

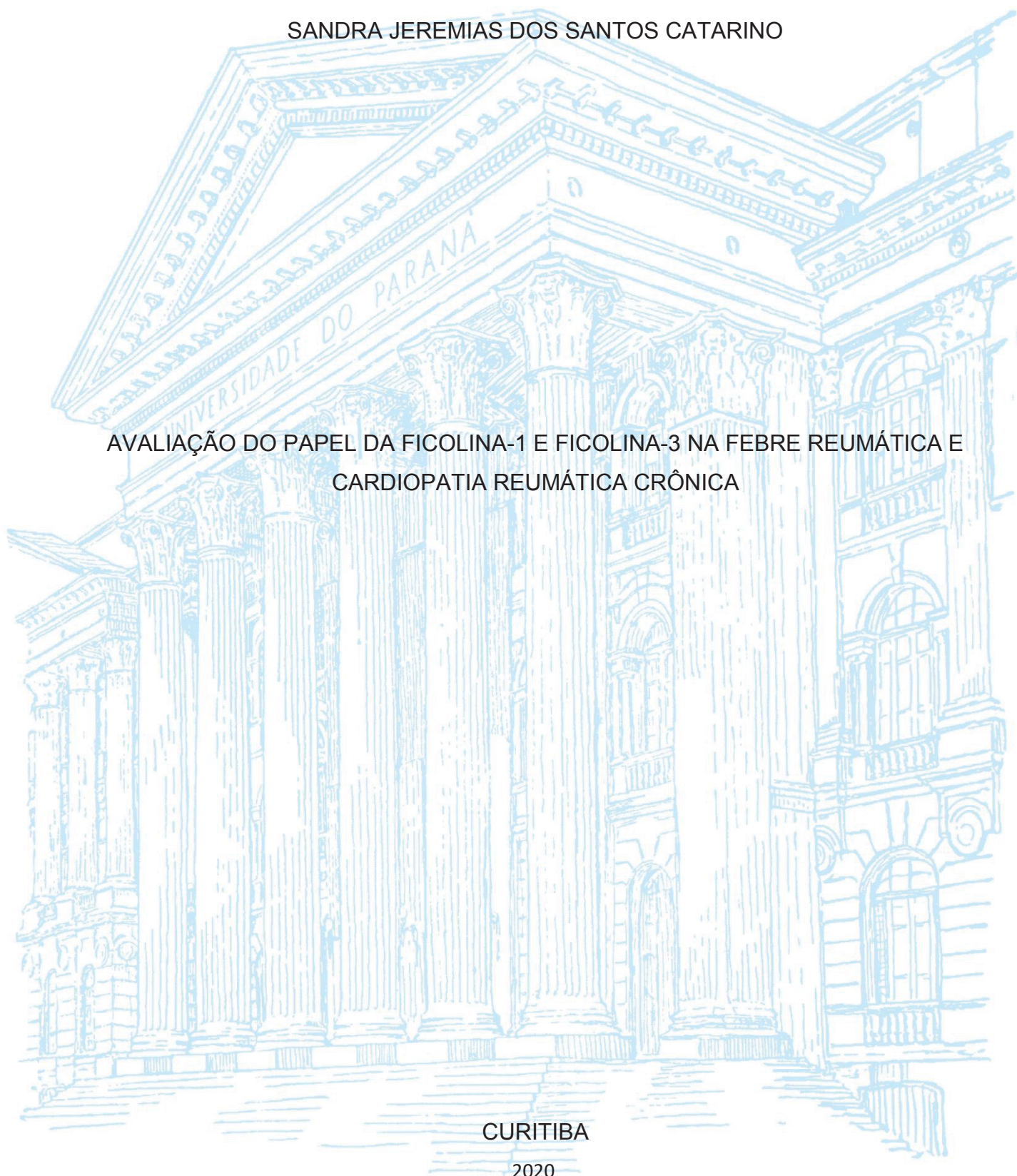
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SANDRA JEREMIAS DOS SANTOS CATARINO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FICOLINA-1 E FICOLINA-3 NA FEBRE REUMÁTICA E  
CARDIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA

CURITIBA

2020



SANDRA JEREMIAS DOS SANTOS CATARINO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FICOLINA-1 E FICOLINA-3 NA FEBRE REUMÁTICA E  
CARDIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Interna.

Orientadora: Prof. Dra. Iara J. Messias Reason

Coorientadora: Prof. Dra. Fabiana Antunes Andrade

CURITIBA

2020

C357 Catarino, Sandra Jeremias dos Santos

Avaliação do papel da Ficolina-1 e Ficolina-3 na febre reumática e cardiopatia reumática crônica [recurso eletrônico] / Sandra Jeremias dos Santos Catarino. – Curitiba, 2020.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iara J. Messias Reason

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Antunes Andrade

1. Febre reumática. 2. Cardiopatia reumática. 3. Proteínas do sistema complemento. 4. Lectinas. I. Reason, Messias Iara J. II. Andrade, Fabiana Antunes. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLM: WC 220



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E  
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **SANDRA JEREMIAS DOS SANTOS CATARINO** intitulada: **AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FICOLINA-1 E FICOLINA-3 NA FEBRE REUMÁTICA E CARDIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA.**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 15 de Setembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

15/09/2020 16:50:37.0

FABIANA ANTUNES DE ANDRADE  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

16/09/2020 08:05:56.0

IGOR ALEXANDRE CÔRTEZ DE MENEZES  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

16/09/2020 09:25:37.0

EMERSON CARRARO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)

Assinatura Eletrônica

15/09/2020 17:24:37.0

DAIANE PRISCILA SIMÃO  
Avaliador Externo (PONTIFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO  
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/09/2020 17:16:32.0

SERVIO TULIO STINGHEN  
Avaliador Externo (HEMEPAR - CENTRO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO PARANÁ)

Rua General Cameiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: [ppgmedicina@ufpr.br](mailto:ppgmedicina@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 52716

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 52716**

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Iara Messias Reason, brilhante pesquisadora e um ser humano de qualidades únicas, que me possibilitou esta grande realização em minha vida.

À Prof. Dra. Fabiana Andrade, minha coorientadora, por todo conhecimento transmitido, pela paciência e boa vontade comigo.

À Prof. Dra. Angelica Boldt por sua inestimável ajuda.

Aos professores da banca de qualificação, Dra. Marcia Beltrame, Dr. Eduardo Paiva e Dr. Felipe Verdan, pela disposição em me ajudar, dispendendo horas preciosas de seu tempo comigo.

Aos colegas do laboratório de Imunopatologia, principalmente a Lorena, Nathalia e Camila, por toda a ajuda e incentivo.

Aos meus colegas de trabalho, Fausto, Felipe e Valéria, por me apoiarem em todos os momentos.

À chefe Dra. Marisol e a Dra. Gislaine por me permitirem ocasionalmente mudar horários e escalas no trabalho.

À minha querida e amada mãe Cleide, por estar sempre ao meu lado e por sempre acreditar em mim.

Ao meu namorado Gilson pela paciência, compreensão e por sempre cuidar de mim.

Aos meus gatos Bob, Gandalf e Negão, por estarem sempre comigo, me fazendo sorrir com suas fofurices.

E principalmente agradeço ao meu Deus, por toda a força necessária.

*“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”*

(Dalai Lama)

## RESUMO

A febre reumática (FR) e sua manifestação clínica mais grave, a cardiopatia reumática crônica (CRC) são doenças inflamatórias crônicas decorrentes de infecção da orofaringe causada pelo *Streptococcus pyogenes*. O sistema complemento tem um papel chave na defesa do organismo contra infecções e na autoimunidade, já tendo sido relacionado a susceptibilidade e proteção contra a FR. As ficolinas são importantes moléculas na ativação do complemento pela via das lectinas atuando como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Nosso grupo de pesquisa avaliou anteriormente o gene *FCN2*, que codifica a ficolina-2, na FR/CRC, porém não existem relatos envolvendo as ficolinas 1 e 3 na FR/CRC. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação das concentrações séricas de ficolina-1 e ficolina-3, bem como, de polimorfismos nos genes *FCN1* e *FCN3*, que codificam estas proteínas, com FR e CRC. Cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de *FCN1* (rs2989727, rs10120023, rs17039495, rs10117466 e rs10858293) e três SNPs de *FCN3* (rs532781899, rs28362807 e rs4494157) foram genotipados por PCR-SSP (amplificação sequência específica) em 193 pacientes (sendo 138 com CRC e 55 apresentaram FR, mas não evoluíram para CRC [FRo]) e 193 controles. As concentrações séricas de ficolina-1 e -3 foram realizadas em um subgrupo de pacientes e controles utilizando ensaio de imunoabsorbância enzimático (ELISA). Os pacientes apresentaram concentração de ficolina-1 33,8% menor comparados aos controles (medianas 800,5 vs. 1208,0 ng/mL respectivamente,  $p < 0,0001$ ), mas não houve diferença entre CRC e FRo ( $p = 0,990$ ). Ficolina-3 foi 29,4% mais baixa em pacientes quando comparados aos controles (12,81 vs. 18,14  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente,  $p < 0,0001$ ), e 11,2% menor em CRC quando comparados a FRo (12,72 vs. 14,29  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente,  $p = 0,016$ ). Além disso, baixas concentrações de ficolina-3 ( $< 10,7 \mu\text{g/mL}$ ) foram mais comuns em pacientes (39,5%, 30/76) vs. controles (20,6%, 13/63,  $p = 0,018$ ), e em CRC (44,4%, 28/63) vs. FRo (15,4%, 2/13,  $p = 0,007$ ). Quatro alelos de menor frequência de *FCN1* (rs2989727: c.-1981A, rs10120023: c.-542A, rs10117466: c.-144A e rs10858293: c.33T), todos sabidamente associados com aumento da expressão do gene *FCN1* no sangue total (base de dados de expressão gênica), foram associados com proteção contra a FR e CRC ( $p < 0,0001$ ). Tais alelos compõem o haplótipo \*3C2 também associado a proteção contra FR ( $p < 0,0001$ ). Por outro lado, o haplótipo \*1, composto pelos alelos de maior frequência desses polimorfismos, foi associado a maior suscetibilidade a FR ( $p < 0,0001$ ). As concentrações de ficolina-1 nos pacientes com o haplótipo de “susceptibilidade” \*1 apresentaram concentrações 21% menores quando comparados aos pacientes com o haplótipo “protetor” \*3C2 (770,8 vs. 975,9 ng/mL respectivamente,  $p = 0,030$ ). Por outro lado, polimorfismos/haplótipos do gene *FCN3* não foram associados com concentrações de ficolina-3 ou com FR/CRC. Nossos resultados sugerem que polimorfismos de *FCN1* podem ter um papel duplo na FR, com alguns polimorfismos associados a proteção contra a FR, pelo aumento da expressão do gene com consequente aumento da concentração da proteína, contribuindo para a melhor resposta do hospedeiro. Por outro lado, podem também predispor os pacientes à CRC, provavelmente por colaborar com a inflamação crônica e injúria tecidual, ressaltando a dupla importância da ficolina-1 em ambas as condições. Além disso, a concentração de ficolina-3 menor nos pacientes CRC do que nos FRo sugere uma associação com a progressão da doença, e pode ser sugestivo para maiores estudos como um promissor marcador de progressão da FR.

## ABSTRACT

Rheumatic fever (RF) and its most severe clinical manifestation, chronic rheumatic heart disease (RHD) are chronic inflammatory diseases resulting from oropharyngeal infection by *Streptococcus pyogenes*. The complement system plays a key role in both the defense against infections and autoimmunity, having already been related to susceptibility and protection against RF. Ficolins are important molecules of complement activation through the lectin pathway, acting as pattern recognition receptors (PRRs). Our research group has previously evaluated the *FCN2* gene, which encodes ficolin-2, in RF and RHD, but there are no reports involving ficolins 1 and 3 in these conditions. Thus, the objective of this work was to evaluate the association of ficolin-1 and ficolin-3 serum levels, as well as polymorphisms in *FCN1* and *FCN3* genes, which encode these proteins, with RF and RHD. Five *FCN1* single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs2989727, rs10120023, rs17039495, rs10117466 and rs10858293) and three *FCN3* SNPs (rs532781899, rs28362807 and rs4494157) were genotyped by PCR-SSP (specific sequence amplification) in 193 RF patients (138 RHD and 55 patients who had RF but did not progress to RHD [RFo]) and 193 controls. The serum levels of ficolin-1 and-3 were quantified in a subgroup of patients and controls using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Patients had 33.8% lower ficolin-1 levels compared to controls (medians 800.5 vs. 1208.0 ng/mL respectively,  $p < 0.0001$ ), but did not differ between patient subgroups ( $p = 0.990$ ). Ficolin-3 was 29.4% lower in patients compared to controls (12.81 vs. 18.14  $\mu\text{g} / \text{mL}$  respectively,  $p < 0.0001$ ), and 11.2% lower in RHD compared to RFo (12.72 vs. 14.29  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively,  $p = 0.016$ ). In addition, low ficolin-3 levels ( $< 10.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) were more common in patients (39.5%, 30/76) vs. controls (20.6%, 13/63,  $p = 0.018$ ), and in RHD (44.4%, 28/63) vs. RFo (15.4%, 2/13,  $p = 0.007$ ). Four *FCN1* minor alleles (rs2989727: c.-1981A, rs10120023: c.-542A, rs10117466: c.-144A and rs10858293: c.33T), all known to be associated with *FCN1* increased expression in the blood (gene expression database), were associated with protection against RF/RHD ( $p < 0.0001$ ). Such alleles make up the \*3C2 haplotype also associated with protection against RF ( $p < 0.0001$ ). On the other hand, the \*1 haplotype, comprising the common alleles of these polymorphisms, was associated with RF susceptibility ( $p < 0.0001$ ). When assessing protein levels in these two haplotypes, patients with the "susceptibility" \*1 haplotype had 21% lower ficolin-1 levels compared to patients with the "protective" \*3C2 haplotype (770.8 vs. 975.9 ng / mL respectively,  $p = 0.030$ ). On the other hand, *FCN3* gene polymorphisms/haplotypes were not associated with neither ficolin-3 levels nor RF/RHD. Our results suggest that *FCN1* polymorphisms may have a double role in RF, with some polymorphisms associated with protection against RF, by increasing the gene expression and consequently increasing the protein level, contributing to host response. On the other hand, they might predispose patients to RHD, probably contributing to chronic inflammation and tissue injury, highlighting the dual importance of ficolin-1 in both conditions. In addition, the lower ficolin-3 levels in RHD vs. RFo patients suggests an association with disease progression and may be suggestive for further studies as a promising marker of RF progression.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CL-K1	Colectina 11
CRC	Cardiopatia Reumática Crônica
CRIg	Receptor de Complemento da família das Imunoglobulinas
CRP	Proteína C Reativa
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
FR	Febre Reumática
FRo	Pacientes que apresentaram FR, mas que não evoluíram para CRC
GAS	<i>Streptococcus pyogenes</i> do grupo A
GlcNAc	N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-8	Interleucina 8
IL-17	Interleucina 17
MAC	Complexo de Ataque a Membrana
MASP	MBL-associada a serino protease
MBL	Lectina Ligante de Manose
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR-SSP	Reação em cadeia da polimerase sequencia específica
PMN	Leucócitos Polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
VCAM-1	Moléculas de Adesão Celular Vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	7
1.2 HIPÓTESES .....	7
1.3 OBJETIVOS .....	8
1.3.1 Objetivo Geral.....	8
1.3.2 Objetivos Específicos .....	8
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
2.1 FEBRE REUMÁTICA .....	9
2.2 ETIOPATOGENIA DA FR .....	12
2.3 SISTEMA COMPLEMENTO .....	17
2.4 FICOLINAS.....	20
2.4.1 Ficolina-1 .....	24
2.4.2 Ficolina-3.....	28
2.5 COMPLEMENTO E FR .....	32
2.6 VIA DAS LECTINAS E FR .....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA .....	36
3.2 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA .....	36
3.3 CASUÍSTICA .....	36
3.3.1 Pacientes.....	36
3.3.2 Controles .....	37
3.4 MÉTODOS .....	38
3.4.1 Extração de DNA.....	38
3.4.2 Reação em cadeia da polimerase sequência específica (PCR-SSP) .....	39
3.4.3 PCR-SSP para o gene <i>FCN1</i> .....	40
3.4.4 PCR-SSP para o gene <i>FCN3</i> .....	43
3.4.5 Quantificação das proteínas Ficolina-1 e Ficolina-3 .....	46
3.4.6 Montagem dos haplótipos .....	47
3.4.7 Análise estatística .....	47
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
4.1 ARTIGO 1 .....	49
4.2 ARTIGO 2.....	59
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>72</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>75</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A febre reumática (FR) e a cardiopatia reumática crônica (CRC) são complicações não supurativas da faringoamigdalite causada pelo *Streptococcus pyogenes* ou *Streptococcus* do grupo A (GAS) que ocorrem em indivíduos com predisposição genética (BARBOSA et al., 2009). A FR acomete principalmente crianças e adultos jovens, e apesar dos dados epidemiológicos imprecisos, a frequência de ocorrência é significativa na população, com incidência de cerca de 50 por 100.000 indivíduos em países em desenvolvimento, além de ser uma das principais causas de mortalidade cardiovascular entre crianças em idade escolar (GEWITZ et al., 2015; SIKAPAOOTONU et al., 2016).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo contra infecções. Através de mecanismos celulares e/ou humorais é capaz de reconhecer e eliminar patógenos de forma extremamente rápida. Os componentes efetores da imunidade inata incluem barreira epitelial, fagócitos, células natural *killer*, citocinas e o sistema complemento (BELTRAME et al., 2015a). O sistema complemento consiste em cerca de 50 proteínas séricas e associadas a membrana, que quando ativadas conduzem a uma cascata proteolítica que culmina com o recrutamento de células inflamatórias, fagocitose e lise celular (BELTRAME et al., 2015b; ELVINGTON; LISZEWSKI; ATKINSON, 2016). O complemento é ativado por três vias: clássica, alternativa e das lectinas. A via das lectinas é iniciada pela ligação da lectina ligante de manose (MBL), colectina 11 (CL-K1) e ficolinas (ficolina-1, ficolina-2 e ficolina-3) à oligossacarídeos e resíduos acetilados da superfície microbiana, complexos imunes e debris celulares. MBL, CL-K1 e ficolinas formam complexos com serino proteases associadas a MBL 1 e 2 (MASP-1 e MASP-2), que clivam C4 e C2 formando a C3 convertase. Subsequente à ativação da cascata do complemento, ocorre uma série de processos biológicos incluindo a opsonização, a fagocitose e lise de microrganismos através da formação do complexo de ataque à membrana (MAC), bem como remoção de complexos imunes e debris celulares. A ativação do complemento também induz diversos efeitos inflamatórios, como a expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia e

ativação de leucócitos, liberação de espécies reativas de oxigênio e secreção de citocinas e quimiocinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; RICKLIN et al., 2010; RICKLIN; LAMBRIS, 2013).

O complemento desempenha um importante papel na resposta imediata contra bactérias Gram positivas, contudo o GAS possui diversas estratégias para escapar do sistema imune inato, especialmente da eliminação mediada pelo complemento (AGRAHARI et al., 2016). Nosso grupo de pesquisa demonstrou em estudos prévios a participação das proteínas da via das lectinas na fisiopatologia da FR e CRC. Os níveis de Ficolina-2, MBL e MASP-2, bem como polimorfismos dos genes, *FCN2*, *MBL2* e *MASP2* parecem atuar tanto no desenvolvimento da FR como no estabelecimento da CRC (CATARINO et al., 2014; MESSIAS-REASON; KREMSNER; KUN, 2009; MESSIAS REASON et al., 2006; SCHAFRANSKI et al., 2004, 2008). Contudo, o papel das ficolinas-1 e -3 na FR e CRC ainda é desconhecido.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A FR é uma doença negligenciada, com alta prevalência principalmente em países subdesenvolvidos. Considerando a irreversibilidade da sua principal manifestação clínica, a CRC, todo conhecimento sobre a imunopatogenia da doença incluindo o sistema complemento é de grande importância na tentativa de se buscar marcadores de progressão da doença. Nesse sentido, o presente estudo pretende contribuir para um melhor entendimento do papel das ficolinas-1 e -3 na FR e CRC.

