados (30). A taxa de sucesso do procedimento, definida como a obtenção de uma área valvar maior ou igual a 1,5cm² sem a presença de RM igual ou superior a 2+ à ventriculografia, é em torno de 80%. Possíveis complicações incluem: morte (0,5 a 4%), formação de hemopericárdio (0,5 a 10%), fenômenos embólicos (0,5 a 5%) e desenvolvimento de RM grave (2 a 10%) (31). A taxa de pacientes livres de eventos (morte, nova VMPB, troca valvar mitral, CF III ou IV de NYHA) é diretamente relacionada aos resultados imediatos pós procedimento, girando em torno de 80% em 10 anos e 30% em 20 anos (32, 33).

Segundo dados do DATASUS, em 2018 foram realizados 200 procedimentos de VMPB no Brasil pelo SUS, sendo gastos R\$ 1.461.666,40 (34).

O desenvolvimento de reestenose é a principal causa de deterioração funcional após uma valvoplastia bem sucedida (35). Seu desenvolvimento é tempo dependente, mas pode ocorrer em intervalos curtos como um ano, com uma taxa de incidência na literatura que varia de 4 a 39%, de acordo com o tempo de seguimento dos estudos (36). Bouleti *et al*, em um seguimento de 912 pacientes submetidos a VMPB, mostrou uma incidência de reestenose mitral com indicação de reabordagem de 38,4% em 20 anos, dos quais 24% foram submetidos a nova VMPB e 76% submetidos a cirurgia (37). O principal preditor de reestenose após VMPB com sucesso é a AVM pós procedimento menor que 1,8cm² (36).

Impacto da valvoplastia mitral percutânea por balão na resposta inflamatória

A inflamação crônica tem papel no desenvolvimento e progressão da reestenose, como demonstrado por Rifaie *et al*. Foi observado que indivíduos que apresentaram reestenose após VMPB apresentavam níveis séricos de IL-6 significativamente maiores quando comparados com indivíduos sem reestenose (35).

Yetkin *et al* demonstrou que indivíduos com cardiopatia reumática crônica apresentam níveis séricos de moléculas de adesão solúveis (E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1) mais elevados que indivíduos controle. Demonstrou também que a VMPB altera os níveis séricos de moléculas de adesão dosadas 24 horas após o procedimento. Foi observada elevação nos níveis de VCAM-1, redução dos níveis de E-selectina e manutenção dos níveis de ICAM-1. Níveis elevados de moléculas de adesão sugerem que o processo inflamatório nos pacientes com EM reumática seja contínuo, o que explica a fibrose progressiva da valva (11).

Cagli *et al* demonstrou que, após a VMPB, há redução nos níveis de TNF- α e de receptor solúvel de TNF (sTNF-R). A concentração de TNF- α reduziu de $29,61 \pm 12,22$ para $22,42 \pm 8,81$ pg/ml ($P < 0.0001$) 24 horas após o procedimento e de $22,42 \pm 8,81$ para $18,92 \pm 7,37$ pg/ml ($P < 0.0001$) na quarta semana após a VMPB. Uma redução similar também foi observada nos níveis de sTNF-R, de $3,88 \pm 0,97$ para $3,26 \pm 1,09$ ng/ml ($P < 0.0001$), e de $3,26 \pm 1,09$ para $2,96 \pm 1,05$ ng/ml ($P < 0.0001$), respectivamente. Na quarta semana após o procedimento, os níveis de TNF- α e sTNF-R ainda eram maiores nos indivíduos com cardiopatia reumática crônica em relação aos controles saudáveis ($18,92 \pm 7,37$ vs $11,62 \pm 4,64$ pg/ml, $P < 0.0001$).

Esses achados demonstram a presença de um processo inflamatório contínuo nos pacientes com EM reumática. Também é sabido que os níveis de TNF- α e de outras citocinas inflamatórias estão aumentados tanto no miocárdio quanto no plasma de indivíduos com significativa sobrecarga pressórica e/ou volêmica devida a disfunção valvar ou insuficiência cardíaca. Cagli *et al* mostrou que níveis elevados de TNF- α e sTNF-R apresentam redução significativa após VMPB, provavelmente por melhora nos parâmetros hemodinâmicos após o procedimento. Ainda assim, não atingem o nível de controles saudáveis, demonstrando a persistência de um processo inflamatório (38).

Outros estudos também demonstraram o efeito da VMPB reduzindo a ativação plaquetária e a disfunção endotelial. Yetkin *et al* demonstrou redução significativa nos níveis plasmáticos de beta-tromboglobulina, (66 ± 26 ng/ml vs 48 ± 20 ng/ml, $P=0,001$), fator de Von Willebrand (177 ± 67 ui/dl vs 134 ± 60 ui/dl, $P 0,0010$) e P-selectina (226 ± 74 ng/ml vs 173 ng/ml, $P=0,008$), 24 horas após o procedimento (39). Chen *et al* também demonstrou uma redução nos níveis plasmáticos de CD40L solúvel, uma glicoproteína de membrana secretada por plaquetas, relacionada à ativação plaquetária e à disfunção endotelial. Os níveis séricos reduziram de $437,6\pm 370,2$ pg/ml para $215,4\pm 113,9$ pg/ml 10 minutos após o procedimento e para $217,4\pm 111,9$ pg/ml 4 semanas após o procedimento ($p = 0,02$) (40).

Entretanto, os efeitos da VMPB na liberação de citocinas ainda é pouco conhecido. O presente estudo, portanto, foi desenhado com o objetivo de se avaliar o efeito da VMPB na secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento desencadeadas tanto pela lesão do endotélio valvar, com exposição de antígenos valvares subendoteliais, quanto pela mudança hemodinâmica decorrente da redução do grau de estenose valvar. Nossa hipótese de trabalho foi que a intervenção leva a uma redução da expressão de fatores solúveis associados à resposta imunológica, estando associada à melhora clínica.

OBJETIVOS

Determinar as alterações no nível sérico de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento após VMPB em pacientes com EM.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do estudo e população estudada

Esse estudo representa um sub-projeto de uma linha de pesquisa em EM, previamente aprovado pelo COEP com o parecer de número ETIC 528/08.

Entre 17 e 27 de outubro de 2016, foram selecionados 18 pacientes consecutivos (16 mulheres, idade média $49,3 \pm 2,5$ anos) com diagnóstico de EM reumática submetidos a VMPB no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM). Um grupo controle foi composto de 12 voluntários assintomáticos (4 mulheres, idade média $17,3 \pm 0,1$ anos). Todos os pacientes concordaram de forma voluntária e por escrito em participar do estudo. Pacientes foram seguidos ambulatorialmente após VMPB para avaliação de desfechos adversos até janeiro de 2019. Os eventos clínicos pré definidos foram morte cardiovascular, nova VMPB, cirurgia para troca valvar mitral, desenvolvimento de fibrilação atrial (FA), acidente vascular encefálico (AVE) ou piora da classe funcional da New York Heart Association (NYHA).

Procedimentos médicos

Todos os procedimentos médicos foram realizados no HC-UFGM. Pacientes com FA recebendo anticoagulantes foram internados entre 5 e 7 dias antes do procedimento para realização de ponte com enoxaparina (1 miligrama por quilograma de peso de 12 em 12 horas via subcutânea). Os demais foram internados no dia do procedimento. Foi realizado anamnese e exame físico detalhado de todos os pacientes. Todos realizaram ecocardiograma transtorácico (ETT) e ecocardiograma transesofágico (ETE) antes do procedimento, e ETT no período de até cinco dias após o procedimento.

A VMPB foi realizada de acordo com a técnica anterógrada trans-septal com cateter balão de Inoue (Toray Medical Corporation; Tokyo, Japão). O procedimento foi considerado de sucesso no caso de obtenção de uma área valvar maior ou igual a $1,5\text{cm}^2$ sem aumento no grau de regurgitação mitral avaliado no ETT após o procedimento.

Coleta e estudo de amostras

Foram coletadas amostras de 5 a 10ml de sangue periférico de todos os pacientes em dois momentos: o primeiro no dia da VMPB, logo antes do procedimento, e o segundo entre 4 e 11 dias após a intervenção valvar. As amostras de sangue foram processadas para obtenção de plasma, que foi usado para mensuração das citocinas. Foi realizada a dosagem de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento utilizando o kit de imunoenensaio Luminex (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay, Bio-Rad, Hercules – CA, EUA). A leitura das amostras foi realizada no equipamento Bio-Plex 200 e as análises no software Manager (Instituto René Rachou - Fiocruz Minas). Os resultados obtidos foram analisados em termos da média das intensidades de fluorescência (MIF).