## 1.2 HIPÓTESES

- I. As concentrações séricas das proteínas ficolina-1 e ficolina-3 estão alteradas nos pacientes com FR e CRC, como consequência da doença;

- II. SNPs na região promotora do gene *FCN1* que afetam a concentração da proteína ficolina-1 podem estar associadas à FR e a CRC;
- III. SNPs no Éxon 5 e nos Íntrons 5 e 7 do gene *FCN3* afetam a atividade e concentração da ficolina-3 e podem estar associados à FR e a CRC;

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar se existe associação dos polimorfismos nos genes *FCN1* e *FCN3*, bem como das concentrações séricas de Ficolina-1 e -3 com a febre reumática e cardiopatia reumática crônica.

#### 1.3.2 Objetivos Específicos

- I. Determinar se os níveis séricos de ficolina-1 e ficolina-3 estão relacionados ao desenvolvimento da FR e CRC;
- II. Avaliar possível associação entre polimorfismos da região promotora do gene *FCN1* e a susceptibilidade a FR e CRC;
- III. Investigar possível associação entre polimorfismos de interesse no gene *FCN3* com a susceptibilidade a FR e CRC;
- IV. Verificar se os polimorfismos nos genes *FCN1* e *FCN3* influenciam nas concentrações séricas de ficolina-1 e -3 nos pacientes e controles.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FEBRE REUMÁTICA

A febre reumática (FR) é uma doença inflamatória decorrente de infecção de orofaringe pelo *Streptococcus pyogenes* ou *Streptococcus* do grupo A (GAS), que ocorre em indivíduos geneticamente predispostos, principalmente crianças e adultos jovens. A doença manifesta-se geralmente 2 a 3 semanas após a infecção e o processo inflamatório envolve múltiplos órgãos incluindo coração, articulações, pele e sistema nervoso central (BURKE; CHANG, 2014). A cardiopatia reumática crônica (CRC) é caracterizada por lesões valvares progressivas decorrentes da FR (KATZENELLENBOGEN et al., 2017).

A distribuição global da FR é heterogênea e desproporcional, enquanto em certas regiões geográficas, etnias específicas, grupos socioeconômicos apresentam altos índices de incidência, em outras regiões a doença praticamente desapareceu (GEWITZ et al., 2015). Fatores ambientais como aglomeração familiar, acesso limitado a serviços médicos e nutrição insuficiente, geralmente associados a pobreza, aumentam o risco de infecção pelo GAS (SIKA-PAOTONU et al., 2016).

Embora uma incidência de 8 por 100.000 indivíduos para FR foi relatada na América do Norte e Europa (TIBAZARWA; JA; MAYOSI, 2008), e na Índia de 51 por 100.000 indivíduos (TIBAZARWA; JA; MAYOSI, 2008), estudos mais recentes indicam até 444 casos por 100.000 indivíduos em algumas regiões da Índia, China, Paquistão, Indonésia e tribos indígenas na Austrália (SIKA-PAOTONU et al., 2016). Estima-se que cerca de 60% dos casos de FR desenvolverão CRC (CARAPETIS et al., 2005; MAURICE, 2013). Em países subdesenvolvidos, a CRC tem uma taxa de incidência média anual de 19 por 1000 habitantes, o que a torna uma das principais causas de mortalidade cardiovascular entre crianças em idade escolar (CARAPETIS et al., 2005; CHANG, 2011). Há estimativas que apontam 30 milhões de pessoas acometidas pela CRC em todo o mundo, com 470.000 casos novos da doença anuais e

345.000 mortes (ENGELMAN et al., 2016; WATKINS et al., 2017). Cerca de 2 milhões de casos necessitam de repetidas hospitalizações e um milhão podem necessitar de transplante cardíaco em 5 a 20 anos (CHANG, 2011). No Brasil, ocorre a cada ano aproximadamente dez milhões de infecções de garganta por GAS, sendo que 30.000 podem provocar FR aguda (0,3%) e 50% delas podem deixar sequelas de CRC (BARBOSA et al., 2009). Outro estudo estima uma incidência anual para FR de 59 por 100.000 habitantes no Brasil (SPINA, 2008). Um estudo realizado em 16 creches de Curitiba/PR constatou a presença do GAS na orofaringe de 76,9%, sendo que a maioria delas apresentava sintomas de infecção de vias aéreas superiores, no momento do estudo (TORRES, 2000).

A FR aguda pode apresentar diversas manifestações clínicas diferentes nas semanas que se seguem após a faringite pelo GAS. As manifestações clínicas mais comuns são a febre (>90% dos pacientes) e a artrite (75% dos pacientes) (SIKA-PAOTONU et al., 2016). A artrite apresenta evolução autolimitada e sem sequelas e afeta principalmente as grandes articulações, particularmente dos membros inferiores (BARBOSA et al., 2009; GEWITZ et al., 2015). A cardite ocorre em 50-70% dos pacientes, sendo a manifestação mais grave da FR, pois pode progredir para a CRC, com lesões irreversíveis nas valvas cardíacas podendo levar a óbito. O acometimento cardíaco é caracterizado por pancardite, ou seja, inflamação do miocárdio, pericárdio e endocárdio. Entretanto, as lesões valvares são responsáveis pelo quadro clínico e prognóstico (BARASH, 2013; ENGELMAN et al., 2016; GEWITZ et al., 2015). Outra manifestação da FR, a coreia de Sydenhan, é uma desordem neurológica caracterizada por movimentos rápidos, involuntários e incoordenados da face, tronco ou extremidades. O eritema marginado é raro, ocorrendo em <3% dos pacientes. Caracterizam-se por lesões múltiplas, indolores e não pruriginosas. Os nódulos subcutâneos também são raros, presentes em 2-5 % dos pacientes, e estão fortemente associados à presença de cardite grave (BARASH, 2013; BARBOSA et al., 2009).

O diagnóstico da FR é realizado através de critérios clínicos (Critérios de Jones) e por exclusão de outros diagnósticos diferenciais. Os Critérios de Jones foram inicialmente estabelecidos em 1944 (JONES, 1944) e desde então passado por várias modificações e atualizações, sendo a mais recente realizada

em 2015 pela Associação Americana de Cardiologia (GEWITZ et al., 2015). Os critérios são divididos em manifestações maiores e menores (Tabela 1) (CARAPETIS et al., 2018).

TABELA 1. CRITÉRIOS DE JONES 2015 PARA O DIAGNÓSTICO DA FR

	População de baixo risco*	População de risco moderado/alto**
<b>Critérios Maiores</b>		
Cardite	Clínica e/ou subclínica <sup>&amp;</sup>	Clínica e/ou subclínica <sup>&amp;</sup>
Artrite	Poliartrite	Monoartrite, poliartrite e/ou poliartralgia
	Coreia de Sydenhan	Coreia de Sydenhan
	Eritema marginado	Eritema marginado
	Nódulos subcutâneos	Nódulos subcutâneos
<b>Critérios Menores</b>		
Cardite	Intervalo PR prolongado <sup>#</sup>	Intervalo PR prolongado <sup>#</sup>
Artralgia	Poliartralgia	Monoartralgia
Febre	≥ 38,5 °C	≥ 38,5 °C
Marcadores inflamatórios	VHS ≥ 60mm em 1 hora e/ou CRP ≥ 3,0 mg/dL	VHS ≥ 30mm em 1 hora e/ou CRP ≥ 3,0 mg/dL

**Evidência de infecção estreptocócica prévia:**

Anti-estreptolisina O (ASO) ou anti-DNAse B aumentados ou  
 Cultura de garganta positiva para estreptococo β-hemolítico ou  
 Teste rápido para antígeno carboidrato de estreptococo do grupo A em  
 crianças cuja anamnese sugere uma probabilidade alta de faringite  
 estreptocócica

LEGENDA: No caso do primeiro surto de FR o diagnóstico é realizado na presença de 2 critérios maiores ou 1 maior + 2 menores. Nas recidivas da FR (FR recorrente), além dos citados é aceitável 3 critérios menores. VHS: velocidade de hemossedimentação; CRP: proteína C reativa; \*: Incidência ≤ 2 por 100.000 crianças em idade escolar ou prevalência de CRC em qualquer idade ≤ 1 por 1000 habitantes por ano. \*\*: Crianças que não fazem parte da população de baixo risco. &: Cardite subclínica: observada somente na ecocardiografia, sem achados na ausculta. #: Considerando a variabilidade de idade & somente se não houver cardite.  
 FONTE: SIKI-PAOTONU et al, 2017.



O tratamento da FR com antibacterianos e anti-inflamatórios tem sido utilizado por muitos anos. A profilaxia primária consiste no tratamento da faringite estreptocócica e na prevenção do primeiro episódio de FR. O antibiótico de escolha é a penicilina, via oral ou intramuscular (SZCZYGIELSKA et al., 2018). A FR pode ser recorrente como resultado de subseqüentes infecções pelo GAS e em cada recorrência o acometimento cardíaco pode se agravar. Assim, a prioridade no manejo da doença é prevenir recorrências através do tratamento a longo prazo com penicilina, o que é conhecido como profilaxia secundária (CARAPETIS et al., 2018).

## 2.2 ETIOPATOGENIA DA FR

A patogênese da FR aguda ainda não é completamente conhecida. Cerca de 0,3 a 3% das pessoas com faringite por GAS desenvolvem FR aguda, dependendo da predisposição genética e da virulência da cepa infectante (KARTHIKEYAN; GUILHERME, 2018). O fator desencadeador é a infecção de faringe pelo GAS, com raros relatos de infecções de pele associadas a FR aguda (PARKS; SMEESTERS; STEER, 2012; WILLIAMSON et al., 2015).

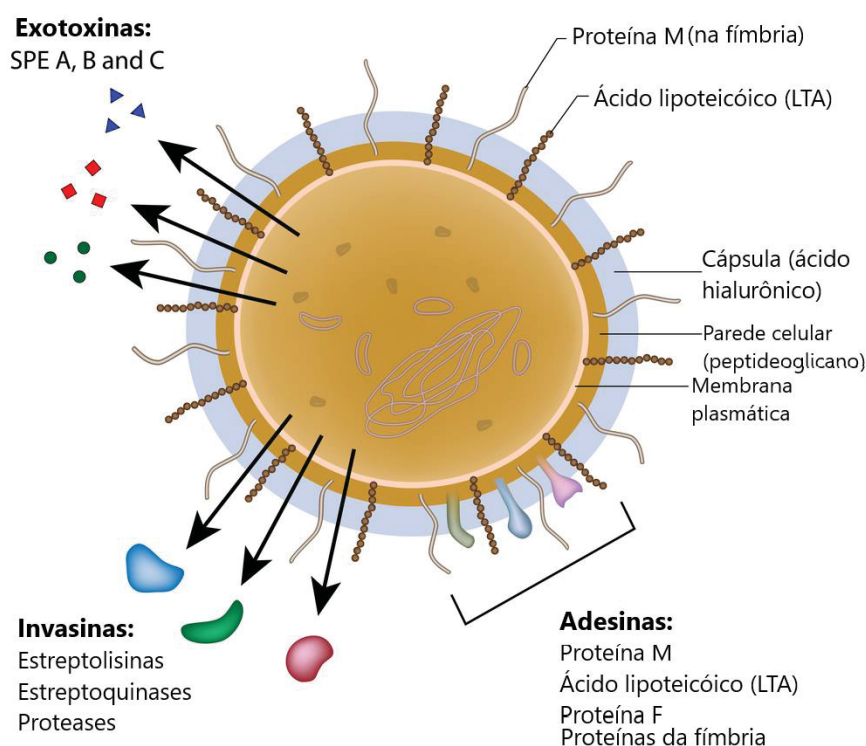
A superfície do GAS é notadamente complexa e quimicamente diversa. Componentes antigênicos incluem o polissacarídeo capsular (substância C), a parede celular de peptidoglicanos e o ácido lipoteicóico (LTA), além de uma variedade de proteínas de superfície incluindo Proteína M, proteínas da fímbria, proteínas ligantes de fibronectina (proteína F) e estreptoquinase (Figura 1) (TODAR, 2015).

A classificação do estreptococo é feita pela tipagem do carboidrato de que é composta sua camada média e central, de A a O (FERRETTI; STEVENS; FISCHETTI, 2016). Apenas o estreptococo do grupo A é capaz de acarretar a FR; apesar de outros grupos sorológicos de estreptococos beta-hemolíticos (por exemplo, B, C, G, e F) estarem associados a infecções de vias aéreas superiores, nenhum deles causa FR (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2001). E somente os grupos A e G são capazes de produzir a Proteína M em sua camada externa, principal antígeno bacteriano do GAS que confere

resistência à fagocitose, aumentando a virulência do patógeno (CHANG, 2011; FERRETTI; STEVENS; FISCHETTI, 2016). A proteína M compartilha homologia estrutural com proteínas  $\alpha$ -helicoidais humanas, como a miosina cardíaca, tropomiosina, queratina, laminina, vimentina e diversas outras proteínas, o que pode desencadear reação cruzada e autoimunidade (GUILHERME et al., 2011).

FIGURA 1 – ESTRUTURA CELULAR E DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA

### *Streptococcus pyogenes*



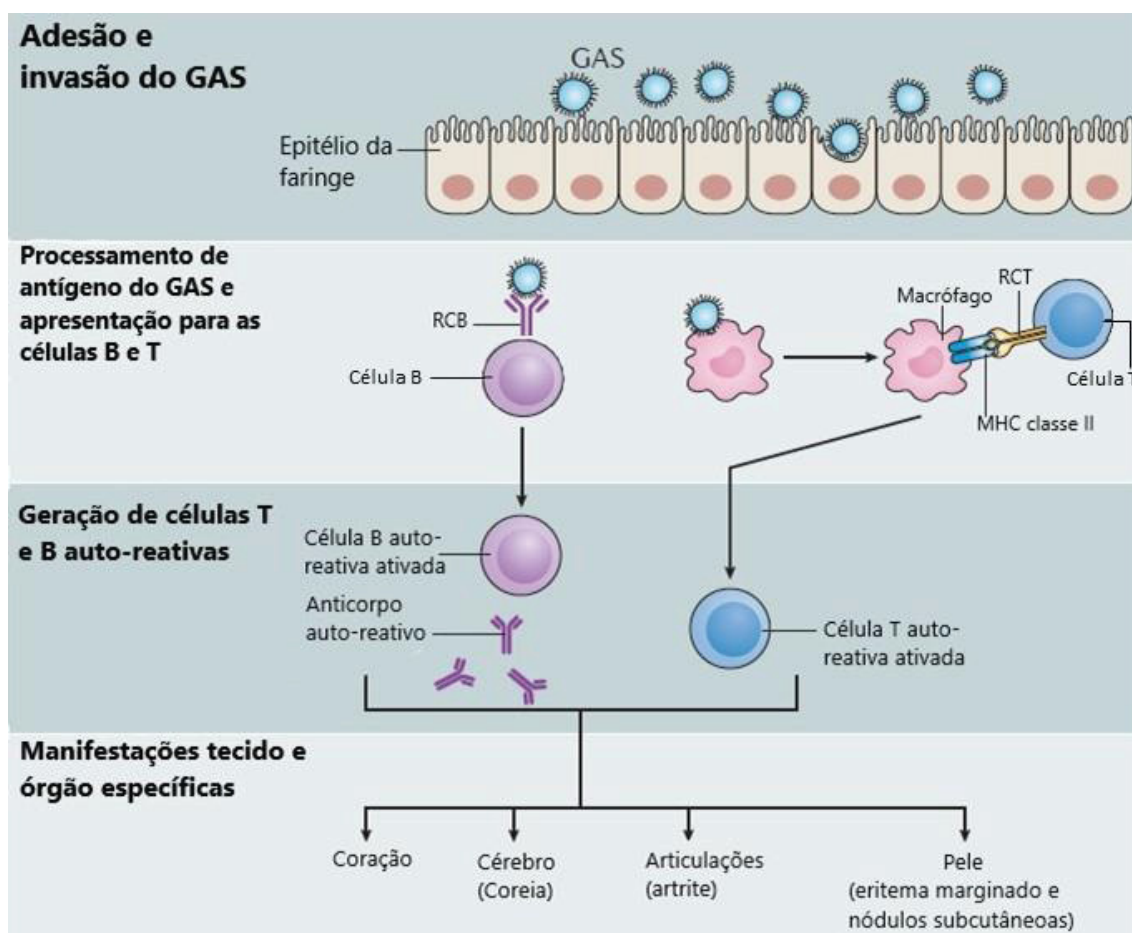
FONTE: Adaptado de (ALILAMEDICALCENTER, 2020)

LEGENDA: SPE: exotoxinas pirogênicas estreptocócicas.

Os antígenos estreptocócicos ativam a imunidade humoral e mediada por células levando a produção de anticorpos contra os componentes estreptocócicos (KARTHIKEYAN; GUILHERME, 2018). Estes anticorpos contra epítomos da proteína M e do carboidrato do grupo A estreptocócico (N-acetil-D-glucosamina [GlcNAc]) apresentam reatividade cruzada com os componentes

cardíacos miosina, laminina e vimentina em decorrência da similaridade estrutural dos epítomos antigênicos (CUNNINGHAM, 2014b). Este mecanismo é denominado mimetismo molecular, sendo a hipótese mais conhecida e aceita para explicar o desenvolvimento da resposta imune auto-reativa que culmina na FR (Figura 2) (CUNNINGHAM, 2014a).