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se os softwares SPSS versão 25 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EUA) e GraphPad Prism versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla – CA, EUA). Variáveis contínuas foram apresentadas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartilico, quando apropriado. Variáveis categóricas foram apresentadas como frequência e porcentagem. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para avaliar diferenças entre pacientes e controles. O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar diferenças dentro do grupo com EM antes e depois da VMPB. Para avaliar o impacto do perfil hemodinâmico no nível de citocinas, foi realizada a análise de correlação de Spearman entre o nível sérico das citocinas que apresentaram variação significativa após VMPB e a área valvar mitral (AVM). Foram feitas análises univariadas utilizando o modelo de regressão de Cox para determinar a associação entre o nível de citocinas antes e após a VMPB e o desfecho combinado de morte cardiovascular, nova VMPB, cirurgia valvar mitral, AVE e desenvolvimento de FA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estaticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

HEMODYNAMIC IMPROVEMENT IN PATIENTS WITH RHEUMATIC MITRAL STENOSIS FOLLOWING PERCUTANEOUS MITRAL COMMISSUROTOMY IS ASSOCIATED WITH DECREASED LEVELS OF CIRCULATING INNATE-CELL DERIVED CYTOKINES

Vicente R Silva, MD¹, Eula G A Neves², Livia S A Passos¹, Flávia Cristina de Melo², Andrea Teixeira³, Walderez O Dutra, PhD^{1,2,4}, Maria do Carmo P Nunes, MD, PhD¹. *

¹Programa de Pós-graduação em Infectologia e Medicina Tropical, UFMG; ²Lab. Biologia das Interações Celulares, ICB, UFMG; ³ Instituto René Rachou, FIOCRUZ; ⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais-INCT-DT, Belo Horizonte, MG, Brazil.

ABSTRACT:

Introduction: Abnormal inflammatory response in rheumatic heart disease (RHD) can lead to structural changes of mitral valve and ultimately to mitral stenosis (MS). Percutaneous mitral commissurotomy (PMC) is the main treatment of severe MS, which might have an impact on release of cytokines. However, the effects of valve intervention on cytokine secretion is unknown. **Objectives:** This study aimed to determine the effects of PMC on the secretion of cytokines, chemokines and growth factors in patients with rheumatic MS. **Methods:** We enrolled 18 patients with severe MS who underwent PMC in the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais (HC-UFMG). A control group was composed of 12 healthy volunteers. Concentrations of cytokines, chemokines and growth factors were measured in control group and in patients with MS immediately before PMC and 4-11 days after the procedure using a capture bead immunoassay. **Results:** Compared to control group, patients with MS before PMC demonstrated higher levels of growth factor PDGF, chemokines IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , eotaxin, RANTES and IL-8, inflammatory cytokines IL-1 β , IL-17 and IFN- γ and anti-inflammatory molecule IL-1RA and Th2 cytokine IL-4. On the other hand, the levels of inflammatory cytokines IL-6 and IL-12 and Th2 cytokine IL-13 were lower in patients with MS prior to PMC compared to control group. After PMC, there was a significant reduction of plasma levels of growth factors PDGF, VEGF and FGF, proliferative factors IL-2, IL-7 and IL-15, chemokine eotaxin, inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-12p70 and Th2 cytokines IL-4 and IL-5. Interestingly, there was no significant change in the levels of down-regulatory cytokine IL-10 and IL-1RA. Importantly, the levels of the measured cytokines did not increase after intervention. **Conclusion:** After relief of valve obstruction with improvement in left atrial pressure, serum levels of innate cell-derived inflammatory cytokines significantly decreased. This finding suggests that the improvement of hemodynamic parameters leads to less injury and, thus, less inflammation. **Key Words:** Rheumatic heart disease, mitral stenosis, percutaneous mitral commissurotomy, cytokines.

INTRODUCTION:

Rheumatic heart disease (RHD) is the most important sequel of acute rheumatic fever (ARF), an autoimmune disease that follows throat infection by *Streptococcus pyogenes* in susceptible individuals (1, 2). It continues to be a major health problem worldwide, especially in developing countries, where it is an important cause of morbidity and mortality in young patients (3). There are an estimated 33 million individuals currently living with RHD, accounting for over a million premature deaths annually (4).

The pathogenesis of ARF/RHD results from the molecular mimicry between streptococcal M protein and several cardiac proteins (cardiac myosin, tropomyosin, keratin, laminin and vimentin) in genetically susceptible individuals (3, 5). Exacerbated immune response leads to the release of various inflammatory cytokines that modulate humoral and cellular immune response by either up-regulating or down-regulating proliferation, activation, inhibition and differentiation of immune cells (6). Antibodies that cross-react with streptococcal and human proteins bind to the endothelial surface and up-regulate the adhesion molecule VCAM-1, leading to infiltration of cells that will perpetuate and expand inflammation (2).

During ARF phase, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) produce larger amounts of IL-1 and IL-2 compared to healthy controls, and both CD4⁺ and CD8⁺ T cells produce IL-2 and IFN- γ . Moreover, IL-6 is in greater concentration as compared to TNF- α . IL-6 is responsible for hyper activation of B cell response and antibody production in this stage of the disease. In contrast, in early RHD, TNF- α concentration is much higher than IL-6. TNF- α stimulates T cell infiltration into the valve, and, along with IFN- γ , mediate chronicity of RHD. On the other hand, in the quiescent chronic phase, low levels of IL-6 and TNF- α are detected. This switch is regulated by cytokines, especially IL-10 (7, 8). Several studies demonstrated that patients with RHD have higher serum levels of inflammatory mediators than healthy controls, which is accepted as evidence of ongoing inflammation. It is also known that expression of TNF- α and other cytokines increases both in the myocardium and plasma of patients with significant pressure or volume overload due to valvular heart disease or chronic heart failure (9-13).

RHD is the major cause of mitral stenosis (MS) (14). Percutaneous mitral commissurotomy (PMC) is indicated for the treatment of clinically significant MS (15-18)

It has been demonstrated that PMC decreases platelet activation, endothelial dysfunction and the plasma levels of TNF- α and soluble TNF receptor (sTNF-R) (19, 20), but also increases the levels of VCAM-1 (21), important mediators of inflammation, cellular infiltration, and valve scarring (22). These data suggest that PMC could reduce inflammation by improving hemodynamic status or, alternatively, increase inflammation due to valve injury caused by the procedure. Thus, evaluating the effects of PMC on cytokine secretion will provide valuable information on the immediate inflammatory response to PMC.

The objective of the present study is to determine the changes in cytokine levels after PMC.

METHODS:

Study Population

Between October 17th 2016 and October 27th 2016, we included 18 consecutive patients (16 females, mean age 49.28 ± 2.45 years) with severe rheumatic MS who underwent PMC in the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais (HC-UFGM). A control group was composed of 12 healthy volunteers (4 females, mean age 17.25 ± 0.13 years). Patients were followed up on an outpatient basis after PBMV to assess adverse outcome until January 2019. Predefined clinical events consisted of cardiovascular death, repeat PBMV, mitral valve surgery, development of AF, stroke and New York Heart Association (NYHA) functional class. Informed consent was obtained from all participants and the ethical review board approved the protocol.

Medical procedures

All medical procedures were conducted in the HC-UFGM. Patients with atrial fibrillation (AF) under anticoagulation with warfarin were admitted between five and seven days before PMC to receive bridging anticoagulation therapy with enoxaparin (1 milligram per kilogram of body weight administered subcutaneously twice daily). All

other patients were admitted in the day of the procedure. All patients had a detailed history and clinical examination. Transthoracic and transesophageal echocardiographic examinations were performed in all patients.

PMC was performed according to the antegrade, trans-septal technique with Inoue balloon catheter (Toray Medical Corporation; Tokyo, Japan). The procedure was considered successful if the mitral valve area was higher than 1.5 cm², without the development of mitral regurgitation (MR) > 2+.

Blood sampling and assay procedures

We collected five to ten milliliters of peripheral blood samples right before PMC and between four to eleven days after the procedure. Blood was processed for obtaining plasma, which was used for cytokine measurement. Concentrations of cytokines, chemokines and growth factors were measured using Luminex immunoassay kit (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay, Bio-Rad, Hercules – CA, USA). Results were presented as mean fluorescence intensity (MFI).