FIGURA 2 – PATOGÊNESE DA FR



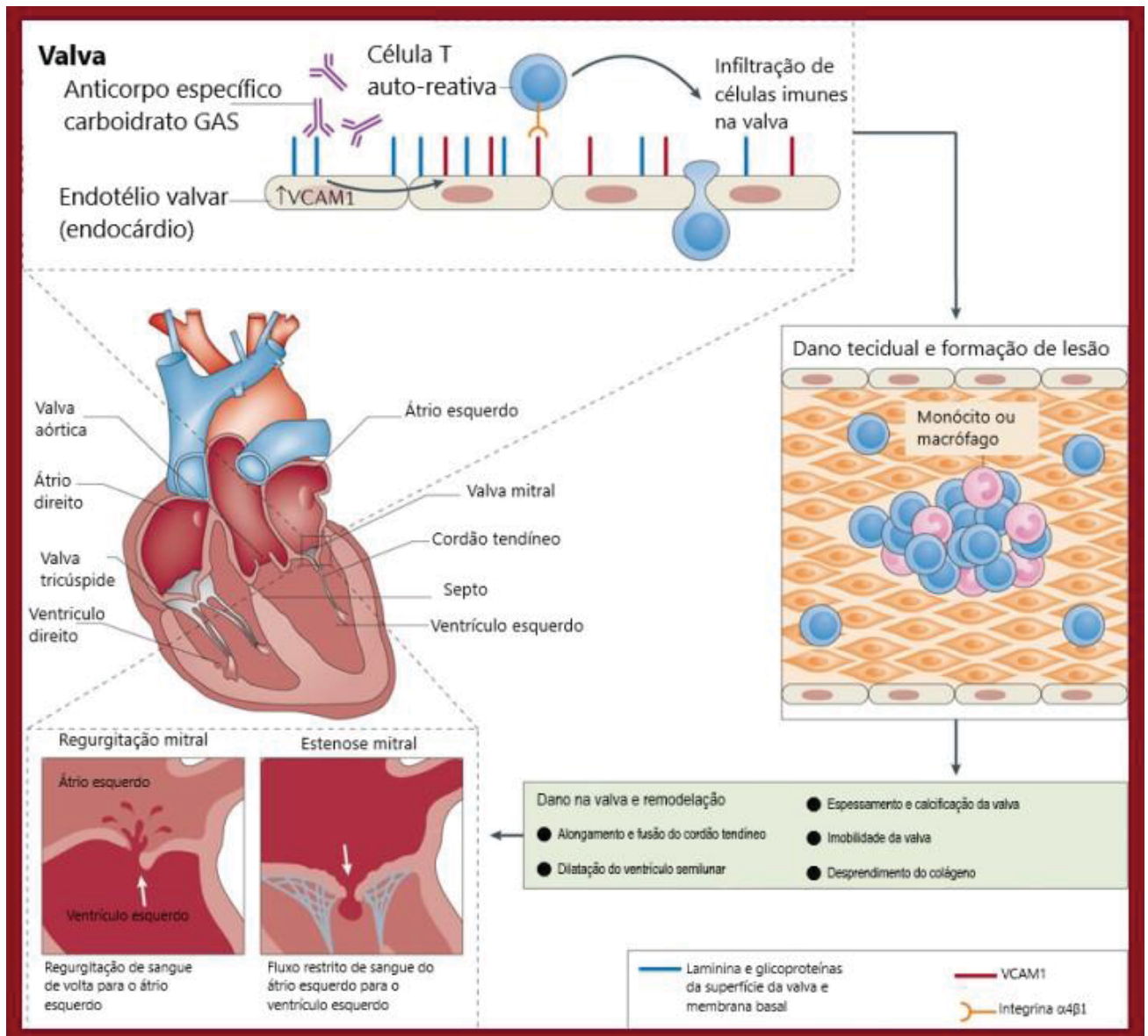
FONTE: Adaptado de CARAPETIS et al (2018)

LEGENDA: A ativação do sistema imune inato começa com uma infecção de garganta a qual leva a apresentação de antígenos do GAS às células T e B. Em indivíduos geneticamente predispostos, são produzidos autoanticorpos e clones auto-reativos de células T que podem reagir com antígenos próprios do coração (como miosina, vimentina e laminina). Uma combinação de injúria mediada por citocinas, mediada por células e humoral leva a dano valvar. A resposta imune auto-reativa resulta nas manifestações clínicas da FR, incluindo cardite, artrite (devido a formação de complexos imunes), coreia (ligação de anticorpos a ganglia basal) e manifestações na pele (reação de hipersensibilidade tardia). GAS: *Streptococcus pyogenes*; RCB: Receptor de célula B; RCT: Receptor de célula T.

O dano valvar ocorre como resultado das respostas imune humoral e celular contra proteínas das valvas. A ligação dos anticorpos auto reativos na superfície das valvas induz a regulação positiva de moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1), as quais facilitam a aderência e infiltração das células T CD4 ativadas e linfócitos B (KARTHIKEYAN; GUILHERME, 2018; ROBERTS et al., 2001). O dano tecidual local é mediado principalmente por células T CD4+, que levam a produção de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e diminuição de IL-4 e 10 (GUILHERME et al., 2004; KARTHIKEYAN; GUILHERME, 2018). A inflamação leva a neovascularização e cura por fibrose, causando as lesões valvares características da CRC (Figura 3) (KARTHIKEYAN; GUILHERME, 2018).

Outro mecanismo que se propõe a explicar a patogênese da FR aguda, afirma que a proteína M liga-se ao colágeno tipo 4 da membrana basal induzindo autoimunidade ao colágeno, resultando em inflamação e cicatrização das valvas (TANDON et al., 2013). Porém anticorpos contra o colágeno não induziram valvulite em modelo animal (MCNEILLY et al., 2016). O mimetismo molecular continua sendo considerado essencial para a indução da autoimunidade e início da lesão valvar durante a FR aguda, embora anticorpos contra colágeno poderiam contribuir na progressão da doença (CUNNINGHAM, 2014b; KARTHIKEYAN; GUILHERME, 2018).

FIGURA 3 – MECANISMO DO DANO VALVAR



FONTE: Adaptado de CARAPETIS et al (2018)

LEGENDA: O coração é afetado por anticorpos contra o carboidrato do grupo A ligando-se na superfície da valva e regulando positivamente a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM1) na superfície do endotélio valvar. A regulação da VCAM1 permite que células T que expressam a integrina  $\alpha 4\beta 1$  adiram ao endotélio e extravasem para a valva. A valva interna torna-se infiltrada por células T, principalmente células T CD4+, e os corpos de Aschoff ou lesões granulomatosas se formam sob o endocárdio. O dano ao endotélio e a infiltração de células T na valva remodelam a estrutura da valva, incluindo o cordão tendíneo, com malformação da valva levando a regurgitação ou estenose. Liberação de colágeno pode ocorrer, resultando em mais dano imuno-mediado.

## 2.3 SISTEMA COMPLEMENTO

A elevada complexidade do sistema imunológico humano fornece uma defesa eficaz contra um grande número de patógenos, além de proteção contra respostas indesejáveis a componentes próprios (BELTRAME et al., 2015a). O sistema imunológico é classicamente dividido em inato e adaptativo, que estão amplamente interconectados. O sistema inato fornece uma primeira linha de defesa, imediata e não específica, através de processos humorais, celulares e mecânicos, desempenhando um papel importantíssimo na proteção contra patógenos diversos (DUNKELBERGER; SONG, 2010). O sistema complemento é uma parte essencial do sistema imune inato, com vários papéis que se sobrepõem: defesa contra infecção, remoção de complexos imunes e debris celulares e ligação entre imunidade inata e adaptativa (KUMAR, 2019; WALPORT, 2001). O complemento protege contra a invasão de patógenos e de componentes anormais do próprio organismo através de diversos mecanismos, incluindo opsonização e fagocitose, ativação e atração de células imunes por quimiotaxia e lise na membrana celular do patógeno invasor, após incorporação do complexo de ataque a membrana (MAC) (CEDZYŃSKI et al., 2019).

O sistema complemento consiste em cerca de 50 proteínas encontradas na fase fluida do sangue ou associadas a membrana celular, onde atuam como receptores ou reguladores da ativação do complemento (EKDAHL et al., 2018). A maioria das proteínas solúveis circula na forma inativa como pró-enzimas ou zimógenos (DEGN; THIEL, 2013), e tornam-se estavelmente ativadas após sua ligação com padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou com padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) nas células infectadas ou danificadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). PAMPs são partes de carboidratos (principalmente hexoses) de glicoproteínas ou glicolipídios na superfície de microrganismos. Já os DAMPs são estruturas de carboidratos presentes na superfície de células apoptóticas, necróticas e malignas, bem como em células estressadas por hipóxia e hipotermia (HOWARD; FARRAR; SACKS, 2018).

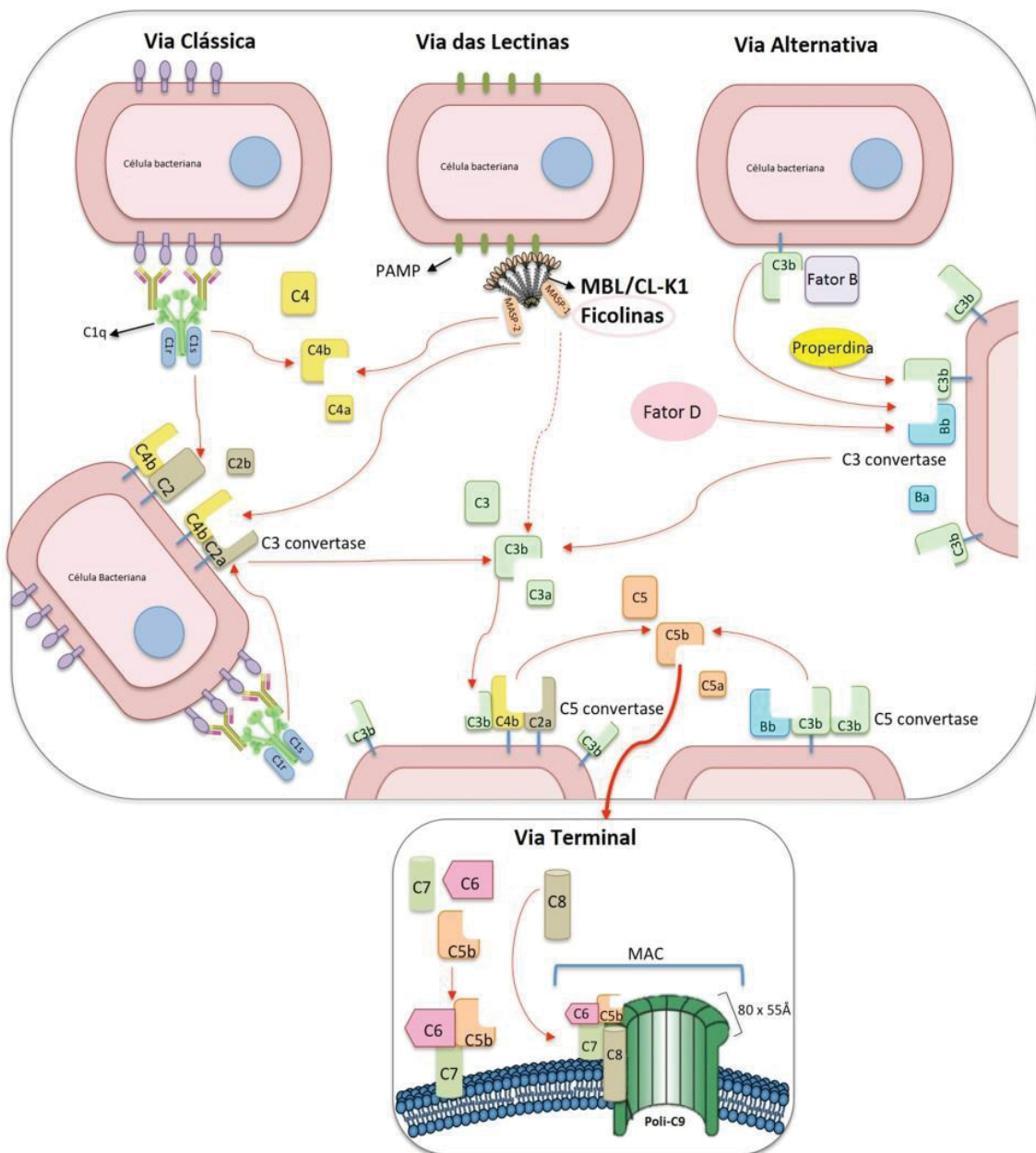
Após a clivagem proteolítica, as moléculas inativas tornam-se ativadas,

resultando em uma cascata reativa que provoca uma série de funções efetoras incluindo fagocitose, inflamação, lise celular e orientação da resposta imune adaptativa (RICKLIN et al., 2010). Como a ativação do complemento leva a potenciais efeitos destrutivos, vários inibidores regulam ativamente este sistema para proteger os tecidos do hospedeiro. Desta forma, um desempenho eficaz do sistema complemento depende de um fino equilíbrio entre os mecanismos de ativação e regulação, com foco na destruição de microrganismos invasores e na limitação do dano celular e tecidual do hospedeiro. O desequilíbrio deste ajuste fino leva a efeitos nocivos para o hospedeiro, com resultados potencialmente graves (BLOM; VILLOUTREIX; DAHLBÄCK, 2004; GIALELI; GUNGOR; BLOM, 2018).

A ativação do complemento pode ocorrer por três mecanismos distintos: via clássica, via alternativa e via das lectinas (Figura 4). A ativação da via clássica é iniciada principalmente por complexos imunes, pela ligação de C1q à porção Fc da IgM ou IgG. Após isso, C1s cliva C4, a qual se liga covalentemente na superfície do patógeno, e então cliva C2, levando a formação do complexo C4b2a, a C3 convertase da via clássica. A ativação da via alternativa ocorre por hidrólise espontânea de C3 ( $C3 + H_2O$ ) no plasma levando a formação de C3b, que então se liga ao fator B (homólogo a C2) para formar o complexo C3bB. A clivagem do fator B pelo fator D forma C3bBb, a C3 convertase da via alternativa (ALI et al., 2012; CHEN; DAHA; KALLENBERG, 2010; LUBBERS et al., 2017).

A via das lectinas é iniciada pela ligação da lectina ligante de manose (MBL), colectina 11 (CL-K1) ou ficolinas (ficolina-1, -2 e -3) juntamente com as serino-proteases associadas a MBL (MASP-1 e MASP-2), à carboidratos ou grupos acetilados na superfície de patógenos ou células apoptóticas ou necróticas (ALI et al., 2012; DEGN; JENSENIUS; BJERRE, 2011). Após a ligação dos complexos MBL/MASPs, CL-K1/MASPs ou ficolinas/MASPs em seus alvos, MASP-1 se auto-ativa e ativa MASP-2 (HÉJA et al., 2012), levando a clivagem de C4 e C2. Isto leva a formação de C3 convertase, C4b2a, que então cliva C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b formado pelas três vias se liga covalentemente ao grupo hidroxil e amino na superfície de moléculas alvo (FISHELSON et al., 1984; LESAVRE et al., 1979).

FIGURA 4 – VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO



FONTE: Adaptado de Beltrame et al. (2015a)

LEGENDA: As três vias de ativação do complemento com ênfase no complexo ficolina/MASPs ligando-se ao PAMP e o desencadeamento da cascata proteolítica.

C3b marca antígenos/patógenos para opsonização e apresentação de antígeno (HE; WIESMANN; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, 2008), isto amplifica a cascata e medeia a fagocitose, bem como a resposta imune adaptativa. A



adição de mais moléculas C3b à C3 convertase forma a C5 convertase (C3BbC3b na via alternativa ou C4bC2aC3b nas via clássica e das lectinas), iniciando a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) por clivagem de C5 em C5a e C5b. Enquanto C3a e C5a agem como potentes anafilotoxinas pró-inflamatórias que aumentam a resposta inflamatória, C5b forma um complexo com C6 e C7, o qual se insere na membrana da célula. Então, C8 e C9 ligam-se a este complexo, resultando em um MAC totalmente funcional (C5b-9), o qual insere poros na membrana celular levando a perda da integridade da membrana e morte celular. As três vias de ativação convergem para esta via terminal comum que culmina na lise e morte celular (BELTRAME et al., 2015a; FOSBRINK; NICULESCU; RUS, 2005; GULLA; GUPTA; HAJELA, 2009).

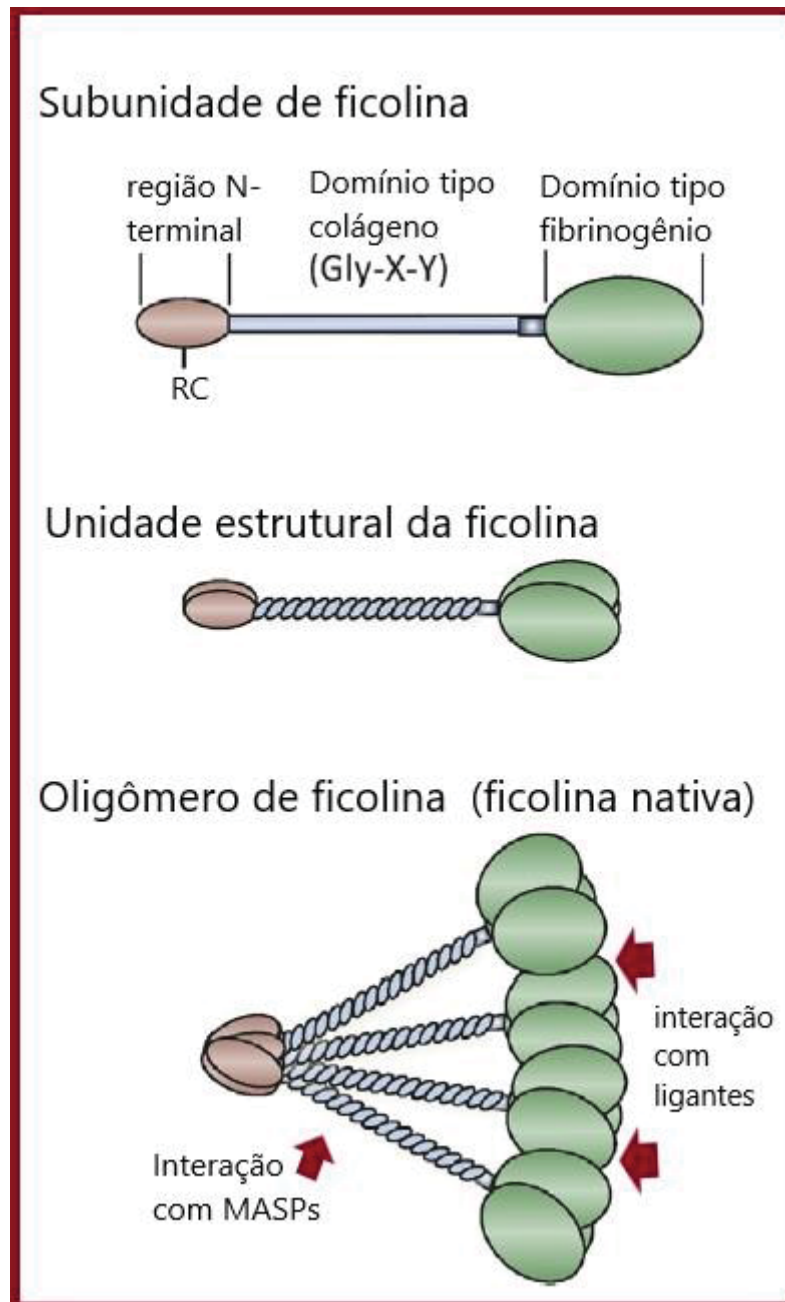
## 2.4 FICOLINAS

Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são sensores do sistema imune inato que levam a muitas funções patofisiológicas após interação com PAMPs ou DAMPs. As ficolinas são PRRs com afinidade por compostos acetilados, sendo capazes de se associar as MASP e ativar o complemento através da via das lectinas, atuando na defesa imune contra patógenos clinicamente importantes (HOWARD; FARRAR; SACKS, 2018). Além de ativar o complemento, as ficolinas podem limitar a infecção pelo estímulo de secreção de IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , e óxido nítrico por macrófagos (REN; DING; ZHANG, 2014) e participam na remoção de debrís endógenos e na manutenção da homeostase dos tecidos (GARRED et al., 2016). São descritas três ficolinas humanas, cada uma delas codificada por seu próprio gene: ficolina-1 (gene *FCN1*; 9q34), ficolina-2 (gene *FCN2*; 9q34) e ficolina-3 (gene *FCN3*; 1p36.11) (HOLMSKOV; THIEL; JENSENIUS, 2003). As ficolinas 2 e 3 são encontradas formando complexos com as MASPs no soro. A ficolina-1 é encontrada na superfície de monócitos/macrófagos e em grânulos secretórios, sendo encontrada em níveis baixos no soro (CARROLL; SIM, 2011). Em termos de

habilidade em ativar a via das lectinas, a ficolina-3 exibe maior capacidade, seguida de ficolina-2 e MBL, que possuem capacidades similares, e da ficolina-1 que tem o menor potencial de ativação, por encontrar-se principalmente ligada a membrana celular de monócitos/macrófagos (HUMMELSHOJ et al., 2008a).

As ficolinas compartilham de uma estrutura similar, composta de uma região N-terminal incluindo dois resíduos de cisteína seguido por um domínio tipo colágeno e um domínio tipo fibrinogênio. O domínio tipo colágeno consiste em 19, 15 e 11 repetições do triplete Gly-X-Y, nas ficolinas -1, -2 e -3 respectivamente, o qual forma uma tripla hélice como encontrado no colágeno estrutural, levando a formação de homotrímeros. A junção de quatro a oito unidades de homotrímeros forma uma ficolina oligomérica nativa, a qual é mantida por ligações dissulfeto inter-cadeias nos resíduos de cisteína da região N-terminal (Figura 5) (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015). O domínio tipo fibrinogênio é composto por diferentes sítios de ligação a moléculas alvo que podem atuar sinergicamente ou isoladamente, em uma complexa interação, permitindo que as ficolinas distingam estruturas próprias de não-próprias. Isto permite que as ficolinas desempenhem tanto um papel na opsonização de vários patógenos pelo reconhecimento de ligantes na superfície do microrganismo, como de células apoptóticas e necróticas (BIDULA; SEXTON; SCHELENZ, 2019). A interação das ficolinas com MASPs se dá na região tipo colágeno (MATSUSHITA, 2009).

FIGURA 5– SUBUNIDADES ESTRUTURAIS DAS FICOLINAS

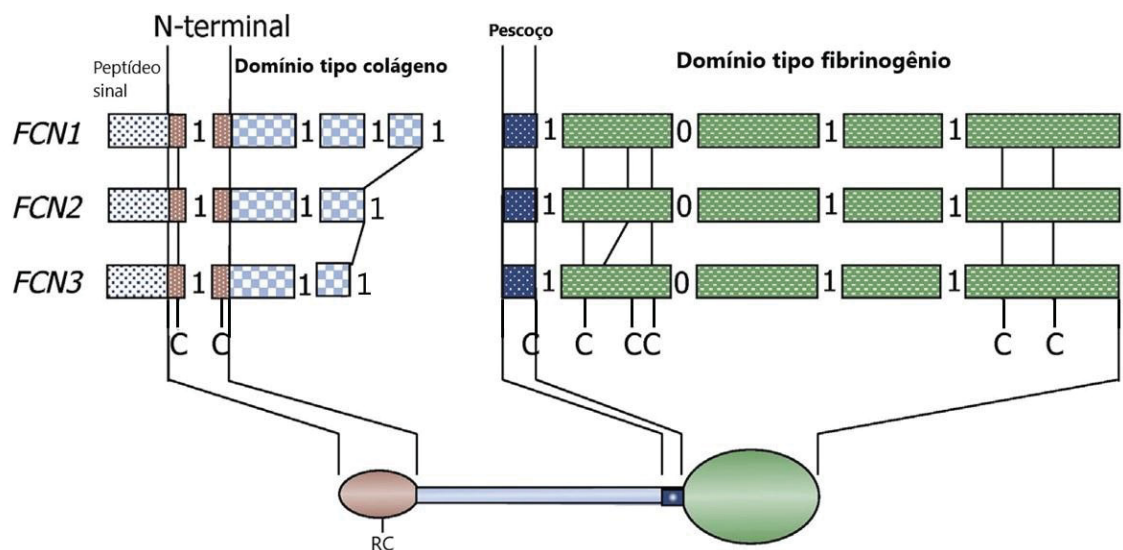


FONTE: Adaptado de Endo et al. (2015)

LEGENDA: A subunidade monomérica da ficolina consiste em uma região N-terminal curta com resíduos de cisteína (RC), um domínio tipo colágeno com repetições Gly-X-Y, essencial para a formação do trímero de ficolina, e um domínio C-terminal tipo fibrinogênio. O oligômero de ficolina é composto de 4 a 8 unidades de trímeros (correspondendo a 12-24 monômeros) unidos por pontes dissulfeto na região N-terminal.

As ficolinas-1 e -2 compartilham 79% nas sequências de aminoácidos e acredita-se que surgiram de uma duplicação de genes recente, localizados no cromossomo 9. Por outro lado, a ficolina-3 não compartilha o mesmo nível de semelhança, sendo seu gene encontrado no cromossomo 1 (Figura 6) (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2007; MATSUSHITA et al., 1996). Os genes *FCN1*, *FCN2* e *FCN3* apresentam uma organização éxon-ínteron altamente conservado entre eles, com duas diferenças principais: perda do quarto éxon no *FCN2* e o terceiro éxon mais curto no *FCN3*. O primeiro e segundo éxons dos três genes codificam a região N-terminal da proteína e a parte N terminal do domínio tipo colágeno. Os quatro últimos éxons codificam o domínio tipo fibrinogênio todo. Porém, a organização dos éxons que codificam a porção N-terminal do domínio tipo colágeno é diferente entre eles (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015).

FIGURA 6. COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA ÉXON-ÍNTRON ENTRE AS FICOLINAS



FONTE: Adaptado de ENDO et al. (2015)

LEGENDA: As caixas representam os éxons e a cor da caixa mostra a região de codificação correspondente a cada domínio da ficolina. Os números 0, 1 e 2 entre as caixas representam a fase de inserção do íntron. A letra C representa a posição do resíduo conservado de cisteína.

### 2.4.1 Ficolina-1

A ficolina-1 é encontrada ligada a membrana celular de monócitos/macrófagos, nos grânulos secretórios dos neutrófilos e nas células epiteliais alveolares tipo II nos pulmões (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015). Também é encontrada em baixa concentração solúvel no plasma, com uma média de 1069 ng/mL (intervalo 280 – 4050 ng/mL) (WITTENBORN et al., 2010). A ficolina-1 reconhece compostos acetilados comuns, incluindo N-acetil-D-glucosamina e N-acetil-galactosamina e resíduos de ácido siálico (REN; DING; ZHANG, 2014), ligando-se a diversos microrganismos como: *Streptococcus agalactiae* (KJAER et al., 2011), polissacarídeos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus mitis* (KJAER et al., 2013), *Salmonella typhimurium* LT2 (LIU et al., 2005), *Escherichia coli* (TEH et al., 2000) e *Pseudomonas aeruginosa* (HAERYNCK et al., 2012). Foi demonstrado que ficolina-1 recombinante forma complexo com MASP-2, resultando em ativação do complemento após ligação com GlcNAc. E que quando presente na superfície dos monócitos e granulócitos se liga ao ácido siálico através do domínio tipo fibrinogênio, podendo ter funções imunomoduladoras (HONORÉ et al., 2010; KJAER et al., 2011).

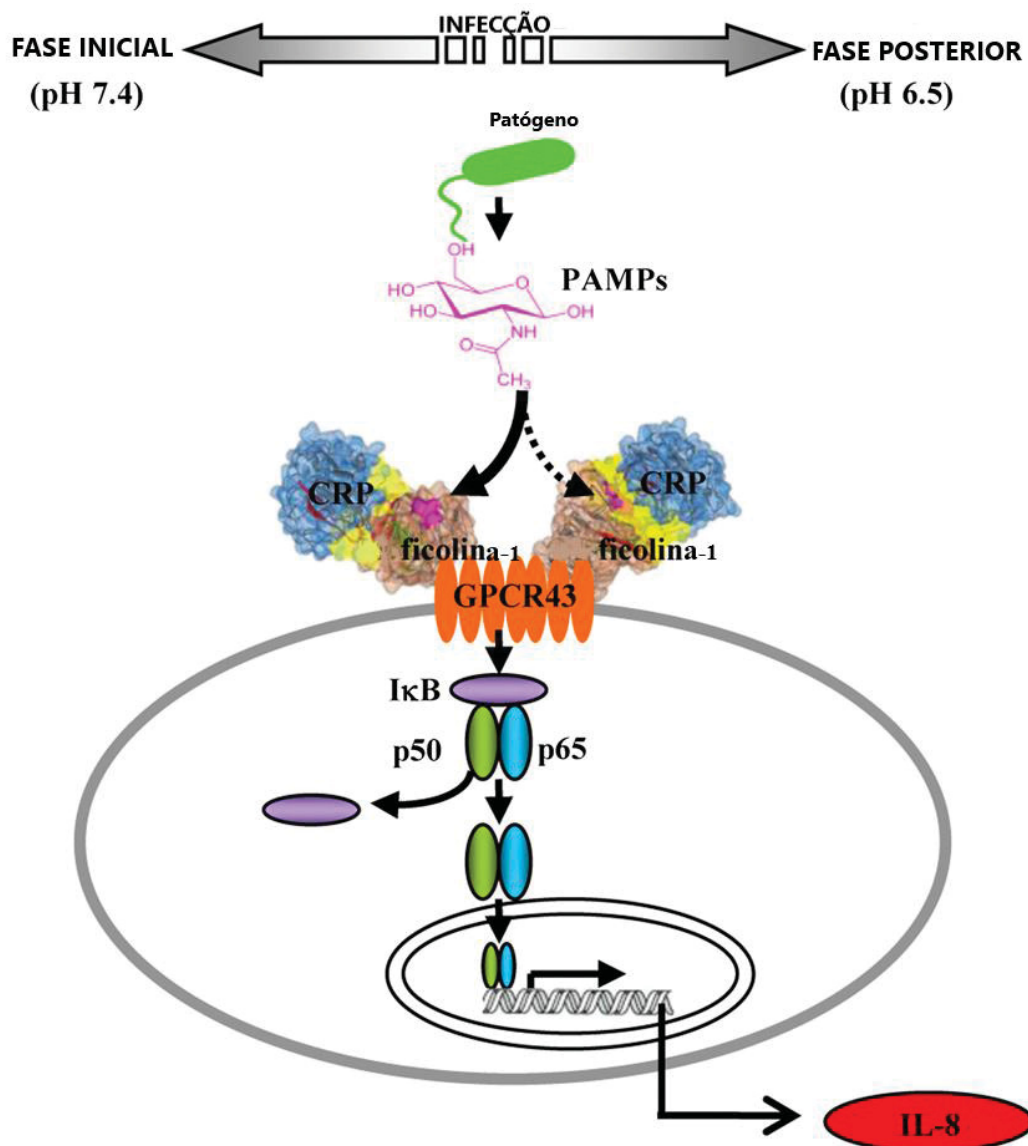
A ficolina-1 interage com uma variedade de proteínas, tanto do sistema complemento quanto outras: MASPs (LIU et al., 2005), CD43 (MORENO-AMARAL et al., 2012), tectonina (LOW et al., 2009), Proteína C reativa (CRP) (TANIO; WAKAMATSU; KOHNO, 2009), receptor 43 acoplado à proteína G (GPCR43) (THOMSEN et al., 2011) e lipoproteína ativada de baixa densidade (FARO et al., 2008).

Além do seu papel na ativação do complemento através da via das lectinas, ficolina-1 tem um papel na ligação e captação de material na fagocitose. Estudos tem demonstrado que a ficolina-1 liga-se a microrganismos nos fagossomos e uma vez que o pH no fagossomo diminui abaixo do fisiológico, a ficolina-1 sofre uma mudança conformacional liberando o microrganismo ligado que é então reciclado para a superfície celular (GARLATTI et al., 2007). Também

pode ligar-se a leucosialina, a maior sialoproteína do neutrófilo, conhecida como CD43, na superfície da célula de uma maneira autócrina, induzindo adesão de neutrófilos, importante na fase inicial da inflamação (MORENO-AMARAL et al., 2012).

Cerca de 90% da ficolina-1 encontra-se associada constitutivamente a um receptor transmembranar, o GPCR43 de monócitos em condições fisiológicas (GARRED et al., 2009). Ao se ligar a um PAMP ou DAMP, o complexo ficolina-1-GPCR43 ativa a cascata de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-kB), aumentando a produção de interleucina-8 (IL-8). A leve acidose no local da infecção induz mudança conformacional da ficolina-1 provocando forte interação com a CRP. A formação do complexo CRP-ficolina-1-GPCR43 sob acidose reduz a interação de ficolina-1-GPCR43, e consequente produção de IL-8, impedindo a super ativação imunológica (Figura 7) (ZHANG et al., 2010). A interação da ficolina-1 com a CRP impulsiona tanto a via das lectinas quanto a via clássica, pois a CRP reconhece uma grande variedade de ligantes incluindo fosforilcolina e polissacarídeos nos microrganismos, e inicia a via clássica por interação com C1q (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015).

FIGURA 7 – MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL MEDIADO POR FICOLINA-1



FONTE: Adaptado de Zhang et al (2010)

LEGENDA: Ao detectar a porção GlcNAc nos PAMPs bacterianos, a interação entre ficolina-1 (marrom) e GPCR43 (laranja) sinaliza via ativação de NF-κB, levando à expressão de IL-8. A infecção perturba o pH microambiental, o que induz alterações conformacionais na molécula da ficolina-1 e, por sua vez, regula a secreção de IL-8. Na fase inicial, onde o pH ainda é fisiológico, a CRP se liga fracamente à ficolina-1. Essa interação proteína-proteína expõe a região de ligação ao PAMP (rosa) da ficolina-1 (seta grossa), que regula positivamente a IL-8. Na fase posterior, a acidose local aumenta substancialmente a interação da CRP-ficolina-1, bloqueando assim o local de ligação do PAMP à ficolina-1 (seta tracejada). Este processo interrompe a regulação positiva da expressão de IL-8 e restaura a homeostase.

O gene *FCN1* está localizado no cromossomo 9q34 (AMMITZBOLL et al., 2012b) e possui nove éxons (Figura 8), sendo expresso em neutrófilos e monócitos, células derivadas da medula óssea e em menor extensão no baço e no pulmão (GARRED; BORREGAARD, 2010). Entre os diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) descritos para o gene *FCN1*, pelo menos oito estão associados com as concentrações de ficolina-1, sendo que quatro deles estão localizados na região promotora e no primeiro éxon (rs7857015/-1524T>C, rs10120023/-542G>A, rs10117466/-144C>A e rs10858293/+33G>T) (AMMITZBOLL et al., 2012b). O genótipo AA do polimorfismo -144C>A (rs10117466) foi associado a um aumento de 26% na concentração da ficolina-1. No entanto, outras mutações como Ala218Thr (rs148649884/6658G>A) e Asn289Ser (rs138055828/7959A>G) foram associadas a uma menor concentração de ficolina-1. Verificou-se que a mutação Ser268Pro (rs150625869/7895T>C) levou à falha na produção de ficolina-1 (AMMITZBOLL et al., 2012b). Todavia, até o momento não foram reportados casos de deficiência da ficolina-1 (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015). Estes polimorfismos são em parte responsáveis por uma ampla variabilidade interindividual de concentrações séricas de ficolina-1 (WITTENBORN et al., 2010). Os alelos menos frequentes dos SNPs rs10120023 (-542G>A) e rs10117466 (-144C>A) de *FCN1*, associados com alta concentração de ficolina-1, foram relacionados com aumento de desfechos fatais em pacientes com inflamação sistêmica (MUNTHE-FOG et al., 2012). Outro estudo encontrou associação entre os SNPs rs2989727 (-1981G>A) e rs1071583 (+7919A>G) com a suscetibilidade a artrite reumatoide (VANDER CRUYSSSEN et al., 2007). Já pacientes com fibrose cística que tinham o alelo menos frequente para os SNPs rs2989727 (-1981A>G) e rs1071583 (+246G>A) apresentaram maior colonização por *P. aeruginosa* (HAERYNCK et al., 2012). Os alelos -542A-144C dos SNPs rs10120023 e rs10117466 conferiram proteção contra hanseníase (BOLDT et al., 2013).

Baixas concentrações de ficolina-1 estão associadas com um aumento na fatalidade na enterocolite necrotizante e com a necessidade de ventilação mecânica em prematuros (SCHLAPBACH et al., 2012), assim como com ocorrência de infecções graves nos pacientes com câncer após quimioterapia



(AMEYE et al., 2012). Entre pacientes HIV, aqueles coinfetados com HCV apresentaram concentrações ainda mais baixas de ficolina-1 (TIZZOT et al., 2018). Seis horas após acidente vascular cerebral isquêmico, foram observadas baixas concentrações de ficolina-1 nos pacientes, quando comparados ao grupo controle, indicando um consumo de ficolina-1 consistente com ativação exacerbada da via das lectinas (ZANGARI et al., 2016). Por outro lado, concentrações mais altas de ficolina-1 foram encontradas em pacientes com artrite reumatoide inicial e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide e osteoartrite (AMMITZBOLL et al., 2012a), sendo que após o tratamento as concentrações séricas de ficolina-1 diminuíram 26% (AMMITZBOLL et al., 2013).

#### 2.4.2 Ficolina-3

A ficolina-3 foi a primeira ficolina a ser identificada e é a molécula de reconhecimento mais abundante da via das lectinas com uma concentração sérica média de 18,4 µg/mL, variando de 11 à 33 µg/mL (KRARUP et al., 2005; MUNTHER-FOG et al., 2008). Ficolina-3 é fortemente expressa no fígado e pulmão, indicando sua importância tanto na ativação da via das lectinas quanto na defesa pulmonar do hospedeiro (AKAIWA et al., 1999; HUMMELSHOJ et al., 2008b). É considerada importante tanto na resposta imune inata local quanto sistêmica, e quando associada às MASPs, ativa o complemento pela via das lectinas (GARRED; BORREGAARD, 2010; HUMMELSHOJ et al., 2008b; MATSUSHITA, 2013).

A ficolina-3 reconhece grupos acetilados presentes em diversos microrganismos, incluindo *Salmonella typhimurium* e *Salmonella minnesota* (SUGIMOTO et al., 1998), *Aerococcus viridans* (KRARUP et al., 2005; TSUJIMURA et al., 2002), *Escherichia coli* e *Pasteurella pneumotropica* (SAHAGUM RUIZ et al., 2015) e *Hafnia alvei* (SWIERZKO et al., 2012). Também reconhece D-fucose (SUGIMOTO et al., 1998), compartilha locais de ligação com ficolina-2 e MBL na superfície de *Giardia intestinalis* (EVANS-OSSES et al.,

2010), além de inibir a replicação do vírus Influenza A (VERMA et al., 2012). Além disso, a ficolina-3 pode mediar a depuração de células apoptóticas tardias e pode ter um papel benéfico contra a autoimunidade (HONORÉ et al., 2007; KURAYA et al., 2005).

Foi demonstrado que anticorpos naturais IgG interagem com o domínio tipo fibrinogênio da ficolina-3, sob condições de acidose leve e hipocalcemia induzida por infecção/inflamação (PANDA et al., 2013, 2014). Este complexo imune Ficolina-3-IgG estimula a fagocitose de alvos através do receptor Fc, FcγR1, nos monócitos. E a ligação de IgG com FcγR1 desencadeia a via de sinalização a jusante, demonstrando que o complexo IgG-ficolina-3 interliga a imunidade inata com a adaptativa (PANDA et al., 2014).