Statistical analysis

Statistical analysis were performed using SPSS™ software version 25 for Windows (SPSS Inc., Chicago – IL, USA) and GraphPad Prism™ version 7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla – CA, USA). Continuous variables were expressed as mean ± standard deviation (SD) or as median and interquartile range when appropriate. Categorical variables were expressed as frequency and percentage. We used the Mann-Whitney test to access differences between study group and control group. Wilcoxon signed-rank test was used do evaluate differences within de study group before and after PMC. To access the impact of the hemodynamics profile in the level of cytokines, we performed the Spearman correlation analysis to examine the relation between the levels of the cytokines that presented significant variation after PMC with the mitral valve area (MVA). Univariate analyses were performed with the Cox's proportional hazard regression model to determine associations between serum cytokines before and after PMC and the combined endpoint of cardiovascular death, repeated PMC, mitral valve surgery and development of AF. A two-tailed P value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS:

Baseline characteristics of patients are presented in Table 1. There were statistically significant differences between patient and control subjects regarding age and gender.

One of the 18 patients developed severe MR requiring emergent mitral valve replacement and did not undergo blood collection. Another patient did not have the second blood sample obtained. Fourteen patients (77.8%) obtained success, defined as valve area ≥ 1.5 cm² without increasing in MR degree. Complications occurred in seven patients (38.9%), including three cases of puncture site hematoma (16.7%), one case of acute AF (5.6%) and three cases of severe MR (16.7%). Echocardiographic data before and after PMC are presented in Table 2.

Cytokine profiles pre and post valve intervention

Plasma levels of cytokines in control group and in MS group pre and post-PMC are presented in Table 3.

As demonstrated in Figure 1, there was no significant difference in the levels of growth factors and proliferative factors among MS pre-PMC group and the control group, except for PDGF, that was significantly higher in MS pre-PMC group.

Comparisons in plasma levels of growth factors PDGF, VEGF and FGF basic, and in plasma levels of proliferative factors IL-15, IL-7 and IL-2 showed a reduction of these molecules post-PMC, as compared to pre-PMC.

Levels of all chemokines were higher in MS pre-PMC group, as compared to control group (Figure 2). However, post-PMC, there was a statistically significant reduction only in the level of eotaxin.

The inflammatory cytokines IL-1 β , IFN- γ and IL-17 were higher in MS pre-PMC group compared to the control group, as presented in Figure 3. However, the levels of IL-12p70 and IL-6 were lower in MS pre-PMC. Post-PMC, the levels of IL-1 β , IL-12p70 and IL-6 had a statistically significant decrease.

The levels of down-regulatory cytokines and Th2 cytokines are presented in Figure 4. The levels of IL-1RA and IL-4 were higher in MS pre-PMC group compared to the control group, whereas the levels of IL-13 were lower in MS pre-PMC. The levels of IL-10 and IL-5 did not show statistically significant difference between MS pre-PMC

group and control group. Post-PMC, there was a statistically significant decrease in the levels of IL-4 and IL-5.

Finally, IL-9 showed no difference between pre-PMC group and control group and did not change after PMC.

Levels of cytokines according to mitral valve area changing

We also correlated the levels of cytokines that presented a significant decrease after PMC (i.e., PDGF, VEGF, FGF basic, IL-15, IL-7, IL-2, eotaxin, IL-1 β , IL-12p70, IL-6, IL-4 and IL-5) with MVA. Interestingly, while no correlation was found amongst most molecules and MVA, we found statistically significant negative correlation between VEGF with MVA, as demonstrated in Figure 5.

Long-term outcome

During a median follow-up period of 515 days (interquartile range 116-612), none of the patients died, and none had to repeat PMC. Three patients developed MR and underwent mitral valve replacement, one immediately after intervention, one 10 days after the procedure and one 107 days after. One patient who had successful PMC developed restenosis of mitral valve combined with severe MR and underwent mitral valve surgery 811 days after PMC. One patient had a stroke 131 days after the procedure. At the end of follow up, the majority of the patients (88.9%) were in NYHA class I. There was no association between cytokine levels and the composite endpoint of cardiovascular death, repeated PMC, mitral valve surgery, stroke and development of AF, as presented in Table 4.

DISCUSSION:

To our knowledge, this is the first study to evaluate the impact of PMC in plasma levels of a wide range of cytokines, chemokines and growth factors. Our data demonstrates that levels of innate cell-derived inflammatory cytokines significantly decreased after PMC, while IL-10 and IL-1RA levels did not change. This suggests that the normalization of hemodynamic parameters leads to less inflammation, pointing to the usefulness of innate-derived cytokines as markers of clinical improvement.

Rajamannan et al (23) hypothesized that the mechanism of valvular calcification included the neoangiogenesis in the valve tissue and demonstrated the presence of VEGF in rheumatic valves. In our study, however, while there was a tendency to a slight increase in the growth factors in MS group, there was no significant difference in the levels of growth factors and proliferative factors among patients and controls. It likely is due to the chronic stage of the disease. Nevertheless, we demonstrated a decrease in plasma levels of PDGF, VEGF, FGF basic, IL-2, IL-7 and IL-15 after PMC, probably due to hemodynamic improvement. Interestingly, the levels of VEGF were negatively correlated with MVA, suggesting that VEGF may be useful as a marker of clinical improvement.

It is known that specific chemokines can mediate both the CD4+ and CD8+ T cell recruitment to the site of inflammation in the heart (22). We showed that the plasma levels of all chemokines studied were higher in the MS pre-PMC group compared to control group, possibly related to the ongoing inflammation. Levels of most chemokines, with exception of eotaxin, did not decrease post-PMC. While eotaxin is primarily involved in the recruitment of eosinophils, the other chemokines promote the recruitment of monocytes and lymphocytes (24). Given eotaxin is also involved in recruitment of neutrophils, which are the first ones to respond in inflammatory settings, it is reasonable to think that the normalization of the hemodynamics will impact this network of neutrophil response faster than the network related to recruitment of other cells. Thus, it is possible that levels of other chemokines would decrease after a longer period post-PMC.

Our study also provided important data to understanding the balance between inflammatory and down-regulatory cytokines in late chronic RHD. First, we compared the plasma levels of cytokines in MS pre-PMC and controls. The higher levels of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-17 and IFN- γ in MS pre-PMC compared to control group demonstrate ongoing inflammation.

IL-17 is a potent pro-inflammatory molecule that has an important effect in mediating chronic inflammation and in the development of autoimmune diseases, including multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, asthma and psoriasis (25). This is an interesting finding, given the auto-immune theory in the pathogenesis of RHD. On the other hand, the levels of IL-12p70 and IL-6 were lower in MS pre-PMC, and there was no difference between groups in the levels of TNF- α .

Consistent with our findings, previous studies have demonstrated that the levels of IL-6 and TNF- α decrease in this phase of the disease (7, 8). Moreover, we also demonstrated that the levels of the down-regulatory cytokines IL-1RA and IL-4 were higher in MS pre-PMC compared to control, suggesting that these cytokines are important in this phase of disease, possibly to counterbalance inflammation. While IL-1RA controls inflammation mediated by innate cells and T-lymphocytes in general (24), IL-4 is able to control Th1-mediated inflammation, which has been associated with RHD by other authors.

We then evaluated the levels of inflammatory cytokines comparing MS pre- and post-PMC. IL-12, IL-1 β and IL-6 are cytokines produced primarily by monocytes/macrophages. It was interesting to observe that the levels of these inflammatory cytokines related to the innate response decreased after PBMV, while the levels of most T-cell derived cytokines did not change. Improvement of hemodynamic parameters after PMC may be responsible for this decrease, and this improvement might interfere first with innate immune response decreasing inflammatory cytokines, and later in adaptive responses. We also expected a decrease in the levels of TNF- α and IFN- γ , as demonstrated by Cagli *et al*, who showed that TNF- α level progressively decreased at the 24th hour until the 4th week after PMC (19). However, it is important to point out that Cagli *et al* evaluated only patients in sinus rhythm and with no other comorbidity. It is possible that, in our group, the levels of TNF obey a different kinetics than the one observed by those authors.

Comparing the levels of down-regulatory cytokines, IL-10 and IL-1RA, between MS pre- and post-PMC groups, we observed that levels of IL-10 and IL-1RA did not change significantly. IL-10 is an important immunoregulatory cytokine. It is produced by T-regulatory type 1 (Tr1) cells, which are a subset of Tregs that inhibits the production of pro-inflammatory Th1 cytokines. IL-1RA is a natural antagonist of IL-1 that is produced by mononuclear phagocytes. Its synthesis is induced by many of the same stimuli that induce IL-1 production, and some studies suggest that this inhibitory cytokine is required to prevent inflammatory diseases (24). The fact that the levels of these down-regulatory cytokines did not change after PMC is probably associated with the reduction in inflammation observed post-PMC. The levels of IL-4 and IL-5, which are Th2-type cytokines, and also produced by innate cells such as eosinophils (24), decreased after PMC. Although it is not possible to affirm that these cytokines come

from eosinophils in these patients, given the observed decrease in eotaxin and the decrease in IL-4 and IL-5, it is possible to hypothesize that PMC decreases activation of eosinophils. Indeed, there were strong correlations between eotaxin and both IL-4 ($r = 0.87$) and IL-5 ($r = 0.88$).