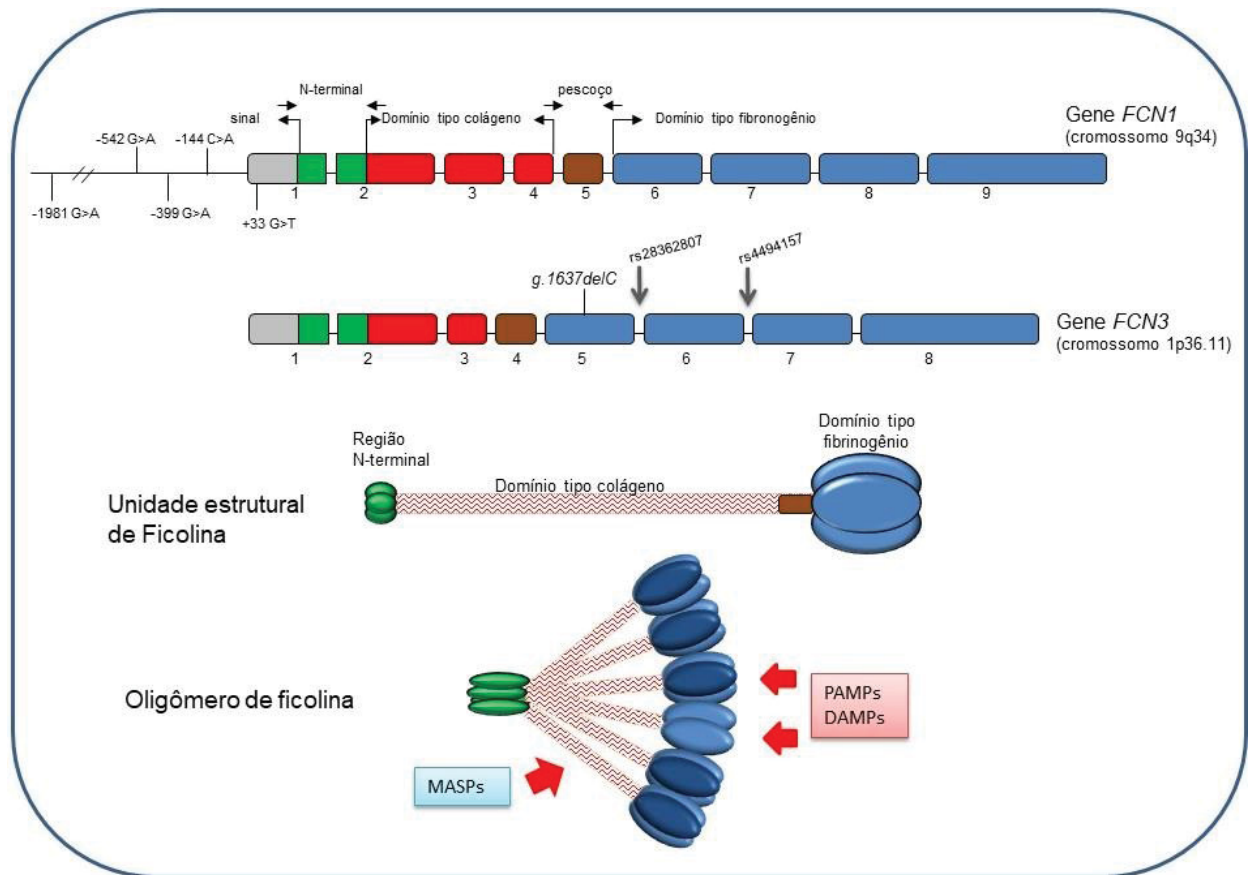
O gene *FCN3* está localizado no cromossomo 1p36.11 e compreende oito éxons, sendo um deles éxon alternativo (éxon 4) (Figura 8). Os transcritos de *FCN3* (com ou sem o éxon 4) ocorrem principalmente no pulmão, mas também no fígado, coração, rins, glândula adrenal, tireoide e tecido adiposo visceral. Já o transcrito curto é menos abundante (ANDRADE et al., 2017a). Os éxons são altamente conservados em humanos e embora 164 variantes polimórficas não codificantes estejam listadas no site Ensembl, todas as variações codificantes ocorrem numa frequência abaixo de 1% (ANDRADE et al., 2017a; HUMMELSHOJ et al., 2008a). Esta alta conservação genômica indica que a ficolina-3 exerce uma função crucial na resposta imune. De fato, insuficiência de ficolina-3 é extremamente rara (THIEL, 2007) e foi encontrada em neonatos prematuros com enterocolite necrotizante (SCHLAPBACH et al., 2011).

Homozigose para a mutação +1637delC (rs532781899) no gene *FCN3* foi associada com deficiência congênita de ficolina-3; esta variante codifica uma proteína truncada com falta do domínio tipo fibrinogênio, com ficolina-3 indetectável no soro e ocasionando infecções recorrentes (MUNTHER-FOG et al., 2009). Em heterozigose esta mutação está relacionada a baixas concentrações séricas de ficolina-3 (MICHALSKI et al., 2015). A frequência do genótipo +1637delC em heterozigose varia de 0,02 a 0,03 mundialmente (ENSEMBL, 2020) e em homozigose é de 1 a cada 10.000 habitantes (MUNTHER-FOG et al., 2009). Em outro estudo, o SNP rs2504778 foi associado a hipertensão na

população chinesa (LU et al., 2012).

Baixa concentração de ficolina-3 já foi associada com a gravidade e progressão da insuficiência cardíaca crônica (PROHÁSZKA et al., 2013), sarcoidose (SVENDSEN et al., 2008), infecções relacionadas com quimioterapia em crianças (SCHLAPBACH et al., 2009a), baixo peso ao nascimento em recém-natos na Polônia (MICHALSKI et al., 2011) e doença de Crohn (SCHAFFER et al., 2013). Por outro lado, altas concentrações de ficolina-3 foram observadas em pacientes HIV com e sem coinfeção com HCV (TIZZOT et al., 2018), hanseníase (ANDRADE et al., 2017b), lúpus eritematoso sistêmico (ANDERSEN et al., 2009), câncer de ovário (SZALA et al., 2013), crianças com leucemia aguda (SCHLAPBACH et al., 2009a) e associadas a menor sobrevida em transplante renal (SMEDBRÅTEN et al., 2015).

FIGURA 8 – ESTRUTURA GÊNICA E POLIMORFISMOS DOS GENES *FCN1* E *FCN3*, RELACIONADOS AOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA



FONTE: O autor (2019)

LEGENDA: Estrutura dos éxons e correspondência para os domínios na estrutura trimérica da ficolina: cinza - região não traduzida, verde – domínio de trimerização N-terminal, vermelho – haste colagenosa, marrom – região do pescoço, azul – domínio tipo fibrinogênio. Os locais aproximados dos polimorfismos investigados são dados de acordo com o número de pares de base, contando a partir do primeiro nucleotídeo transcrito.

## 2.5 COMPLEMENTO E FR

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra infecções, recrutando células imunes para o local da infecção e ativando o sistema imune adaptativo através de apresentação de antígeno, produção de citocinas e ativação do complemento. Desta forma, é esperado que variações nos genes que codificam as proteínas envolvidas na ativação do complemento possam influenciar a predisposição à FR e CRC (AZEVEDO; PEREIRA; GUILHERME, 2011).

Na década de 60, pesquisadores estudaram necropsias de tecido cardíaco de pacientes com FR e encontraram depósitos maciços de imunoglobulinas e complemento (KAPLAN; DALLENBACH, 1961). Mais de uma década depois, Sapru et al. encontraram concentrações séricas diminuídas de C3 e CH50 em CRC, provavelmente por consumo, concluindo que a CRC seria uma lesão mediada por complemento (SAPRU et al., 1977). Em outro estudo foi observado também uma redução nas concentrações de C3 com aumento de linfócitos B, complexos IgG circulantes e produtos de degradação de C3 (C3d) em pacientes com FR e CRC, quando comparados com controles (REDDY et al., 1990). Também foi demonstrado que anticorpos contra a proteína M, quando em contato com a cartilagem articular, ativavam mais complemento que soro de controles normais (BAIRD et al., 1991). Algumas evidências também indicam que o complemento causa injúria tecidual durante a resposta inflamatória que segue a cardite reumática. Anticorpos humanos e de coelho específicos para a proteína M estreptocócica, por exemplo, ligam-se a cartilagem articular e ativam significativamente o complemento (BAIRD et al., 1991). Anticorpos contra proteínas da hialuronato sintase estreptocócica ligam-se a fibroblastos humanos e causam lise celular mediada por complemento nos pacientes com FR (PREHM et al., 1995). Messias et al. evidenciaram que pacientes com CRC apresentaram uma frequência aumentada do alelo raro do componente C4, C4A\*6 quando comparados a controles, enquanto que o alelo C4A\*3 foi associado com proteção a CRC, sugerindo um papel imunogenético do complemento na doença (MESSIAS; CAVALCANTI; RADOMINSKI, 1995). Ainda, Adderson et al.

demonstraram anticorpos anti-miosina fortemente reativos contra N-acetil-beta-D-glucosamina, epítipo dominante do carboidrato estreptocócico, o qual reage com peptídeos da molécula de miosina cardíaca humana. Entre eles, o anticorpo monoclonal 1.H9 foi moderadamente citotóxico em células cardíacas de ratos *in vitro* na presença de complemento (ADDERSON et al., 1998).

## 2.6 VIA DAS LECTINAS E FR

Nosso grupo de pesquisa tem investigado o papel dos componentes da via das lectinas na FR e CRC, particularmente envolvendo a lectina ligante de manose (MBL), ficolina-2 e MASP-2, com achados que apontam envolvimento da via das lectinas na FR e CRC.

A concentração sérica de MBL, quando comparada com controles, variou em dois estudos publicados, sendo significativamente mais alta em pacientes CRC do sul do Brasil (SCHAFRANSKI et al., 2004), e mais baixa em pacientes CRC do lêmén (SCALZI et al., 2010), onde os autores alegaram alto consumo da proteína na fase crônica da doença. Por outro lado, altas concentrações de MBL poderia ser a causa da ativação indesejada do complemento nestes pacientes, contribuindo para a patogênese da cardiomiopatia reumática. Outro estudo demonstrou uma forte ligação da MBL com o GAS, assim como com outros microrganismos. A MBL ligada ao GAS foi capaz de promover a deposição de C4 de maneira concentração-dependente (NETH et al., 2000).

Do ponto de vista genético, genótipos de *MBL2* associados com altas concentrações de MBL foram significativamente associados com CRC, e uma variante alélica do éxon 1 mostrou um efeito protetor contra CRC, sugerindo um papel destes genótipos na patogênese da CRC (MESSIAS REASON et al., 2006). Posteriormente estes achados foram confirmados em outro estudo, onde altas concentrações de MBL foram associadas ao risco de CRC e os genótipos associados com alta produção foram associados com cardite aguda e crônica (SCHAFRANSKI et al., 2008). Outro estudo em pacientes com regurgitação

aórtica grave crônica de etiologia reumática demonstrou que polimorfismos nos códons 52, 54 e 57 do éxon 1 de *MBL2* estão associados com o agravamento da lesão (RAMASAWMY et al., 2008). Um estudo envolvendo adolescentes chineses com CRC não encontrou associação com polimorfismos do éxon 1 de *MBL2* e a doença, porém pacientes portadores do alelo B apresentaram uma menor média de idade do início dos sintomas quando comparados com o alelo AA em homozigose (JIN; JI; HU, 2001).

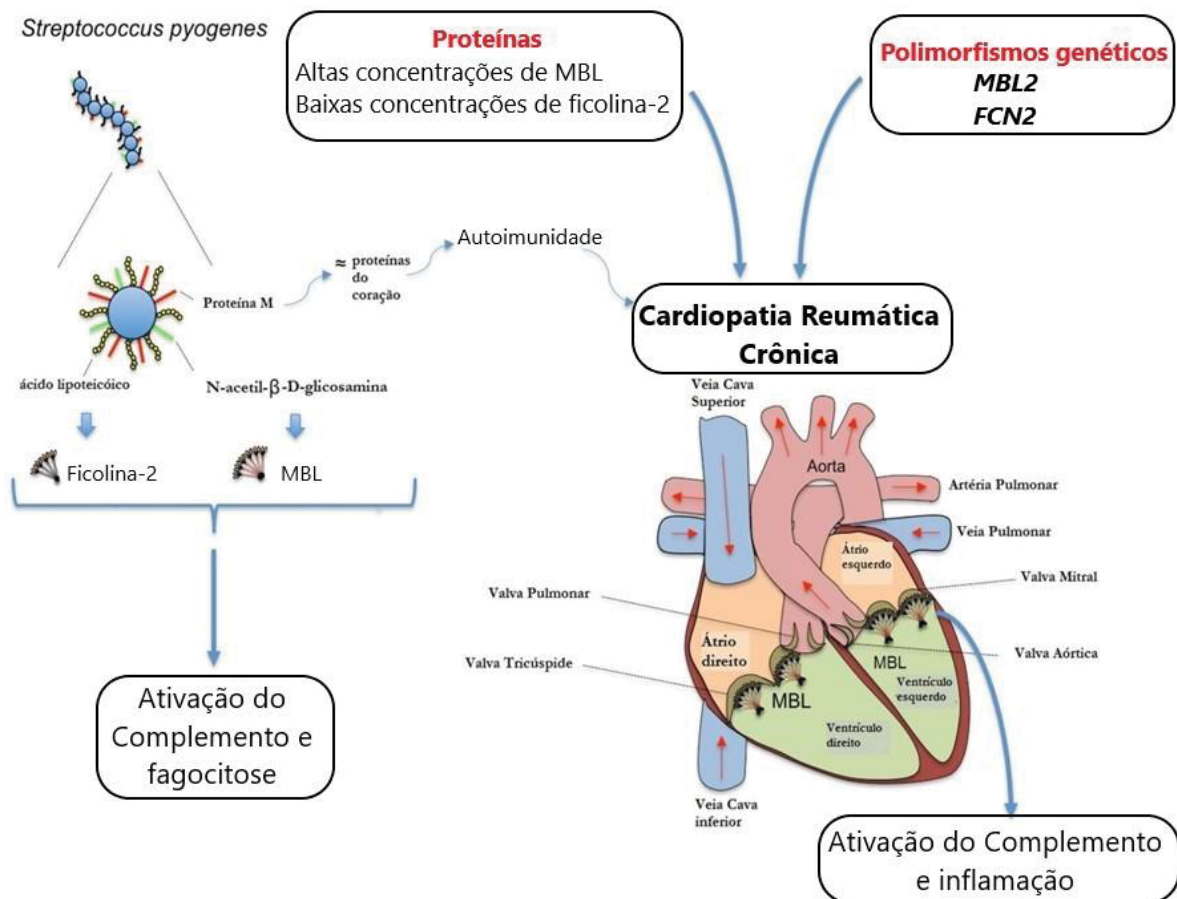
A possível associação da ficolina-2 com FR e CRC foi investigada no mesmo coorte de pacientes e controles, com determinação dos polimorfismos da região promotora do gene *FCN2* (posições -986, -602 e -4). O haplótipo GGA, relacionado a baixas concentrações de Ficolina-2, foi associado com maior suscetibilidade a CRC, sugerindo que este haplótipo pode ter um papel na progressão da FR, podendo representar um fator de risco para o desenvolvimento e progressão clínica da doença. Já o haplótipo AGA foi mais frequente em controles, tendo um efeito protetor contra FR e CRC (MESSIAS-REASON et al., 2009). O possível papel da MBL e da ficolina-2 na FR e CRC está resumido na figura 9.

Além disso, já foi demonstrado que a ficolina-2 liga-se ao ácido lipoteicóico (LTA), um componente da parede celular de todas as bactérias Gram positivas. LTA de *Staphilococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae* ligam-se à complexos de ficolina-2 no soro, iniciando a via das lectinas. O mesmo não se observou com ficolina-3 ou MBL (LYNCH et al., 2004). E também, um papel das ficolinas na proteção contra infecção por *Streptococcus pneumoniae* foi mostrado em modelos animais utilizando ratos deficientes em ficolinas, corroborando a contribuição destas moléculas na defesa imunológica durante a infecção estreptocócica (ENDO et al., 2012).

MASP-2 também parece desempenhar um importante papel no desenvolvimento da FR e CRC. Um estudo de 11 SNPs do gene *MASP2* assim como a concentração sérica de MASP-2, encontrou que os alelos p.377V (rs2273346) e p.439R (rs12085877) foram associados a proteção contra a FR e CRC. Por outro lado, haplótipos que compartilham o íntron 9 e éxon 12 (SNPs g.1961795C, p.371D, p.377V e p.439R) aumentaram a suscetibilidade a CRC.

Além disso, a concentração sérica de MASP-2 foi mais baixa nos pacientes quando comparados aos controles (CATARINO et al., 2014).

FIGURA 9 – POSSÍVEL PAPEL DA MBL E DA FICOLINA-2 NA FR/CRC



FONTE: adaptado de Beltrame et al. (2015a)

LEGENDA: O GAS apresenta diversos PAMPs, incluindo proteína M, ácido lipoteicoico e GlcNAc. A proteína M compartilha homologia estrutural com proteínas cardíacas como a miosina e tropomiosina, levando a formação de autoanticorpos de reação cruzada. MBL e Ficolina-2 ligam-se a GlcNAc e ácido lipoteicoico, respectivamente, induzindo ativação do complemento e fagocitose. Embora conferindo proteção contra a infecção inicial, a MBL pode se depositar nas valvas alteradas, provocando inflamação e dano tecidual nos estágios crônicos da doença. A importância funcional destas proteínas pode variar durante a infecção e estabelecimento da doença, com polimorfismos nos genes *MBL2* e *FCN2* levando a altas concentrações de MBL e baixas de ficolina-2, respectivamente, estando associadas com o aumento da suscetibilidade à CRC.

Apesar da importância da via das lectinas na ativação do complemento e na defesa do organismo contra infecções e na autoimunidade, estudos sobre o



papel dos componentes desta via na FR e CRC ainda são escassos, sendo que até o presente momento não há trabalhos que tenham avaliado o papel de polimorfismos e níveis séricos das ficolinas-1 e -3 na susceptibilidade a FR e CRC. Desta forma justifica-se o presente estudo, na tentativa de clarificar a relação da via das lectinas do complemento com a FR e CRC.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA**

O presente estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do HC/UFPR (CEP/HC 2658.265/2011-11). Todos os participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Fazem parte deste estudo materiais biológicos pertencentes à soroteca e ao banco de DNA do laboratório de Imunopatologia Molecular do CHC/UFPR.

#### **3.2 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA**

Trata-se de um estudo observacional, transversal, do tipo caso-controle.

#### **3.3 CASUÍSTICA**

##### **3.3.1 Pacientes**

Foram investigados um total de 193 pacientes provenientes da Unidade da criança do Hospital Pequeno Príncipe (FRo) e do ambulatório de cardiologia do CHC/UFPR (CRC). Todos os pacientes incluídos no estudo tinham história de FR pregressa de acordo com os critérios de Jones modificados (1992) e não apresentavam outras doenças inflamatórias, neoplasias, endocardite infecciosa

ou outras infecções, no momento da coleta do material.

Na avaliação de SNPs e níveis séricos de ficolina-1 foram incluídos 193 pacientes (Tabela 2). Dentre os pacientes, 138 tinham CRC confirmada por ecocardiograma transtorácico mostrando o envolvimento das válvulas mitral (Tabela 3) ou aórtica e 55 não apresentavam CRC, mas tinham diagnóstico de FR e foram nomeados como FRO (Febre Reumática *only*).

Na avaliação de SNPs e níveis séricos de ficolina-3 foram incluídos 179 pacientes, sendo 126 com CRC e 53 FRO. Dados da caracterização da amostra estão mostrados na Tabela 2.

### 3.3.2 Controles

O grupo controle foi composto de doadores de sangue procedentes do Banco de sangue do Hospital de Clínicas da UFPR e do Centro de Hematoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR). Os controles foram pareados por ancestralidade e idade com os pacientes incluídos na investigação.

TABELA 2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

	Total	Homens	Mulheres	Euro <sup>1</sup>	Afro <sup>2</sup>	Idade <sup>3</sup>	Intervalo <sup>4</sup>	CRC <sup>5</sup>	FRO <sup>6</sup>
Estudo da Ficolina-1									
Pacientes	193	55 (28,5%)	138 (71,5 %)	151 (78,2%)	42 (21,8%)	37	7-76	138	55
Controles	193	68 (35%)	125 (65%)	156 (80,8%)	37 (19,2%)	37	18-64	-	-
Estudo da Ficolina-3									
Pacientes	179	49 (27,4%)	130 (72,6%)	140 (78,2%)	39 (21,8%)	37	7-76	126	53
Controles	170	66 (38,8%)	104 (61,2%)	143 (84,1%)	37 (15,9%)	38	18-61	-	-

LEGENDA: <sup>1</sup>euro-brasileiros; <sup>2</sup>afro-brasileiros; <sup>3</sup>Média de idade; <sup>4</sup>Intervalo de idade; <sup>5</sup>Cardiopatia Reumática Crônica; <sup>6</sup>Febre Reumática sem acometimento cardíaco.