In conclusion, our results have shown a decrease in the serum levels of various cytokines after PMC, which may be related to improved post procedural hemodynamic parameters. Importantly, we found negative correlation between mitral valve area and VEGF, pointing to a more prominent role for this molecule in clinical improvement. It is worthy to mention that none of the cytokines studied increased after the procedure. The decrease in innate-derived cytokines seem to be associated with a rapid hemodynamic recovery induced by successful PMC, and may be useful markers of clinical improvement.

STUDY LIMITATIONS:

Our study has some limitations. First, the small patient sample. However, our sample size was similar to other studies that also evaluated change in plasma levels of biomarkers before and post PMC. Second, our control group was not age and gender matched to study group. Third, the effects on long-term changes in the level of biomarkers post PMC have not been evaluated.

REFERENCES:

1. 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: The University of Oklahoma Health Sciences Center.; 2016.
2. Guilherme L, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease. *Journal of clinical immunology*. 2010 Jan;30(1):17-23. PubMed PMID: 19802690. Epub 2009/10/06. eng.
3. Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, Jouven X. Rheumatic heart disease. *Lancet (London, England)*. 2012 Mar 10;379(9819):953-64. PubMed PMID: 22405798. Epub 2012/03/13. eng.
4. 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 Aug 24;377(8):713-22. PubMed PMID: 28834488. Epub 2017/08/24. eng.
5. Guilherme L, Ramasawmy R, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: genetics and pathogenesis. *Scandinavian journal of immunology*. 2007 Aug-Sep;66(2-3):199-207. PubMed PMID: 17635797. Epub 2007/07/20. eng.
6. Sharma N, Toor D. Interleukin-10: Role in increasing susceptibility and pathogenesis of rheumatic fever/rheumatic heart disease. *Cytokine*. 2017 Feb;90:169-76. PubMed PMID: 27918954. Epub 2016/12/06. eng.
7. Azevedo PM, Pereira RR, Guilherme L. Understanding rheumatic fever. *Rheumatology international*. 2012 May;32(5):1113-20. PubMed PMID: 21953302. Epub 2011/09/29. eng.
8. Toor D, Vohra H. Immune responsiveness during disease progression from acute rheumatic fever to chronic rheumatic heart disease. *Microbes Infect*. 2012 Oct;14(12):1111-7. PubMed PMID: 22796386. Epub 2012/07/17. eng.
9. Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Muller F, Andreassen AK, et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *The American journal of cardiology*. 1999 Feb 1;83(3):376-82. PubMed PMID: 10072227. Epub 1999/03/11. eng.

10. Hirota H, Izumi M, Hamaguchi T, Sugiyama S, Murakami E, Kunisada K, et al. Circulating interleukin-6 family cytokines and their receptors in patients with congestive heart failure. *Heart and vessels*. 2004 Sep;19(5):237-41. PubMed PMID: 15372299. Epub 2004/09/17. eng.
11. Satoh S, Oyama J, Suematsu N, Kadokami T, Shimoyama N, Okutsu M, et al. Increased productivity of tumor necrosis factor-alpha in helper T cells in patients with systolic heart failure. *Int J Cardiol*. 2006 Aug 28;111(3):405-12. PubMed PMID: 16271779. Epub 2005/11/08. eng.
12. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *The New England journal of medicine*. 1990 Jul 26;323(4):236-41. PubMed PMID: 2195340. Epub 1990/07/26. eng.
13. Fukunaga T, Soejima H, Irie A, Sugamura K, Oe Y, Tanaka T, et al. Expression of interferon-gamma and interleukin-4 production in CD4+ T cells in patients with chronic heart failure. *Heart and vessels*. 2007 May;22(3):178-83. PubMed PMID: 17533522. Epub 2007/05/30. eng.
14. Tarasoutchi F, Montera MW, Grinberg M, Pineiro DJ, Sanchez CR, Bacelar AC, et al. [Brazilian Guidelines for Valve Disease - SBC 2011 / I Guideline Inter-American Valve Disease - 2011 SIAC]. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(5 Suppl 1):1-67. PubMed PMID: 22286365. Epub 2011/01/01. Diretriz Brasileira de Valvopatias - SBC 2011/ I Diretriz Interamericana de Valvopatias - SIAC 2011. por.
15. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, et al. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *European heart journal*. 2017 Sep 21;38(36):2739-91. PubMed PMID: 28886619. Epub 2017/09/10. eng.
16. Inoue K, Owaki T, Nakamura T, Kitamura F, Miyamoto N. Clinical application of transvenous mitral commissurotomy by a new balloon catheter. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1984 Mar;87(3):394-402. PubMed PMID: 6700245. Epub 1984/03/01. eng.
17. 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 Jun 10;129(23):2440-92. PubMed PMID: 24589852. Epub 2014/03/05. eng.

18. Varma PK, Theodore S, Neema PK, Ramachandran P, Sivadasanpillai H, Nair KK, et al. Emergency surgery after percutaneous transmitral commissurotomy: operative versus echocardiographic findings, mechanisms of complications, and outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Sep;130(3):772-6. PubMed PMID: 16153927. Epub 2005/09/13. eng.
19. Cagli KE, Aras D, Topaloglu S, Geyik B, Ayaz S, Cagirci G, et al. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in patients with mitral stenosis and sinus rhythm undergoing percutaneous balloon valvuloplasty. *Heart and vessels.* 2010 Mar;25(2):131-7. PubMed PMID: 20339974. Epub 2010/03/27. eng.
20. Yetkin E, Erbay AR, Turhan H, Ileri M, Ayaz S, Atak R, et al. Decreased platelet activation and endothelial dysfunction after percutaneous mitral balloon valvuloplasty. *Int J Cardiol.* 2003 Oct;91(2-3):221-5. PubMed PMID: 14559134. Epub 2003/10/16. eng.
21. Yetkin E, Erbay AR, Turhan H, Balci M, Yetkin F, Yetkin G, et al. Changes in plasma levels of adhesion molecules after percutaneous mitral balloon valvuloplasty. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology.* 2004 Mar-Apr;13(2):103-8. PubMed PMID: 15033160. Epub 2004/03/23. eng.
22. Guilherme L, Kalil J. Rheumatic Heart Disease: Molecules Involved in Valve Tissue Inflammation Leading to the Autoimmune Process and Anti-S. pyogenes Vaccine. *Frontiers in immunology.* 2013 Oct 30;4:352. PubMed PMID: 24198818. Pubmed Central PMCID: PMC3812567. Epub 2013/11/08. eng.
23. Rajamannan NM, Nealis TB, Subramaniam M, Pandya S, Stock SR, Ignatiev CI, et al. Calcified rheumatic valve neoangiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression and osteoblast-like bone formation. *Circulation.* 2005 Jun 21;111(24):3296-301. PubMed PMID: 15956138. Pubmed Central PMCID: PMC3951870. Epub 2005/06/16. eng.
24. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. Cellular and molecular immunology2018.
25. Bilik MZ, Kaplan I, Polat N, Akil MA, Akyuz A, Acet H, et al. Serum Levels of IL-17 and IL-23 in Patients With Rheumatic Mitral Stenosis. *Medicine (Baltimore).* 2016 May;95(18):e3562. PubMed PMID: 27149476. Pubmed Central PMCID: PMC4863793. Epub 2016/05/07. eng.

Table 1: Baseline characteristics of patients with mitral stenosis and healthy control subjects

Characteristics	MS group (n = 18)	Control group (n = 12)
Age (years)	49.28 ± 2.45	17.25 ± 0.13
Female sex, n (%)	16 (88.9%)	4 (33.3%)
Age at diagnostic (years)	35.6 ± 3.28	-
Functional class NYHA I / II / III / IV, n (%)	4 (22.2%) / 8 (44.4%) / 4 (22.2%) / 2 (11.1%)	-
Wilkins score	7 (7-8)	-
Atrial fibrillation, n (%)	8 (44.4%)	-
History of embolic events, n (%)	2 (11.1%)	-
History of heart failure admission, n (%)	9 (50.0%)	-
Diabetes mellitus, n (%)	4 (22.2%)	-
Hypertension, n (%)	8 (44.4%)	-
History of valve intervention, n (%)	5 (27.8%)	-
Diuretics, n (%)	14 (77.8%)	-
Beta Blocker, n (%)	14 (77.8%)	-
Digital, n (%)	2 (11.1%)	-
Warfarin, n (%)	6 (33.3%)	-
Aspirin, n (%)	2 (11.1%)	-
Antibiotic prophylaxis		
current, n (%)	4 (22.2%)	-
previous, n (%)	10 (55.6%)	-

Data are presented as mean ± SD or as median and interquartile range (Q1-Q3). PMC = percutaneous mitral commissurotomy; NYHA: New York Heart Association;

Table 2: Echocardiographic data pre and post-PMC

VARIABLES	Pre-PMC	Post-PMC	P value
MVA (cm ²)	1.06 (0.99-1.32)	1.90 (1.65-2.00)	0.001
MMG (mmHg)	8.50 (7.00-10.00)	6.00 (4.00-7.00)	0.009
SPAP (mmHg)	39.00 (35.5-50.5)	34.00 (29.00-38.00)	0.013
EF (%)	65.50 (60.00-69.25)	66.00 (63.00-69.50)	0.208

Data are presented as median and interquartile range (Q1-Q3). PMC = percutaneous mitral commissurotomy; MVA = Mitral valve area; MMG = Mean mitral gradient; SPAP = systolic pulmonary artery pressure ; EF = Ejection fraction

Table 3: Levels of cytokines in control group and study group pre and post-PMC

VARIABLES	Control group	Pre-PMC	P value (control vs pre- PMC)	Post-PMC	P value (pre vs post- PMC)
GM-CSF	18.00 (15.25-18,88)	17.00 (13.00-21.25)	0.547	14.00 (12.00-18.00)	0.062
G-CSF	32.50 (29.75-41.75)	51.00 (32.50-77.00)	0.099	30.00 (31.00-56.00)	0.142
PDGF	123.50 (50.13-193.00)	819.50 (199.00-1809.50)	0.001	314.00 (210.00-1033.00)	0.023
VEGF	21.50 (21.00-26.50)	23.00 (16.75-34.25)	0.836	17.00 (15.50-24.00)	0.025
FGF basic	19.50 (17.75-21.38)	24.00 (18.50-36.50)	0.099	21.50 (17.00-29.00)	0.011
IL-2	16.00 (15.00-17.00)	17.00 (13.25-22.50)	0.533	14.00 (13.00-19.00)	0.005
IL-7	23.00 (21.63-23.75)	22.00 (20.00-23.25)	0.573	19.00 (18.00-22.50)	0.025
IL-15	24.00 (23.35-25.75)	20.00 (18.75-26.50)	0.108	20.00 (18.00-21.50)	0.032
IP-10	685.30 (364.60-1104.00)	1280.00 (690.30-1971.00)	0.029	1088 (625.00-1815.00)	0.051
MCP-1	44.50 (24.00-53.63)	171.00 (69.00-356.80)	<0,001	127.00 (48.00-324.00)	0.203
MIP-1 α	32.50 (25.13-45.63)	374.50 (98.00-6394.00)	<0.001	212.00 (82.50-1513.00)	0.064
MIP-1 β	329.00 (318.40-440.50)	1265.00 (735.50-2303.50)	<0.001	1018 (575.50-1586.00)	0.159
Eotaxin	519.80 (453.80-924.80)	2533.00 (447.50-3614.00)	0.029	1965.50 (301.00-2971.25)	0.009
RANTES	1662.00 (1427.00-1824.00)	2574.00 (1738.00-2995.00)	0.016	2377.00 (1732.00-3004.00)	0.404
IL-8	28.00 (26.25-36.00)	65.00 (33.25-466.80)	0.009	29.00 (25.25-58.25)	0.144
IL-1 β	16.50 (16.00-18.38)	23.00 (18.25-25.50)	0.013	17.00 (15.50-23.50)	0.021
IL-6	19.00 (17.50-20.00)	13.00 (12.50-18.00)	0.015	12.00 (11.00-15.00)	0.004

IL-12p70	18.00 (17.25-24.75)	15.50 (13.50-18.00)	0.008	14.00 (13.50-15.50)	0.009
IL-17	25.50 (24.00-29.00)	61.50 (29.25-92.50)	<0.001	40.00 (31.00-73.00)	0.056
TNF- α	28.25 (23.63-36.88)	22.00 (15.75-31.00)	0.131	19.00 (13.75-26.50)	0.096
IFN-γ	15.50 (13.00-16.00)	23.00 (16.75-42.00)	<0.001	20.50 (16.50-37.25)	0.129
IL-10	17.50 (16.13-21.75)	16.00 (13.00-21.50)	0.085	14.00 (12.00-23.50)	0.882
IL-1ra	21.00 (21.00-25.00)	270.00 (154.75-1057.00)	<0.001	282.00 (143.00-654.80)	0.306
IL-4	29.00 (22.50-34.13)	136.00 (49.00-178.00)	0.003	99.00 (48,50-175.50)	0.009
IL-5	16.00 (14.00-19.88)	18.00 (13.50-23.75)	0.374	15.00 (12.50-19.75)	0.005
IL-13	19.00 (17.13-19.00)	15.00 (13.00-17.75)	0.014	14.00 (13.00-16.00)	0.089
IL-9	46.50 (42.50-49.25)	42.00 (34.00-49.00)	0.176	35.00 (30.00-40.25)	0.098

Data are presented as median and interquartile range (Q1-Q3). PMC = percutaneous mitral commissurotomy

Table 4: Prognosis factors in univariate analysis.

VARIABLES	Pre-PMC				Post-PMC			
	β	HR	95% CI	P value	β	HR	95% CI	P value
GM-CSF	0.053	1.054	0.883-1.259	0.560	-0.088	0.916	0.675-1.243	0.573
G-CSF	-0.018	0.982	0.940-1.026	0.418	-0.107	0.899	0.770-1.049	0.176
PDGF	-0.001	0.999	0.998-1.001	0.284	-0.001	0.999	0.996-1.001	0.410
VEGF	0.046	1.047	0.943-1.162	0.387	0.11	1.011	0.894-1.144	0.858
FGF basic	0.006	1.006	0.938-1.079	0.874	-0.003	0.997	0.898-1.107	0.962
IL-2	0.011	1.011	0.896-1.141	0.853	-0.135	0.874	0.633-1.207	0.414
IL-7	0.038	1.039	0.793-1.360	0.783	-0.03	0.997	0.869-1.144	0.967
IL-15	0.060	1.062	0.885-1.274	0.517	-0.095	0.910	0.613-1.349	0.638
IP-10	0.000	1.000	0.999-1.001	0.742	0.000	1.000	0.999-1.001	0.348
MCP-1	-0.002	0.998	0.993-1.003	0.477	-0.005	0.995	0.984-1.005	0.321
MIP-1 α	0.000	1.000	1.000-1.000	0.479	-0.001	0.999	0.996-1.002	0.486
MIP-1 β	0.000	1.000	0.999-1.001	0.887	-0.001	0.999	0.997-1.001	0.341
Eotaxin	0.000	1.000	1.000-1.000	0.515	0.000	1.000	0.999-1.001	0.926
RANTES	0.000	1.000	0.998-1.001	0.611	-0.001	0.999	0.998-1.001	0.413
IL-8	0.000	1.000	0.999-1.002	0.785	-0.023	0.977	0.921-1.037	0.448

IL-1 β	-0.300	0.970	0.835-1.128	0.695	-0.091	0.913	0.717-1.163	0.462
IL-6	0.044	1.045	0.878-1.244	0.617	-0.006	0.994	0.756-1.306	0.965
IL-12p70	-0.064	0.938	0.638-1.380	0.747	-0.187	0.829	0.452-1.521	0.545
IL-17	0.004	1.004	0.984-1.024	0.700	-0.001	0.999	0.971-1.028	0.952
TNF- α	0.012	1.012	0.983-1.042	0.416	-0.072	0.930	0.809-1.069	0.308
IFN- γ	-0.13	0.987	0.918-1.061	0.718	-0.046	0.955	0.853-1.070	0.430
IL-10	0.008	1.008	0.870-1.168	0.917	0.070	1.073	0.948-1.214	0.264
IL-1ra	0.000	1.000	0.999-1.001	0.852	0.002	1.002	1.000-1.003	0.082
IL-4	0.002	1.002	0.993-1.011	0.663	0.000	1.000	0.989-1.010	0.957
IL-5	0.020	1.020	0.867-1.199	0.813	-0.065	0.937	0.760-1.155	0.541
IL-13	0.012	1.012	0.745-1.374	0.940	-0.026	0.974	0.654-1.451	0.898
IL-9	-0.005	0.995	0.952-1.040	0.818	-0.013	0.987	0.929-1.049	0.679

PMC = percutaneous mitral commissurotomy.