TABELA 3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM CRC

Cardiopatia reumática crônica (CRC)	138 pacientes
Estenose Mitral	83 (60,1%)
Estenose aórtica	25 (18,1%)
Estenose tricúspide	4 (2,9%)
Insuficiência Mitral	67 (48,5%)
Insuficiência aórtica	41 (29,7%)
Insuficiência tricúspide	31 (22,5%)
Concentração de hs-CRP (mg/dL) *	0,83 <sup>#</sup> (0,03-26,10)
Concentração de C3 (mg/dL) **	109,2 <sup>#</sup> (50,3-198)
Concentração de C4 (mg/dL) **	22,7 <sup>#</sup> (6,82-45,4)

LEGENDA: hs-CRP: proteína C ultrasensível; Valores de Referência para hs-CRP: <0,1 mg/dL, para C3: 82-160 mg/dL, para C4: 12-36 mg/dL. #: média; \*: dados coletados de outro trabalho; \*\*: dados já publicados por Schafranski et al. (2008)

### 3.4 MÉTODOS

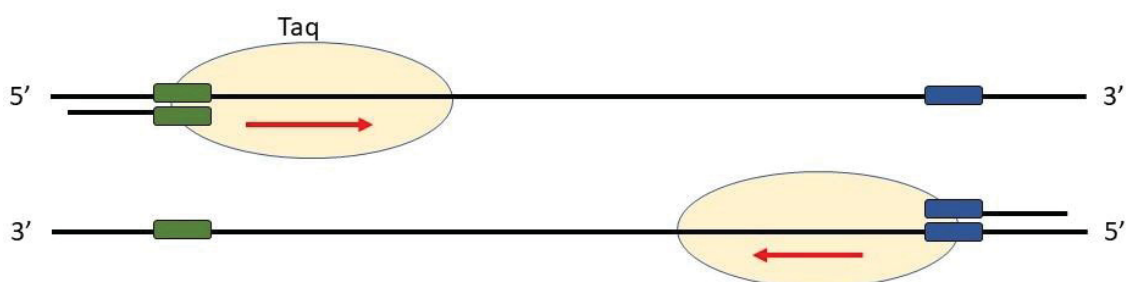
#### 3.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído do sangue total (com anticoagulante EDTA), a partir de alíquota da camada leuco-plaquetária utilizando-se kit de extração QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen (Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante (ANEXO 1).

### 3.4.2 Reação em cadeia da polimerase sequência específica (PCR-SSP)

A PCR se baseia na amplificação seletiva *in vitro* de regiões específicas de DNA e consiste em sucessivos ciclos de desnaturação da dupla fita, hibridação com oligonucleotídeos e extensão da cadeia de DNA por meio da ação da enzima Taq polimerase (SAIKI et al., 1988). Na PCR-SSP, os iniciadores (primers ou oligonucleotídeos), os quais consistem em 18 a 22 nucleotídeos, são projetados de forma que o último nucleotídeo a 5' seja complementar a variante polimórfica de interesse. A tipagem SSP baseia-se na premissa de que, se não houver complementaridade perfeita entre o último nucleotídeo do iniciador e a fita-molde, não há amplificação da sequência desejada, o que permite a tipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene candidato na população estudada. Além disso, os iniciadores da PCR-SSP também devem ser compatíveis com um par de iniciadores genéricos que amplificam o controle endógeno da reação, que caracteriza o controle positivo. Neste trabalho, foram realizadas PCR-SSPs simples, uma vez que é amplificado apenas um fragmento específico por reação, e biespecíficas, onde são utilizados dois iniciadores específicos simultaneamente.

FIGURA 10. ACOPLAMENTO DOS INICIADORES EM UMA PCR BIESPECÍFICA



FONTE: o autor (2020)

LEGENDA: Os SNPs estão representados pelos retângulos verdes e azuis. As linhas longas representam a fita codificante (5' – 3') e a fita molde (3' – 5'), onde se acoplam o iniciador direto e reverso, respectivamente. As linhas curtas com retângulos nas extremidades demonstram a complementaridade perfeita do último nucleotídeo (a 5') dos iniciadores com as fitas de DNA. A Taq polimerase está representada como o círculo amarelo e a seta interna indica a sua atividade.

### 3.4.3 PCR-SSP para o gene *FCN1*

As tipagens foram realizadas através de três protocolos de PCR-SSP, identificando cinco SNPs da região promotora do gene *FCN1*: rs2989727 (-1981 G>A), rs10120023 (-542 G>A), rs17039495 (-399 G>A), rs10117466 (-144 C>A) e rs10858293 (+33 G>T). Na tabela 4 estão listados os SNPs pesquisados com suas respectivas frequências alélicas em algumas populações do mundo.

TABELA 4. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DOS SNPs DE *FCN1* PESQUISADOS

dbSNP	ALELO <sup>1</sup>	GERAL	EUROPEUS		AFRICANOS		EAS <sup>6</sup>
			Ibéricos <sup>2</sup>	CEU <sup>3</sup>	YRI <sup>4</sup>	ACB <sup>5</sup>	Geral
rs2989727	g.3109G>A	G: 49%	G: 39%	G: 41%	G: 49%	G: 58%	G: 57%
	(-1981 G>A)	A: 51%	A: 61%	A: 59%	A: 51%	A: 42%	A: 43%
rs10120023	g.4548G>A	G: 80%	G: 67%	G: 69%	G: 87%	G: 87%	G: 87%
	(-542 G>A)	A: 20%	A: 33%	A: 31%	A: 13%	A: 13%	A: 13%
rs17039495	g.4691G>A	G: 95%	G: 99%	G: 100%	G: 78%	G: 87%	G: 100%
	(-399 G>A)	A: 5%	A: 1%	A: 0%	A: 22%	A: 13%	A: 0%
rs10117466	g.4946C>A	C: 85%	C: 71%	C: 71%	C: 90%	C: 90%	C: 99%
	(-144 C>A)	A: 15%	A: 29%	A: 29%	A: 10%	A: 10%	A: 1%
rs10858293	g.5122G>T	G: 75%	G: 67%	G: 70%	G: 66%	G: 75%	G: 88%
	(+33 G>T)	T: 25%	T: 33%	T: 30%	T: 34%	T: 25%	T: 12%

LEGENDA: dbSNP: nomenclatura de acordo com Single Nucleotide Polymorphism database; <sup>1</sup> NG\_046982.2; <sup>2</sup>: população ibérica na Espanha; <sup>3</sup>: residentes em Utah com ascendência europeia do Norte e ocidental; <sup>4</sup>: Yoruba em Ibadan, Nigéria; <sup>5</sup>: caribenhos africanos em Barbados; <sup>6</sup>: leste da Ásia. FONTE: www.ensembl.org

Utilizaram-se os iniciadores específicos listados na Tabela 5. O oligonucleotídeo FCN1 Prom\_-1981Gf ou FCN1 Prom\_-1981Af foi combinado com o FCN1 Promr gerando um fragmento de 729 pb, permitindo a haplotipagem física de 2 alelos por reação. Um fragmento controle de 500pb do gene *FCN2* foi

simultaneamente gerado. As condições de reação foram: 0,2  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeo 1X tampão Coral Load (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,6 mM  $\text{MgCl}_2$  (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5% glicerol, 0,2 mM deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP) (Invitrogen, SP, Brasil), 0,03 U/ $\mu\text{L}$  de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA, água ultrapura para completar o volume final de 15  $\mu\text{L}$ . O protocolo de amplificação começou com a fase de desnaturação 5 min a 94°C, seguido por 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 56°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 52°C e 30s a 72°C, concluindo com 5 min a 72°C na etapa final de extensão do DNA, de acordo com a estratégia “touchdown” já publicada que garante alta especificidade para a amplificação, enquanto fornece uma grande quantidade de produto de PCR (BOLDT; PETZL-ERLER, 2002).

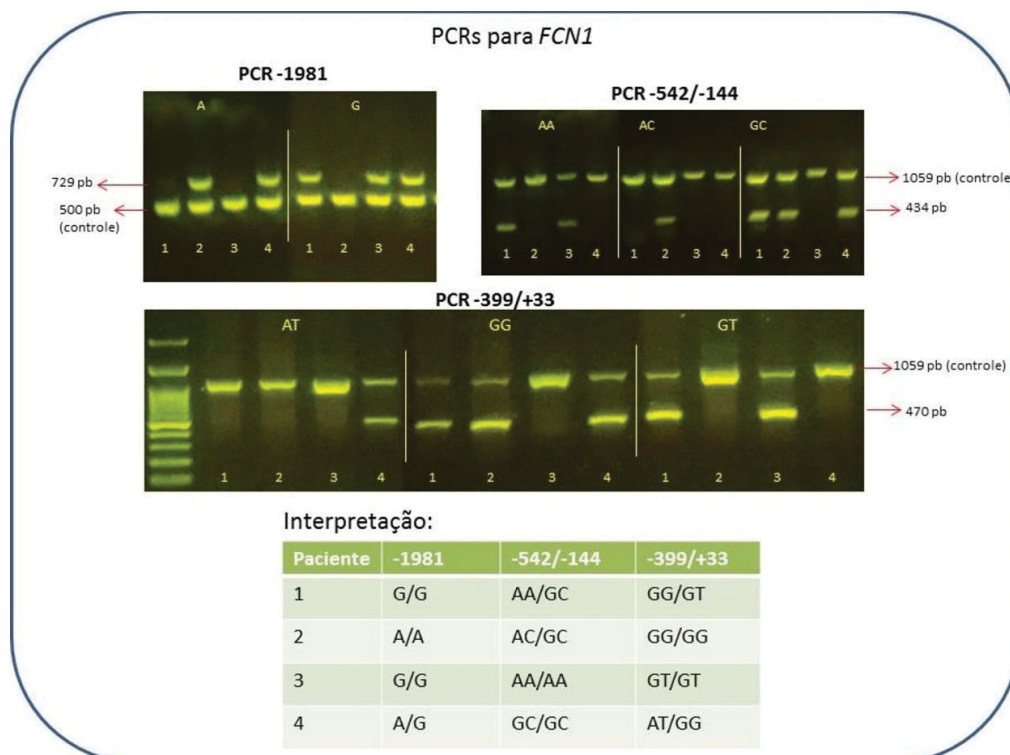
*FCN1\_Prom-542Af* ou *FCN1\_Prom-542Gf* foi combinado com *FCN1\_Prom-144Ar* ou *FCN1\_Prom-144Cr* gerando um fragmento de 434 pb, permitindo a haplotipagem física. Um fragmento controle de 1059pb do gene *MBL2* foi simultaneamente gerado. As condições de reação diferem da anterior no seguinte: 0,6  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeo, 1,7 mM  $\text{MgCl}_2$ , e 1,5% glicerol. O protocolo de amplificação difere do anterior somente na temperatura de anelamento: 57°C nos primeiros 10 ciclos, 55°C nos próximos 10 ciclos e 53°C nos 10 finais.

*FCN1\_Prom-399Af* ou *FCN1\_Prom-399Gf* foi combinado com *FCN1\_Prom+33Gr* ou *FCN1\_Prom+33Tr* gerando um fragmento de 470 pb. Um fragmento controle de 1059pb do gene *MBL2* foi simultaneamente gerado. As condições de reação diferem em: 0,4  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeo, 1,75 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5% glicerol. O protocolo de amplificação difere do primeiro somente nas temperaturas de anelamento: 58°C nos primeiros 10 ciclos, 56°C nos próximos 10 e 54°C nos últimos 15 ciclos. Cada PCR foi acompanhada por controles negativos que incluíam soluções de reação completas, sem o DNA, e controles com genótipo já conhecido de DNA sabidamente positivos ou negativos para os genótipos estudados. A interpretação foi baseada no padrão eletroforético dos fragmentos em gel de agarose 1,5% corado com Sybrsafe (Invitrogen, São Paulo, Brasil), o qual é fluorescente sob luz azul (Figura 10).

TABELA 5 – INICIADORES DAS PCRs PARA *FCN1*

<i>Iniciador</i>	<i>Sequência 5'-3'</i>
FCN1 Prom_-1981Gf	5' CCCATGAGCCTGGTTATCG 3'
FCN1 Prom_-1981Af	5' CCCATGAGCCTGGTTATCA 3'
FCN1 Promr	5' ACCTCCTCTTCCTTGCAACA 3'
FCN1Prom_-542Gf	5' CAAATAATTTACTCCACCG 3'
FCN1 Prom_-542Af	5' CAAATAATTTACTCCACCA 3'
FCN1 Prom_-399Gf	5' AGATGAGGCAAGGAAGCG 3'
FCN1Prom_-399Af	5' AGATGAGGCAAGGAAGCA 3'
FCN1 Ex1_+33Gr	5' ACTAGCAGGACAGCGAGC 3'
FCN1 Ex1_+33Tr	5' ACTAGCAGGACAGCGAGA 3'
FCN1 Prom-144_Ar	5' ACCAACAGGAGGTATGAT 3'
FCN1 Prom-144_Cr	5' ACCAACAGGAGGTATGAG 3'

\*Controle endógeno da PCR: 500pb com o gene *FCN2* (direto: 5'GCCAGGCCTCAGGTATAAAG3' e reverso: 5'AAAGGGTTGATTGCGGAAAC3').  
 & Controle endógeno da PCR: 1059pb com o gene *MBL* (direto: 5'ATGGGGCTAGGCTGCTGAG 3'e reverso: 5'CCAACACGTACCTGGTTCCC3').

FIGURA 10. PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS PCRs PARA *FCN1*

FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: Quatro exemplos de produto final das 3 reações de PCR-SSP para detecção de SNPs no gene *FCN1*, em gel de agarose, com a correspondente interpretação de cada SNP.

### 3.4.4 PCR-SSP para o gene *FCN3*

As tipagens foram realizadas através de dois protocolos de PCR-SSP, identificando três SNPs do gene *FCN3*: rs532781899 (*g.1637delC*), rs28362807 (*g.3524\_3532insTATTTG GCC*) e rs4494157 (*g.4473C>A*). Na tabela 6 estão listados os SNPs pesquisados com suas respectivas frequências alélicas em algumas populações do mundo.

TABELA 6. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DOS SNPs DE *FCN3* PESQUISADOS

dbSNP	ALELO <sup>1</sup>	LOCAL		EUROPEUS		AFRICANOS		EAS <sup>6</sup>
		NO GENE	GERAL	Ibéricos <sup>2</sup>	CEU <sup>3</sup>	YRI <sup>4</sup>	ACB <sup>5</sup>	Geral
rs532781899	<i>g.1637delC</i>	éxon 5	C: 98%	C: 96%	C: 98%	C: 98%	C: 98%	C: 100%
			del: 2%	del: 4%	del: 2%	del: 2%	del: 2%	del: 0%
rs28362807	<i>g.3524_3532ins TATTTG GCC</i>	íntron 5	del: 68%	del: 64%	del: 70%	del: 64%	del: 63%	del: 74%
			ins: 32%	ins: 36%	ins: 30%	ins: 36%	ins: 37%	ins: 26%
rs4494157	<i>g.4473C&gt;A</i>	íntron 7	C: 84%	C: 64%	C: 70%	C: 90%	C: 88%	C: 90%
			A: 16%	A: 36%	A: 30%	A: 10%	A: 12%	A: 10%

LEGENDA: dbSNP: nomenclatura de acordo com Single Nucleotide Polymorphism database; <sup>1</sup>: a posição dos polimorfismos é contada a partir do local de início da tradução do *FCN3*, com o A de ATG sendo +1; <sup>2</sup>: população ibérica na Espanha; <sup>3</sup>: residentes em Utah com ascendência europeia do Norte e ocidental; <sup>4</sup>: Yoruba em Ibadan, Nigéria; <sup>5</sup>: caribenhos africanos em Barbados; <sup>6</sup>: leste da Ásia. FONTE: www.ensembl.org

Para a primeira reação de PCR, os oligonucleotídeos FCN3\_Ex5\_1637del\_R ou FCN3\_Ex5\_1637C\_R foram combinados com FCN3\_Ex5\_F para gerar um fragmento de 748 pb. Um fragmento controle de 500 pb do gene *FCN2* foi simultaneamente gerado. Para a segunda reação de PCR, os oligonucleotídeos FCN3\_In5\_3524\_3532del\_F ou FCN3\_In5\_3524\_3532ins\_F foram combinados com FCN3\_In7\_4473A\_R ou FCN3\_In7\_+4473C\_R para gerar um fragmento de 984 pb. O fragmento controle



de 431 pb do gene *HGH* foi simultaneamente gerado (Tabela 7, Figura 11).

As condições da reação foram: 0,7 µM dos oligonucleotídeos do éxon 5; 0,2 µM dos íntrons 5 e 7 e 0,1 µM dos oligonucleotídeos controles; 1X Tampão Coral Load (Qiagen, Hilden, Alemanha); 2,0-1,75 mM MgCl<sub>2</sub> (somente para a PCR do éxon 5); 1,5% glicerol; 0,2 mM de deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP) (Invitrogen, SP, Brasil); 0,5% Solução Q (somente para a PCR íntron 5 e 7; Qiagen, Hilden, Alemanha); 0,03 U/µL de Taq polimerase (Invitrogen, SP, Brasil); 0,1 µg/mL de DNA e água ultrapura para completar o volume final de 15 µL. O protocolo de amplificação começou com 3 min de desnaturação a 96°C, seguido por 35 ciclos de 15s a 94°C, 30s a temperatura de anelamento específica e 30s a 72°C, concluindo com 5 min a 72°C na fase de extensão final. A temperatura de anelamento diminui a cada 10 ciclos (64°C, 62°C e 60°C para a PCR éxon 5 e 60°C, 58°C e 56°C para a PCR íntrons 5 e 7). O padrão eletroforético das reações pode ser visto na figura 12.

TABELA 7 INICIADORES DAS PCRs PARA *FCN3*

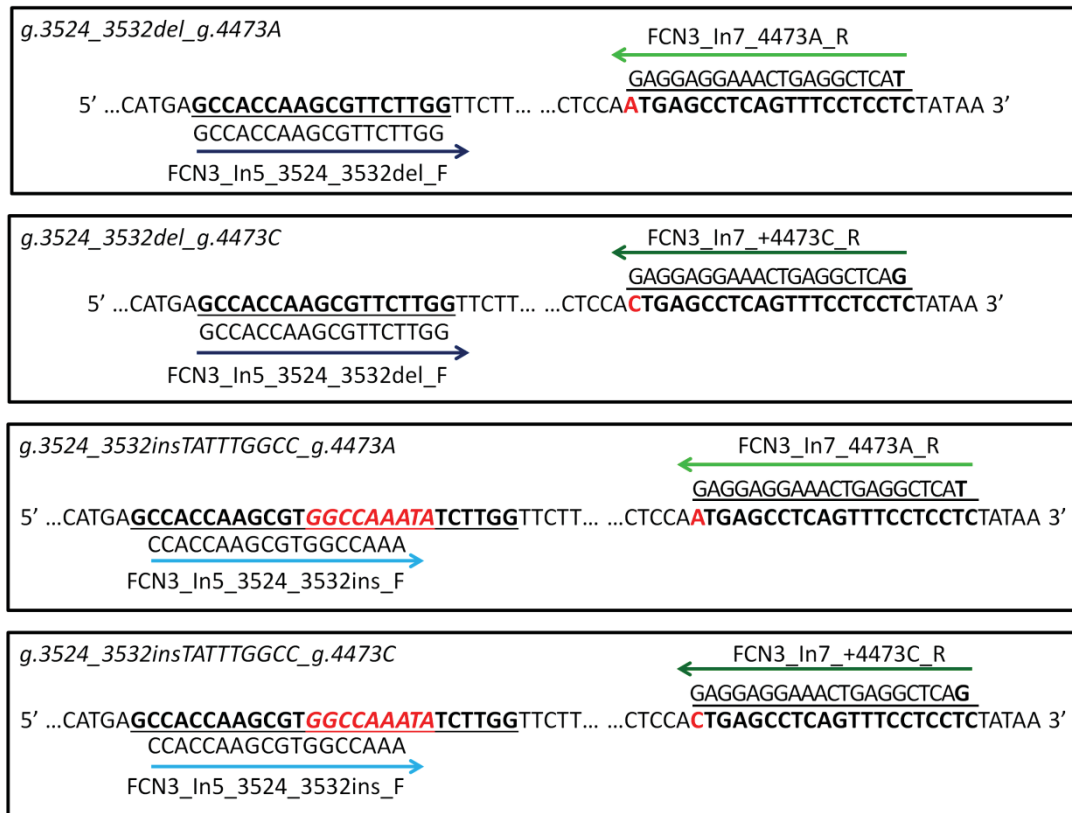
dbSNP	Alelos	Iniciadores 5'-3' direto	
rs532781899	<i>g.1637C</i>	FCN3_Ex5_F	TAGGGTGGGATCTCTGCTTG
rs28362807	<i>g.3524_3532del</i>	FCN3_In5_3524_3532del_F	GCCACCAAGCGTTCTTGG
	<i>g.3524_3532ins</i>	FCN3_In5_3524_3532ins_F	CCACCAAGCGTGGCCAAA
Iniciadores 5'-3' reverso			
rs532781899	<i>g.1637C</i>	FCN3_Ex5_1637C_R	TGTCACAAAAGACTGGGAGGG
	<i>g.1637del</i>	FCN3_Ex5_1637del_R	TGTCACAAAAGACTGGGAGGC
rs4494157	<i>g.4473C</i>	FCN3_In7_4473C_R	GAGGAGGAAACTGAGGCTCAG
	<i>g.4473<sup>a</sup></i>	FCN3_In7_4473A_R	GAGGAGGAAACTGAGGCTCAT

LEGENDA: \*Controle endógeno da PCR: 500pb com o gene *FCN2* (direto: 5'GCCAGGCCTCAGGTATAAAG3' e reverso: 5'AAAGGGTTGATTGCGGAAAC3').

& Controle endógeno da PCR: 431pb com o gene *HGH* (direto: 5'TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA3' e reverso: 5'CCACTCACGGATTCTGTTGTGTTTC3').

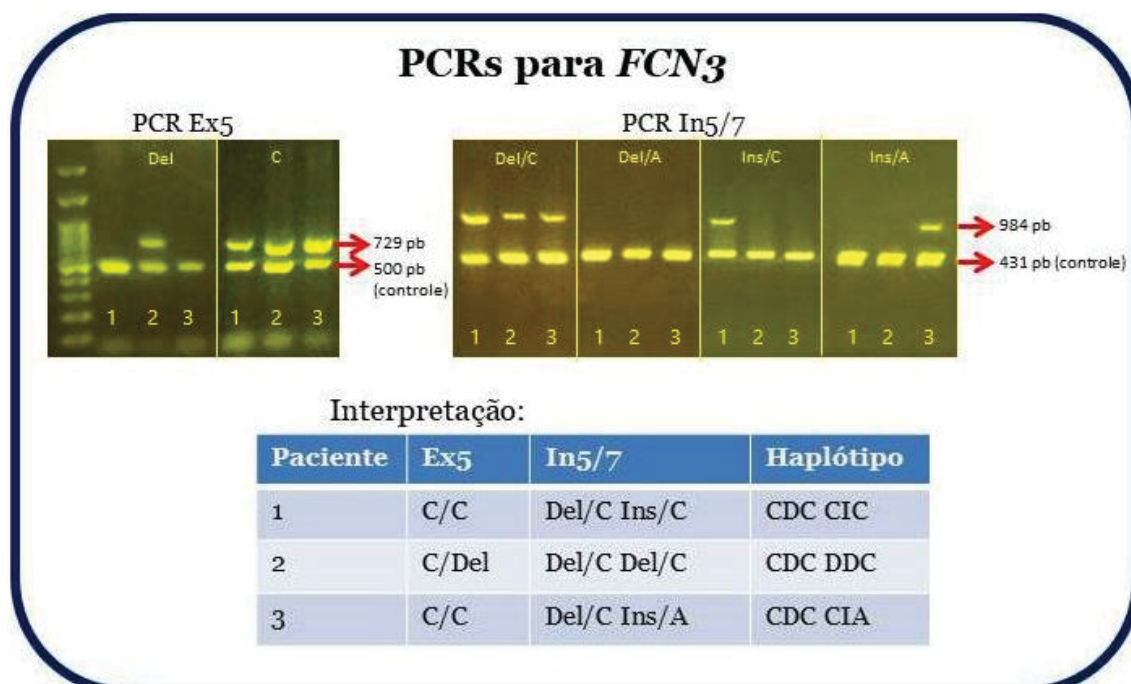
FONTE: Andrade et al., 2017

FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DAS PCRs PARA FCN3



FONTE: Andrade et al., 2017.

LEGENDA: O uso de iniciadores alelo específico forward (setas azul escuro e azul claro) e reverse (setas verde claro e verde escuro) permite a haplotipagem física. Cada caixa representa um haplótipo, especificado no canto superior esquerdo. As sequências de DNA são mostradas de 5' a 3', com uma cadeia de DNA genômico sendo representada, onde as letras em negrito representam a região de anelamento do iniciador e os polimorfismos são mostrados em vermelho. Para cada amostra testada, as quatro combinações de iniciadores forward e reverse são testadas na PCR. A amplificação acontece somente se ambos os iniciadores anelarem perfeitamente no mesmo cromossomo. Se somente uma das quatro combinações resultar em amplificação, o indivíduo é um homocigoto para este haplótipo específico. Se duas combinações resultarem em amplificação, o indivíduo é heterocigoto. As amplificações são visualizadas em gel de agarose após eletroforese. Outro fragmento não relacionado é amplificado na mesma PCR como um controle da eficiência da PCR.

FIGURA 12 PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS PCRs PARA *FCN3*

FONTE: O autor (2019)

LEGENDA: Três exemplos de produto final das 2 reações de PCR-SSP para detecção de SNPs no gene *FCN3*, em gel de agarose, com a correspondente interpretação de cada SNP. Para cada amostra testada, foi realizado três combinações de iniciadores forward e reverse, eliminamos a combinação com frequência muito baixa.

### 3.4.5 Quantificação das proteínas Ficolina-1 e Ficolina-3

As concentrações séricas de Ficolina-1 e Ficolina-3 foram avaliadas em 78 pacientes e 86 controles e; em 76 pacientes e 63 controles, respectivamente, por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay) utilizando o kit comercial SEA786Hu (Ficolina-1) e SEB903Hu (Ficolina-3) marca Cloud-Clone Corp. (Texas, USA), seguindo-se as instruções do fabricante (ANEXO 2). Foi realizado um teste inicial para definir a correta diluição das amostras: com curva de calibração e diluições seriadas de uma amostra conhecida. Para Ficolina-1 a melhor diluição foi 1/5 e para ficolina-3 foi 1/20.000. As concentrações de ficolina-3 foram transformadas de ng/mL para µg/mL para melhor manejo dos dados.

### 3.4.6 Montagem dos haplótipos

Haplótipos são grupos de alelos adjacentes compostos por marcadores que apresentam alto desequilíbrio de ligação (DL) entre si e que portanto, tendem a ser herdados juntos (GABRIEL et al., 2002). O DL ocorre quando dois alelos no mesmo cromossomo segregam de maneira dependente, ou seja, entre eles ocorre pouca ou nenhuma recombinação, e eles tendem a ser herdados juntos como um bloco através da meiose. Loci distantes permitem a ocorrência de permutas, por outro lado, alelos próximos raramente se recombina. Os valores de DL entre os SNPs, calculado através de coeficientes de correlação, foram obtidos através do programa Haploview 4.2, sendo que quanto maior a correlação existente entre eles, mais ligados esses alelos estão entre si (GUPTA; RUSTGI; KULWAL, 2005).

Através das reações de PCR-SSP foram identificados fisicamente diplótipos (haplótipos compostos por 2 SNPs). A montagem completa dos haplótipos foi realizada a partir destes diplótipos, pelo software Plink e confirmado pelo Arlequin v.3.5 através dos algoritmos EML e EBL, não havendo discrepâncias entre os softwares utilizados.

Foi utilizada a nomenclatura filogenética para os haplótipos, através da árvore de máxima parcimônia já descrita pelo nosso grupo de pesquisa para ambos os genes (ANDRADE et al., 2017a; BOLDT et al., 2013).

### 3.4.7 Análise estatística

As frequências alélicas e genotípicas foram determinadas através de contagem direta. Para os testes de homogeneidade entre os grupos investigados utilizamos o software ARLEQUIN v.3.5.

A hipótese de equilíbrio de Hardy e Weinberg foi avaliada utilizando-se os testes exatos propostos por Guo e Thompson (1992) e Raymond e Rousset (1996), no software ARLEQUIN v.3.5. O princípio de Hardy e Weinberg é um

modelo matemático que nos permite prever as frequências genotípicas de uma população por suas frequências alélicas. Uma população está em equilíbrio de Hardy e Weinberg quando as frequências genotípicas se distribuem como  $p^2+2pq+q^2$  (locus bialélico), sendo  $p$  e  $q$  as frequências alélicas. Em populações grandes, com casamentos aleatórios e que não sofra influência de fatores evolutivos, essas frequências devem permanecer estáveis ao longo das gerações. Assim, a avaliação deste modelo pode indicar se uma dada amostra seria representativa da população geral, sobre a qualidade dos dados de genotipagem, bem como possíveis fatores que contribuam para desvio deste modelo, como endogamia, estratificação ou seleção da população ou mesmo associação com a doença (GRAFFELMAN; WEIR, 2018).

Para as análises de associação, foi realizado o teste exato de Fisher bicaudal e regressão logística binária, com o software STATA v.9.2. Quando apropriado, foi calculado o odds ratio, com intervalo de confiança de 95%. A estatística descritiva em relação às concentrações de Ficolina-1 e -3 foi apresentada em mediana e percentis. A distribuição dos dados foi avaliada com o teste Shapiro-Wilk para conformidade com a distribuição normal. Na ausência de normalidade, as medianas foram comparadas através dos testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, utilizando-se o software “GraphPad Prism – versão 5.0”. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta tese foi escrita no modelo recomendado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, sendo que os resultados e discussão serão apresentados na forma de dois artigos.

### 4.1 ARTIGO 1

Título: Sickening or Healing the Heart? The Association of Ficolin-1 and Rheumatic Fever

Publicado no periódico: *Frontiers in Immunology* (dezembro, 2018)

Fator de Impacto: 5,085

Escore de citação: 5,4

Qualis: A1



# Sickening or Healing the Heart? The Association of Ficolin-1 and Rheumatic Fever

Sandra Jeremias Catarino<sup>1</sup>, Fabiana Antunes Andrade<sup>1</sup>, Angelica Beate Winter Boldt<sup>1,2</sup>, Luiza Guilherme<sup>3</sup> and Lara Jose Messias-Reason<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Molecular Immunopathology Laboratory, Department of Medical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil, <sup>2</sup> Human Molecular Genetics Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil, <sup>3</sup> Heart Institute (InCor), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

João P. B. Viola,  
Instituto Nacional de Câncer (INCA),  
Brazil

### Reviewed by:

Thomas Vorup-Jensen,  
Aarhus University, Denmark  
Bryce Einstadt,  
University of Minnesota Twin Cities,  
United States

### \*Correspondence:

Lara Jose Messias-Reason  
larareason@hnc.ufpr.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Innate Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 15 June 2018

Accepted: 05 December 2018

Published: 18 December 2018

### Citation:

Catarino SJ, Andrade FA, Boldt ABW,  
Guilherme L and Messias-Reason LJ  
(2018) Sickening or Healing the  
Heart? The Association of Ficolin-1  
and Rheumatic Fever.  
Front. Immunol. 9:3009.  
doi: 10.3389/fimmu.2018.03009

Rheumatic fever (RF) and its subsequent progression to rheumatic heart disease (RHD) are chronic inflammatory disorders prevalent in children and adolescents in underdeveloped countries, and a contributing factor for high morbidity and mortality rates worldwide. Their primary cause is oropharynx infection by *Streptococcus pyogenes*, whose acetylated residues are recognized by ficolin-1. This is the only membrane-bound, as well as soluble activator molecule of the complement lectin pathway (LP). Although LP genetic polymorphisms are associated with RF, *FCN1* gene's role remains unknown. To understand this role, we haplotyped five *FCN1* promoter polymorphisms by sequence-specific amplification in 193 patients (138 with RHD and 55, RF only) and 193 controls, measuring ficolin-1 serum concentrations in 78 patients and 86 controls, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Patients presented lower ficolin-1 serum levels ( $p < 0.0001$ ), but did not differ according to cardiac commitment. Control's genotype distribution was in the Hardy-Weinberg equilibrium. Four alleles (rs2989727: c.-1981A, rs10120023: c.-542A, rs10117466: c.-144A, and rs10858293: c.33T), all associated with increased *FCN1* gene expression in whole blood or adipose subcutaneous tissue ( $p = 0.000001$ ), were also associated with increased protection against the disease. They occur within the \*3C2 haplotype, associated with an increased protection against RF ( $OR = 0.41$ ,  $p < 0.0001$ ) and with higher ficolin-1 levels in patient serum ( $p = 0.03$ ). In addition, major alleles of these same polymorphisms comprehend the most primitive \*1 haplotype, associated with increased susceptibility to RF ( $OR = 1.76$ ,  $p < 0.0001$ ). Nevertheless, instead of having a clear-cut protective role, the minor c.-1981A and c.-144A alleles were also associated with additive susceptibility to valvar stenosis and mitral insufficiency ( $OR = 3.75$ ,  $p = 0.009$  and  $OR = 3.37$ ,  $p = 0.027$ , respectively). All associations were independent of age, sex or ethnicity. Thus, minor *FCN1* promoter variants may play a protective role against RF, by encouraging bacteria elimination as well as increasing gene expression and protein levels. On the other hand, they may also predispose the patients to RHD symptoms, by probably contributing to chronic inflammation and tissue injury, thus emphasizing the dual importance of ficolin-1 in both conditions.

**Keywords:** *FCN1*, ficolin-1, polymorphism, haplotype, rheumatic fever, rheumatic heart disease

## INTRODUCTION

Rheumatic fever (RF) is an immune-mediated disease occurring in genetically susceptible individuals, as a sequelae of group A (GAS) *Streptococcus pyogenes* pharyngitis. It affects predominantly children and adolescents in low-income and developing countries, where it remains a considerable public health problem (1, 2).

Five major manifestations reflect target tissue involvement in RF, including synovium (inflammatory arthritis), heart valves (endocarditis), brain (Sydenham's chorea), skin (erythema marginatum), and subcutaneous tissue (nodules). Repeated or severe RF episodes can result in permanent damage to the heart valves, leading to rheumatic heart disease (RHD), the most common acquired cardiovascular disease in young adults (3, 4). Rheumatic heart disease (RHD) is associated with high morbidity and mortality, causing 9 million disability-adjusted life years lost, 33 million cases (5) and 275,000 deaths each year (6). This multifactorial disorder involves multiple genetic and environmental factors, not yet fully elucidated. Well-designed case-control studies strive to unravel the genetic susceptibility to this disease, given that the only genome-wide association study done with RHD has rendered no relevant results (7).

Autoimmunity is known to play a role in the pathogenesis of RF and RHD, with tissue damage being mediated by autoantibodies resulting from molecular mimicry between GAS and heart tissue proteins. It has been shown that GAS molecules such as N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine (GlcNAc) and M protein display cross reactivity with valve and myocellular contractile proteins of the host. GlcNAc is the immunodominant cell wall antigen of GAS, recognized by ficolins, molecules that comprise important pattern-recognition receptors (PRRs) of the complement (2, 5, 8, 9).

The complement system plays an important role, both in the defense against GAS infection, as well as in the development of autoimmunity in RHD. This system promptly responds to any pathogen, bridging innate and adaptive immune responses (10–14). Ficolins initiate one of the three complement activation pathways, known as the lectin pathway, along with collectins, as mannose-binding lectin (MBL). They occur in oligomeric structures of a basic homotrimer, where each chain is formed by a collagenous strand and a C-terminal fibrinogen-like recognition domain. The oligomers are complexed with homodimers of serine proteases (MASP-1 or MASP-2). Ficolin oligomers bind specific patterns of acetylated residues on the surface of pathogens or altered cells (8, 15). MASP-1 then autoactivates, transactivating MASP-2 leading to subsequent cleavage of downstream complement components [reviewed by Boldt et al. (16)]. The lectin pathway, along with the classical and alternative pathways, converge at the cleavage of C3 and C5, with subsequent C3b opsonization and pathogen phagocytosis or its

destruction by membrane attack complex (MAC) pores on the cell membrane (17).

Three human ficolins have been described: ficolin-1 (M-ficolin), ficolin-2 (L-ficolin), and ficolin-3 (H-ficolin, Hakata antigen) (15). Unlike any other PRRs, ficolin-1 is expressed by myeloid cells, being found in monocytes, neutrophils and macrophages of the lung and spleen (8). It is also the only one that occurs in both soluble form (0.05–1.0  $\mu$ g/mL in serum) and on the cell membrane (18–20). Apart from other acetylated residues, ficolin-1 has the unique ability to bind sialic acid to capsular polysaccharides of pathogens including *Streptococcus agalactiae*, as well as to the surface of immune cells (21, 22).

Ficolin-1 is encoded by the *FCN1* gene on chromosome 9q34 and contains nine exons. Among the several SNPs described for the *FCN1* gene, at least eight are associated with Ficolin-1 levels, four of them are located in the promoter and one in the first exon (23). Polymorphisms of collectin and ficolin genes have been repeatedly associated with infectious and autoimmune diseases (23–28). *FCN1* polymorphisms were associated with increased fatal outcome in patients with systemic inflammation (29), susceptibility to rheumatoid arthritis (28) and leprosy (26). Gene polymorphisms of the lectin pathway have already been associated with RF in case-control association studies with MBL (30–32), Ficolin-2 (33), and MASP-2 (34). Within this context, we are the first to investigate a membrane-bound molecule of the lectin pathway, able to activate the complement. More specifically, we evaluated the association of *FCN1* polymorphisms and haplotypes, as well as Ficolin-1 serum levels, with the susceptibility to RF and RHD.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects and Samples

This study was approved by the local medical ethics committee (CEP/HC 2658.265/2011-11). All patients and control subjects provided written informed consent in accordance with the *Declaration of Helsinki*. We investigated a total of 193 patients with a history of RF, all of them with ASO (anti streptolysin O) titers higher than 250 units, characterizing a precedent streptococcal infection and diagnosed according to Jones' modified criteria; 55 (28.5%) males and 138 (71.5%) females; with a mean age of 37 years (range = 7–76 years). Among them, 138 had RHD, confirmed by the transthoracic echocardiogram showing rheumatic involvement of the mitral or aortic valves (Table 1), and 55 did not present RHD, but had RF history and were designated as "rheumatic fever only" (RFo) patients. None of the patients presented other inflammatory disease, neoplasia, infective endocarditis, or other infections at the time their blood was collected. Values of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels, C3 levels and C4 levels, previously published by our group, are shown in Table 1 (30). The control group included 193 blood donors from The Clinical Hospital of the University Federal of Paraná, with a mean age of 37 years (range = 18–64 years), 68 (35%) males, and 125 (65%) females.

**Abbreviations:** RF, Rheumatic Fever; RHD, Rheumatic Heart Disease; RFo, Rheumatic Fever only; *FCN1*, ficolin-1 gene; LP, Lectin Pathway; CRP, C-Reactive Protein; MAC, Membrane Attack Complex; GAS, Group A *Streptococcus*; LD, Linkage Disequilibrium; GlcNAc, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine; MBL, Mannose-binding lectin.



### FCN1 Genotyping

DNA extraction from peripheral blood was performed using The QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN (Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. The genotype method was adapted from a previously described multiplex PCR-SSP (sequence-specific amplification) method (30). Five *FCN1* single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped: rs2989727 SNP (c.-1981G > A) in the distal *FCN1* promoter, rs10120023 (c.-542G > A), rs17039495 (c.-399G > A), rs10117466 (c.-144C > A), and rs10858293 (c.+33T > G) SNPs in the proximal *FCN1* promoter, with primers listed in Table S1.