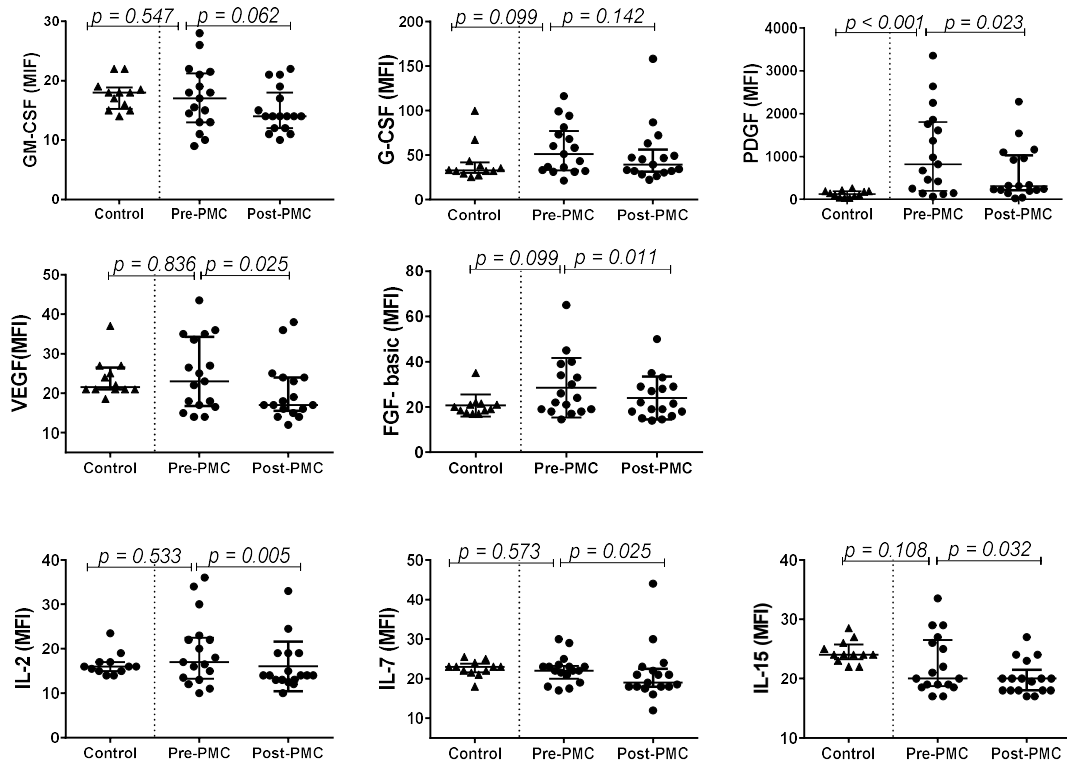


Figure 1: Difference in the levels of growth factors and proliferative factors among control group and MS pre and post-PMC group

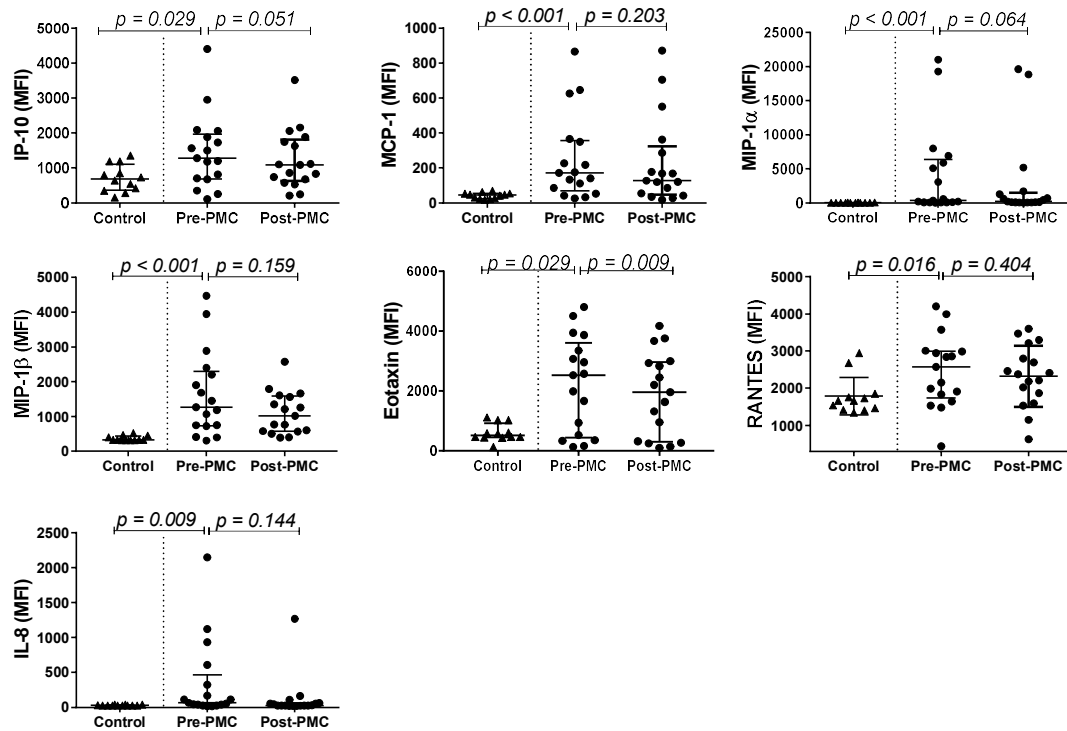


Figure 2: Difference in the levels of chemokines among control group and MS pre and post-PMC group

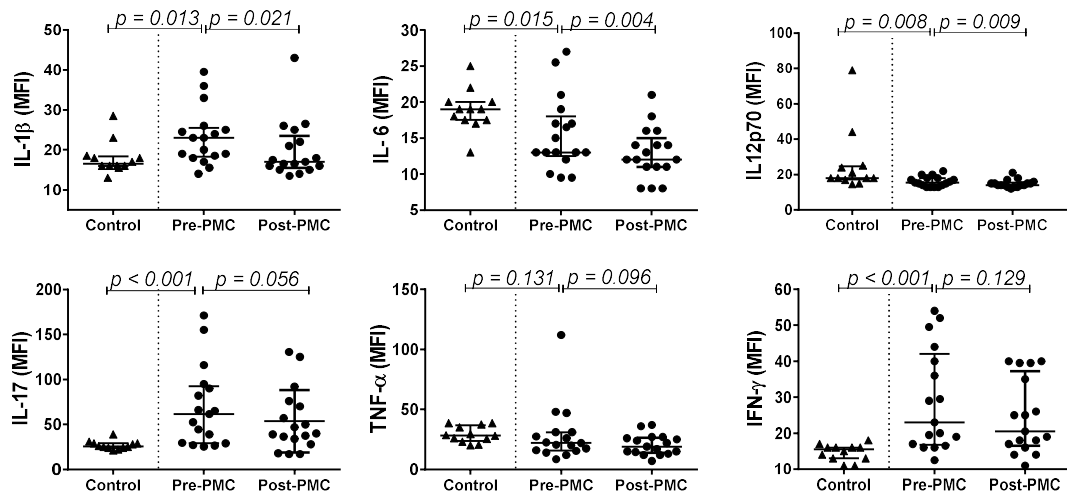


Figure 3: Difference in the levels of inflammatory cytokines among control group and MS pre and post-PMC group

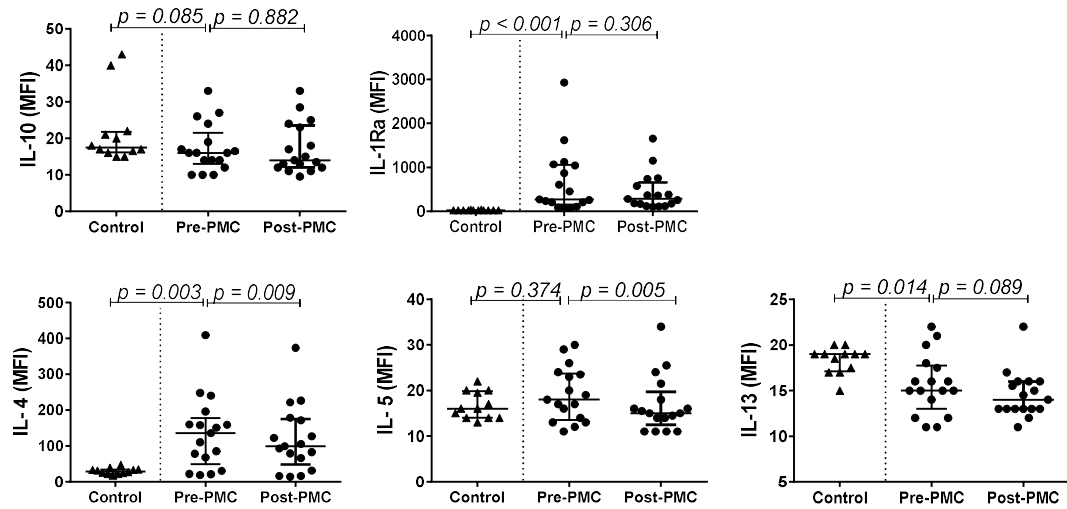


Figure 4: Difference in the levels of down-regulatory and Th2 cytokines among control group and MS pre and post-PMC group

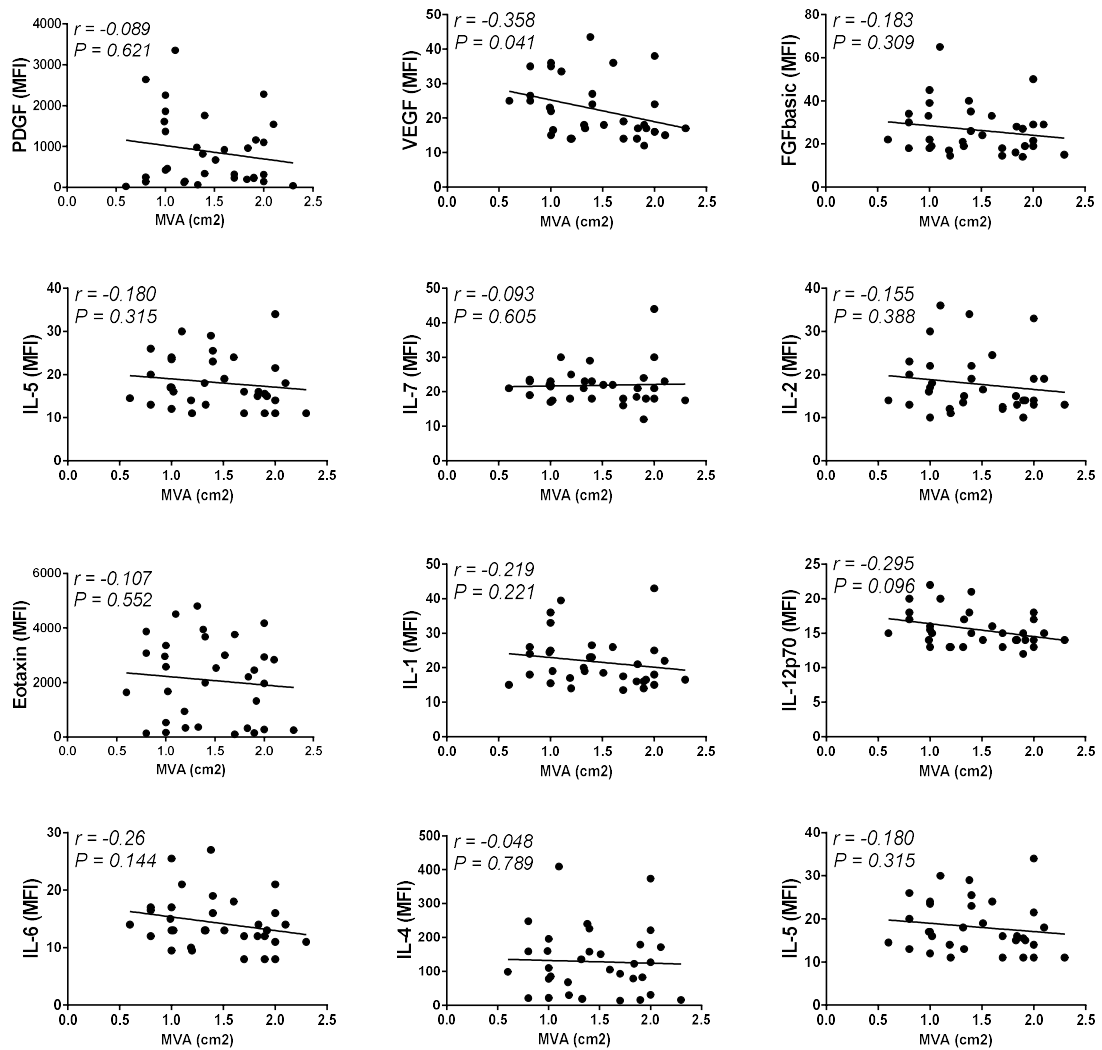


Figure 5: Correlation between the levels of the cytokines that presented significant variation post-PMC with the mitral valve area (MVA)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compreensão dos mecanismos de resposta imunológica na cardiopatia reumática é de suma importância para identificar marcadores prognósticos da doença e estabelecer possíveis alvos terapêuticos.

Embora já houvessem estudos que visassem demonstrar alterações de marcadores inflamatórios após a VMPB, esse é o primeiro estudo na literatura que abrange um número tão amplo de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.

Nossos resultados mostram uma redução no nível sérico de várias citocinas após VMPB, o que atribuímos à melhora dos parâmetros hemodinâmicos após o procedimento. Entretanto, a área valvar mitral foi correlacionada apenas com os níveis de VEGF. De forma interessante, nenhuma das citocinas estudadas apresentou elevação em seu nível sérico, indicando que a injúria do endotélio valvar causada pelo procedimento não induz atividade inflamatória entre 4 e 11 dias após sua realização.

Nosso estudo tem algumas limitações importantes. Primeiro, devemos destacar o pequeno número de pacientes estudados, embora o número amostral do nosso estudo seja semelhante ao de outros estudos que também analisaram variações no nível sérico de citocinas após VMPB. Segundo, os pacientes no grupo do estudo apresentavam diferença estatisticamente significativa em relação a idade e sexo em relação ao grupo controle. Por fim, os efeitos a longo prazo no nível de biomarcadores após VMPB não foi avaliado.

Apesar dessas limitações, nosso estudo vem contribuir para a compreensão da evolução da cardiopatia reumática e dos efeitos da VMPB na resposta inflamatória dos pacientes. Merece destacar que esse estudo abre perspectivas para avaliar a progressão da estenose após abertura adequada da valva com o procedimento percutâneo. A reestenose valvar constitui o principal fator determinante da sobrevida livre de eventos após intervenção.

REFERÊNCIAS

1. Guilherme L, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease. *Journal of clinical immunology*. 2010 Jan;30(1):17-23. PubMed PMID: 19802690. Epub 2009/10/06. eng.
2. 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: The University of Oklahoma Health Sciences Center.; 2016.
3. 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 Aug 24;377(8):713-22. PubMed PMID: 28834488. Epub 2017/08/24. eng.
4. Tarasoutchi F, Montera M, Grinberg M, Barbosa M, Piñeiro D, Sánchez C, et al. Diretriz Brasileira de Valvopatias - SBC 2011/ I Diretriz Interamericana de Valvopatias - SIAC 2011. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2011;97:01-67.
5. Barbosa PJB, Mülle RE, Andrade J, Braga A, Achutti A, Ramos A. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico, tratamento e prevenção da febre reumática. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2009 09;93(3):3-18. PubMed PMID: SCIELO:S0066-782X2009002100001. Portuguese.
6. Meira ZM, Goulart EM, Colosimo EA, Mota CC. Long term follow up of rheumatic fever and predictors of severe rheumatic valvar disease in Brazilian children and adolescents. *Heart*. 2005 Aug;91(8):1019-22. PubMed PMID: 16020588. Pubmed Central PMCID: PMC1769032. Epub 2005/07/16. eng.
7. Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon AC, Jr., Faxon DP, Freed MD, et al. 2008 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *Circulation*. 2008 Oct 7;118(15):e523-661. PubMed PMID: 18820172. Epub 2008/09/30. eng.

8. Ministério da Saúde / DATASUS - Departamento de Informática do SUS. Estatísticas vitais: Mortalidade. [Internet]. [cited 05/18/2019]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.
9. Ministério da Saúde / DATASUS - Departamento de Informática do SUS. Morbidade hospitalar do SUS [Internet]. [cited 05/18/2019]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.
10. Sika-Paotonu D, Beaton A, Raghu A, Steer A, Carapetis J. Acute Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City OK: The University of Oklahoma Health Sciences Center.; 2016.
11. Yetkin E, Erbay AR, Turhan H, Balci M, Yetkin F, Yetkin G, et al. Changes in plasma levels of adhesion molecules after percutaneous mitral balloon valvuloplasty. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2004 Mar-Apr;13(2):103-8. PubMed PMID: 15033160. Epub 2004/03/23. eng.
12. Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, Jouven X. Rheumatic heart disease. *Lancet (London, England)*. 2012 Mar 10;379(9819):953-64. PubMed PMID: 22405798. Epub 2012/03/13. eng.
13. Haydardedeoglu FE, Tutkak H, Kose K, Duzgun N. Genetic susceptibility to rheumatic heart disease and streptococcal pharyngitis: association with HLA-DR alleles. *Tissue antigens*. 2006 Oct;68(4):293-6. PubMed PMID: 17026463. Epub 2006/10/10. eng.
14. Guilherme L, Köhler K, Pommerantzeff P, Spina G, Kalil J. Rheumatic heart disease: key points on valve lesions development. *J Clin Exp Cardiol S*. 2013;3:2.
15. Guilherme L, Ramasawmy R, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: genetics and pathogenesis. *Scandinavian journal of immunology*. 2007 Aug-Sep;66(2-3):199-207. PubMed PMID: 17635797. Epub 2007/07/20. eng.
16. Azevedo PM, Pereira RR, Guilherme L. Understanding rheumatic fever. *Rheumatology international*. 2012 May;32(5):1113-20. PubMed PMID: 21953302. Epub 2011/09/29. eng.
17. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. *Cellular and molecular immunology*2018.

18. Guilherme L, Kohler KF, Postol E, Kalil J. Genes, autoimmunity and pathogenesis of rheumatic heart disease. *Ann Pediatr Cardiol.* 2011 Jan;4(1):13-21. PubMed PMID: 21677799. Pubmed Central PMCID: PMC3104525. Epub 2011/06/17. eng.
19. Sharma N, Toor D. Interleukin-10: Role in increasing susceptibility and pathogenesis of rheumatic fever/rheumatic heart disease. *Cytokine.* 2017 Feb;90:169-76. PubMed PMID: 27918954. Epub 2016/12/06. eng.
20. Toor D, Vohra H. Immune responsiveness during disease progression from acute rheumatic fever to chronic rheumatic heart disease. *Microbes Infect.* 2012 Oct;14(12):1111-7. PubMed PMID: 22796386. Epub 2012/07/17. eng.
21. Chen MC, Chang HW, Wu CJ, Yang CH, Yu TH, Chen CJ, et al. Balance between Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 in Rheumatic Mitral Stenosis. *Cardiology.* 2005;104(4):171-5.
22. Leao SC, Lima MR, Nascimento HM, Octacilio-Silva S, Rodrigues TM. IL-10 and ET-1 as biomarkers of rheumatic valve disease. *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular.* 2014 Jan-Mar;29(1):25-30. PubMed PMID: 24896159. Pubmed Central PMCID: PMC4389480. Epub 2014/06/05. eng.
23. 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. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research.* 2014 Jan;62(1):78-83. PubMed PMID: 24158043. Epub 2013/10/26. eng.
24. Bilik MZ, Kaplan I, Polat N, Akil MA, Akyuz A, Acet H, et al. Serum Levels of IL-17 and IL-23 in Patients With Rheumatic Mitral Stenosis. *Medicine (Baltimore).* 2016 May;95(18):e3562. PubMed PMID: 27149476. Pubmed Central PMCID: PMC4863793. Epub 2016/05/07. eng.
25. Guilherme L, Fae KC, Oshiro SE, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Kalil J. Rheumatic fever: how *S. pyogenes*-primed peripheral T cells trigger heart valve lesions. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2005 Jun;1051:132-40. PubMed PMID: 16126952. Epub 2005/08/30. eng.
26. Davutoglu V, Celik A, Aksoy M. Contribution of selected serum inflammatory mediators to the progression of chronic rheumatic valve disease, subsequent valve calcification and NYHA functional class. *J Heart Valve Dis.* 2005 Mar;14(2):251-6. PubMed PMID: 15792187. Epub 2005/03/29. eng.

27. 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 Jun 10;129(23):2440-92. PubMed PMID: 24589852. Epub 2014/03/05. eng.
28. Inoue K, Owaki T, Nakamura T, Kitamura F, Miyamoto N. Clinical application of transvenous mitral commissurotomy by a new balloon catheter. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1984 Mar;87(3):394-402. PubMed PMID: 6700245. Epub 1984/03/01. eng.
29. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, et al. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *European heart journal*. 2017 Sep 21;38(36):2739-91. PubMed PMID: 28886619. Epub 2017/09/10. eng.
30. Nunes MC, Nascimento BR, Lodi-Junqueira L, Tan TC, Athayde GR, Hung J. Update on percutaneous mitral commissurotomy. *Heart*. 2016 Apr;102(7):500-7. PubMed PMID: 26743926. Epub 2016/01/09. eng.
31. Varma PK, Theodore S, Neema PK, Ramachandran P, Sivadasanpillai H, Nair KK, et al. Emergency surgery after percutaneous transmitral commissurotomy: operative versus echocardiographic findings, mechanisms of complications, and outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Sep;130(3):772-6. PubMed PMID: 16153927. Epub 2005/09/13. eng.
32. Bouleti C, Iung B, Laouenan C, Himbert D, Brochet E, Messika-Zeitoun D, et al. Late results of percutaneous mitral commissurotomy up to 20 years: development and validation of a risk score predicting late functional results from a series of 912 patients. *Circulation*. 2012 May 1;125(17):2119-27. PubMed PMID: 22456478. Epub 2012/03/30. eng.
33. Fawzy ME, Shoukri M, Al Buraiki J, Hassan W, El Widaal H, Kharabsheh S, et al. Seventeen years' clinical and echocardiographic follow up of mitral balloon valvuloplasty in 520 patients, and predictors of long-term outcome. *J Heart Valve Dis*. 2007 Sep;16(5):454-60. PubMed PMID: 17944115. Epub 2007/10/20. eng.
34. Ministério da Saúde / DATASUS - Departamento de Informática do SUS. Procedimentos hospitalares do SUS. [Internet]. [cited 05/18/2019]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def>.
35. Rifaie O, Omar AM, Abdel-Rahman MA, Raslan H. Does a chronic inflammatory state have a role in the development of mitral restenosis after balloon mitral valvuloplasty? *Int J Cardiol*. 2014 Apr 1;172(3):e417-8. PubMed PMID: 24461487. Epub 2014/01/28. eng.

36. Song JK, Song JM, Kang DH, Yun SC, Park DW, Lee SW, et al. Restenosis and adverse clinical events after successful percutaneous mitral valvuloplasty: immediate post-procedural mitral valve area as an important prognosticator. *European heart journal*. 2009 May;30(10):1254-62. PubMed PMID: 19346230. Epub 2009/04/07. eng.
37. Bouleti C, Iung B, Himbert D, Brochet E, Messika-Zeitoun D, Detaint D, et al. Reinterventions after percutaneous mitral commissurotomy during long-term follow-up, up to 20 years: the role of repeat percutaneous mitral commissurotomy. *European heart journal*. 2013 Jul;34(25):1923-30. PubMed PMID: 23514935. Epub 2013/03/22. eng.
38. Cagli KE, Aras D, Topaloglu S, Geyik B, Ayaz S, Cagirci G, et al. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in patients with mitral stenosis and sinus rhythm undergoing percutaneous balloon valvuloplasty. *Heart and vessels*. 2010 Mar;25(2):131-7. PubMed PMID: 20339974. Epub 2010/03/27. eng.
39. Yetkin E, Erbay AR, Turhan H, Ileri M, Ayaz S, Atak R, et al. Decreased platelet activation and endothelial dysfunction after percutaneous mitral balloon valvuloplasty. *Int J Cardiol*. 2003 Oct;91(2-3):221-5. PubMed PMID: 14559134. Epub 2003/10/16. eng.
40. Chen MC, Chang HW, Wu CJ, Yang CH, Hung WC, Yeh KH, et al. Percutaneous transluminal mitral valvuloplasty reduces circulating soluble CD40 ligand in rheumatic mitral stenosis. *Chest*. 2005 Jul;128(1):36-41. PubMed PMID: 16002913. Epub 2005/07/09. eng.