TABLE 1 | Clinical characteristics of patients.

Total patients	183
Males	55 (25.5%)
Females	138 (71.5%)
Mean age	37 years
Rheumatic fever only (RFO)	55 (28.5%)
Rheumatic heart disease (RHD)	138 (71.5%)
Mitral stenosis	83 (60.1%)
Aortic stenosis	25 (18.1%)
Tricuspid stenosis	4 (2.9%)
Mitral insufficiency	67 (48.5%)
Aortic insufficiency	41 (29.7%)
Tricuspid insufficiency	31 (22.5%)
hs-CRP level (mg/dL)	0.83* (0.03–26.10)
C3 level <sup>#</sup> (mg/dL)	109.2* (50.3–198)
C4 level <sup>#</sup> (mg/dL)	22.7* (6.82–45.4)

hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein. Normal reference values for hs-CRP: <0.1 mg/dL, for C3: 82–160 mg/dL, for C4: 12–36 mg/dL. \*mean; <sup>#</sup>Data already published by Schafanski et al. (30).

*FCN1\_Prom-1981Af* or *FCN1\_Prom-1981Gf* were conjugated with the *FCN1\_Prom\_r* reverse primer to generate a fragment of 729 bp. PCR conditions were as follows: 0.2 μM of SSP primers, 1X Coral Load PCR buffer (Qiagen, Hilden, Germany), 1.6 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Hilden, Germany), 0.5% glycerol, 0.2 mM deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 0.03 U/μL of Taq polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 0.1 μg/mL DNA, ultrapure water for 15 μL. The amplification protocol starts with a 5 min denaturation step at 94°C, followed by 10 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C; 10 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 56°C, and 30 s at 72°C; 10 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 52°C, and 30 s at 72°C, concluding with 5 min at 72°C in the final DNA extension step.

*FCN1\_Prom-542Af* or *FCN1\_Prom-542Gf* were conjugated with the *FCN1\_Prom-144Ar* or *FCN1\_Prom-144Cr* to generate a fragment of 434 bp. PCR conditions differed from those previously mentioned as follows: 0.6 μM of SSP primers, 1.7 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1.5% glycerol. The amplification protocol differed from the previous one only by the annealing primer temperatures, which were 57°C in the first 10, 55°C in the next 10, and 53°C in the last 10 cycles.

*FCN1\_Prom-399Af* or *FCN1\_Prom-399Gf* were conjugated with the *FCN1\_Prom+33Gr* or *FCN1\_Prom+33Tr* to generate a fragment of 470 bp. PCR conditions differed from those previously noticed, as follows: 0.4 μM of SSP primers, 1.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% glycerol. The amplification protocol differed from the first one only by the annealing primer temperatures, which were 58°C in the first 10, 56°C in the next 10 and 54°C in the final 15 cycles.

Interpretation was based on the electrophoretic pattern of the amplified fragments, on agarose gels 1.5% stained with Sybrsafe (Invitrogen, São Paulo, Brazil). This bispecific PCR-SSP approach allows the identification of 8 haplotypes: \*1 (GGGCG), \*3A (AGGGG), \*3A.3C2.A (AGGCT), \*3A.3C2.B (AGACT),

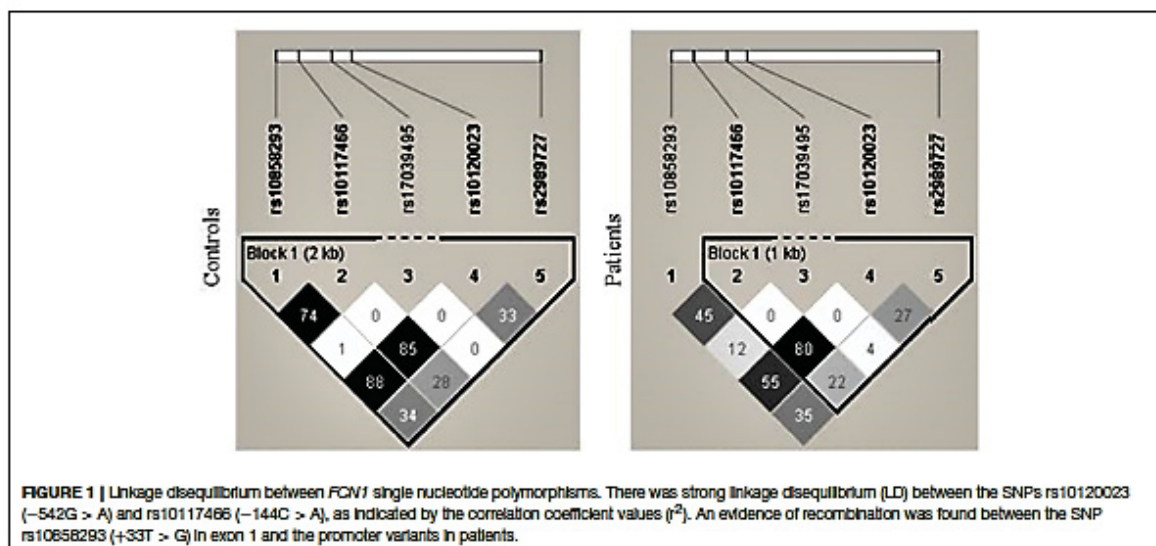


TABLE 2 | FCγR1 allele, genotype and haplotype frequencies and associations with RF.

SNP	Controls N = 193 (%)	Patients N = 193 (%)	RFO patients N = 65 (%)	RHD patients N = 138 (%)	Model	Patients vs. controls OR [95% CI]	P value (Q = 0.00165)	mRNA expression NES (GTex)
<b>rs2989727 (c.-1991G &gt; A)</b>	230 (59.6)	177 (45.9)	53 (48.2)	124 (44.9)	A x G *	0.57 [0.43-0.76]	0.0002	-
G/G	33 (17.1)	53 (27.5)	15 (27.3)	38 (27.5)	A/A x _	0.42 [0.26-0.66]	<0.0001	-
G/A	90 (46.6)	103 (53.4)	27 (49.1)	76 (55.1)	A/_ x G/G	0.54 [0.33-0.89]	0.014 (ns)	-
A/A	70 (36.3)	37 (19.1)	13 (23.6)	24 (17.4)	A/A > A/G > G/G	0.57 [0.43-0.76]	<0.0001	0.32 (P = 5.5e-10) in AS
<b>rs10120023 (c.-542G &gt; A)</b>	127 (32.9)	73 (18.9)	27 (24.5)	46 (16.7)	A x G *	0.48 [0.34-0.66]	<0.0001	-
G/G	84 (43.5)	132 (68.4)	33 (60.0)	99 (71.7)	A/A x _	-	ns	-
G/A	91 (47.2)	49 (25.4)	17 (30.1)	32 (23.2)	A/_ x G/G	0.36 [0.24-0.55]	<0.0001	-
A/A	16 (8.3)	12 (6.2)	5 (9.8)	7 (5.1)	A/A > A/G > G/G	0.48 [0.35-0.66]	<0.0001	0.21 (P = 7.4e-6) in WB 0.24 (P = 0.000001) in AS
<b>rs17039485 (c.-399G &gt; A)</b>	3 (0.8)	14 (3.6)	3 (2.7)	11 (4.0)	A x G *	4.8 [1.37-16.86]	0.012 (ns)	-
G/G	190 (98.4)	179 (92.7)	52 (94.5)	127 (92.0)	A/_ x G/G	4.7 [1.3-16.7]	0.017 (ns)	-
G/A	3 (1.6)	14 (7.3)	3 (5.5)	11 (8.0)	-	-	-	-
<b>rs10117468 (c.-144C &gt; A)</b>	114 (29.5)	61 (15.8)	23 (20.9)	38 (13.8)	A x C *	0.46 [0.32-0.64]	0.00007	-
C/C	92 (47.7)	141 (73.0)	36 (65.4)	105 (76.1)	A/A x _	-	ns	-
C/A	86 (46.6)	43 (22.3)	15 (27.3)	26 (20.3)	A/_ x C/C	0.36 [0.21-0.60]	<0.0001	-
A/A	13 (6.7)	9 (4.7)	4 (7.3)	5 (3.6)	A/A > A/C > C/C	0.53 [0.35-0.78]	0.001	0.21 (P = 1.1e-7) in WB 0.24 (P = 0.000012) in AS
<b>rs10856285 (c.-23G &gt; T)</b>	131 (53.9)	90 (23.3)	29 (26.4)	61 (22.1)	T x G *	0.59 [0.43-0.81]	0.0014	-
G/G	83 (43.0)	114 (59.1)	30 (54.5)	84 (60.8)	T/T x _	0.49 [0.23-1.04]	0.064 (ns)	-
G/T	89 (46.1)	68 (35.2)	21 (38.2)	47 (34.1)	T/_ x G/G	0.52 [0.35-0.78]	0.002 (ns)	-
T/T	21 (10.9)	11 (6.7)	4 (7.3)	7 (5.1)	T/T > T/G > G/G	0.58 [0.43-0.81]	0.001	0.2 (P = 6.2e-7) in WB 0.26 (P = 0.000001) in AS
<b>HAPLOTYPES</b>								
*1 (GGGG)	155 (40.4)	209 (54.1)	57 (51.9)	152 (55.1)	Haplotype	1.74 [1.31-2.33]	0.0002	-
					Recessive	1.8 [1.13-3.02]	0.014 (ns)	-
					Dominant	2.39 [1.5-3.8]	<0.0001	-
					Additive	1.78 [1.31-2.37]	<0.0001	-
*3A (AGGCG)	96 (24.9)	79 (20.5)	20 (18.2)	59 (21.4)	Any	-	ns	-

(Continued)

TABLE 2 | Continued

SNP	Controls N = 183 (%)	Patients N = 183 (%)	RFO patients N = 66 (%)	RHD patients N = 138 (%)	Model	Patients vs. controls OR [95% CI]	P value ( $P = 0.00186$ )	mRNA expression NES (GTEx)
*3C2 (AAGAT)	111 (23.8)	55 (14.2)	20 (18.2)	35 (12.7)	Haplotype Recessive	0.41 [0.29-0.56]	<0.0001	-
					Dominant	0.37 [0.13-1.09]	0.063 (ns)	-
					Additive	0.34 [0.22-0.53]	<0.0001	-
*3A, 3C2.B (AGACT)	3 (0.8)	14 (3.6)	3 (2.7)	11 (4.0)	Haplotype Dominant	0.41 [0.28-0.59]	<0.0001	-
					Any	4.81 (1.37-16.86)	0.018 (ns)	-
*3C1 (AAGCT)	19 (3.4)	10 (2.6)	3 (2.7)	7 (2.5)	Any	4.701 [1.32-16.69]	0.017 (ns)	-
*3A, 3C2.A (AGGCT)	4 (1.0)	11 (2.8)	3 (2.7)	8 (2.9)	Dominant	-	Ns	-
*3C2.3A (AAGAG)	3 (0.8)	6 (1.6)	3 (2.7)	3 (1.1)	Any	2.76 [0.66-8.68]	0.057	-
*3B2 (AAGCG)	0	2 (0.5)	1 (0.9)	1 (0.3)	Any	-	Ns	-
					Any	-	ns	-

NES, Normalized effect size; AS, adipose subcutaneous tissue; WB, whole blood; ns, not significant; Bonferroni corrected significance level  $q = 0.00186/1832$ . The values shown in bold correspond to significant values.

\*3B2 (AAGCG), \*3C1 (AAGCT), \*3C2 (AAGAT), and \*3C2.3A (AGGCG), as previously described (26).

### Ficolin-1 Measurement

Ficolin-1 serum concentrations were measured in 78 patients and 86 controls using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) SEA786Hu Cloud-Clone Corp. (Texas, USA).

### Statistics

Allele, haplotype and genotype frequencies were obtained by direct counting (the phase between distantly situated SNPs could be deduced due to the strong LD between the variants, and were verified with the Expectation-Maximization algorithm implemented in the PLINK software. Exact tests of Guo and Thompson for testing the hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium were accomplished using ARLEQUIN v.3.5.2.2 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>). The investigated polymorphisms were evaluated for regulatory effects on gene expression, using information from The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project. Associations with alleles were tested by the Exact Fisher test using the SISA quantitative skill tables and including genotypes and haplotypes, by multivariate binary logistic regression with the software package STATA v. 9.2. Correction for associated demographic factors (sex, age) and clinical factors were applied in the reduced logistic regression model where sample size was adequate, and  $p$ -values  $\leq 5\%$  were considered significant. Distributions of ficolin-1 levels were tested for normality with the Shapiro-Wilk test. Since ficolin-1 levels presented a non-normal distribution, the two-tailed Mann-Whitney test was used to compare ficolin-1 levels between groups (GraphPad Prism v.7.03).

## RESULTS

### FCN1 Alleles and Haplotypes Association With RF

Genotype distribution was in equilibrium with the Hardy-Weinberg model in both controls and patients, except for SNPs rs10120023 ( $c.-542G > A$ ) and rs10117466 ( $c.-144C > A$ ) in patients ( $p = 0.017$  and  $p = 0.024$ , respectively). A total of eight haplotypes were found in patients and seven, in controls. The phase between the variants in the proximal promoter was determined with bispecific PCR-SSP and the phase of these variants with the SNP  $c.-1981G > A$  could be deduced due to a strong linkage disequilibrium (LD). Evidence for recombination was found between the SNP rs10858293 ( $c.33G > T$ ) in exon 1 and promoter variants in patients (Figure 1).

The  $c.-1981A$ ,  $c.-542A$ ,  $c.-144A$ , and  $c.33T$  alleles were associated with an increased level of protection against RF, presenting an additive effect with homozygotes protecting more than heterozygotes. All four are also known to be associated with higher FCN1 expression in adipose subcutaneous tissue. Three of them present the same effect in peripheral blood cells (GTEx portal) (35). All the protective alleles occur within the \*3C2 haplotype (AAGAT). As expected, this haplotype was also associated with increased protection against RF under the additive model ( $OR = 0.41$ ,  $p < 0.0001$ ). On the other hand,

the common alleles of these SNPs compose the phylogenetically ancestral \*1 (GGGCG) haplotype, which was associated with increased susceptibility to RF ( $OR = 1.76, p < 0.0001$ , Table 2).

In contrast, the *c.*-1981A allele was associated with increased susceptibility to valvular stenosis (5/19 or 26.3% vs. 6/89 or 6.7% A/A homozygotes and 13/19 or 68.4% vs. 39/89 or 43.8% A/G heterozygotes in patients with moderate to severe, vs. light or no valvular stenosis, respectively:  $OR = 3.75$  [95%CI = 1.39–10.15],  $p = 0.009$ ). Similarly, the *c.*-144A allele presented an increased susceptibility effect for mitral insufficiency (2/12 or 16.7% vs. 1/75 or 1.3% A/A homozygotes and 1/12 or 8.3% vs. 4/75 or 5.3% A/C heterozygotes in patients with moderate to severe vs. light or no mitral insufficiency, respectively:  $OR = 3.37$  [95%CI = 1.15–9.92],  $p = 0.027$ ). Although no other allele or haplotype were associated either with RHD or other clinical manifestation, this may be due to the relatively small sample size of RHD patients in our setting.

### Ficolin-1 Levels

Ficolin-1 serum levels were lower in patients (median: 800.5 ng/mL [324.6–1,715 ng/mL]), compared to controls (1,208 ng/mL [488–2,852 ng/mL],  $p < 0.0001$ ), but did not differ between RHD and RFo patient groups (Figure 2).

Patients with the \*1 (GGGCG) “susceptibility” haplotype presented lower ficolin-1 levels, than those with the \*3C2 (AAGAT) “protective” haplotype ( $p = 0.03$ , medians 770.8 and 975.9 ng/mL, respectively) (Figure 3).

### DISCUSSION

The complement system plays an important role both in the defense against GAS infection, as well as in the development of RHD (28, 36, 37). Among studies focusing on complement genetic polymorphisms (30–34), this is the first considering the role of a complement membrane-bound molecule of the lectin pathway in the development of RF and RHD. Our results

indicate that *FCN1* polymorphisms may play a dual role in the physiopathology of RF. On one hand, they increase resistance to GAS infection and on the other hand, predispose the patient to RHD symptoms, once the infection is established.

A protective role for *FCN1* promoter variants against RF has been observed (Figure 4). Among the investigated *FCN1* alleles, those four occurring within the \*3C2 haplotype that were associated with RF protection and ficolin-1 levels have also been associated with higher *FCN1* gene expression (GTEx Portal) and ficolin-1 serum levels in other studies (23, 26, 29). Indeed, it has been suggested that the minor alleles -542A and -144A may facilitate the binding of transcription factors, causing amplified gene expression (29). Thus, it is conceivable that higher *FCN1* gene and protein expression could increase resistance against GAS infection due to ficolin-1 anti-bacterial properties. In fact ficolin-1 is able to bind sialic acid on Group B *Streptococcus* bacteria (20, 38) as well as GAS's carbohydrate A (GlcNAc) which is a preferable ficolin ligand. GAS recognition by ficolins may culminate in complement activation, despite the described complement evasion mechanisms of the bacteria, e.g., through C5a, as well as C2–C9 cleavage (39). Moreover, it is known that GAS infection occurs through fibronectin binding in the extracellular matrix (39). Fibronectin is also a ligand for ficolin-1 (40), thus competition for fibronectin binding sites may occur. Additionally, ficolin-1 anchors to GPCR43, a G-protein coupled receptor on monocytes. Ficolin-1/GPCR43 activation results in signal transduction through NFκB and interleukin-8 (IL8) gene expression. IL8 is a chemokine that attracts phagocytes to the infection site, enhancing bacterial elimination (20). Taken together, these events corroborate the eventual protective effect of ficolin-1 in the development of RF.

On the other hand, these *FCN1* variants associated with high ficolin-1 expression may contribute to excessive complement activation, leading to chronic inflammation and tissue injury, thereby predisposing the patient to RHD symptoms such as valvular stenosis and mitral insufficiency in the advanced phase of the disease. In addition, exposure to neoepitopes on bacteria-damaged valvular tissue would not only induce autoantibody production, but also promote complement activation with MAC deposition, thereby increasing tissue injury. C9, the last MAC complement, was indeed exclusively found in RHD patients with mitral stenosis, compared to control subjects (13). Thus, in the advanced phase of the disease, high ficolin-1 levels would probably not be beneficial. Even though ficolin-1 levels did not differ between RHD and RFo patients, it is possible that the quantification of ficolin-1 in serum does not reflect the levels of membrane-bound ficolin-1, and that the valvular damage could be instead related to this last ficolin-1 form. Keeping this balance—pathogen elimination vs. host preservation, has proven to be very difficult in circumstances where ineffective pathogen elimination induces chronic persistence of the infection with autoimmune features, as is the case of RF/RHD. This would explain other apparently opposite associations of ficolin-1, reported formerly in leprosy for -542A, -144C, and +33T (26), -1981A in rheumatoid arthritis (28) and earlier chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis patients

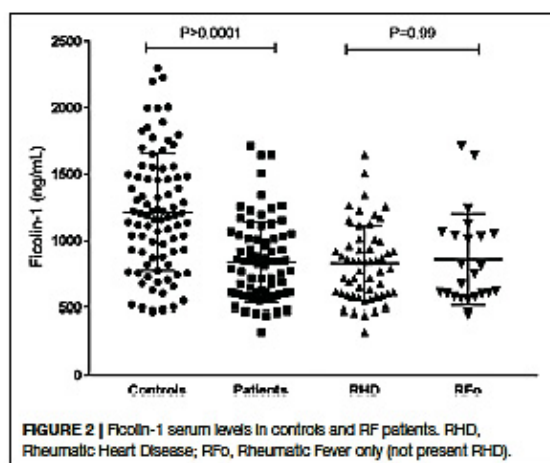
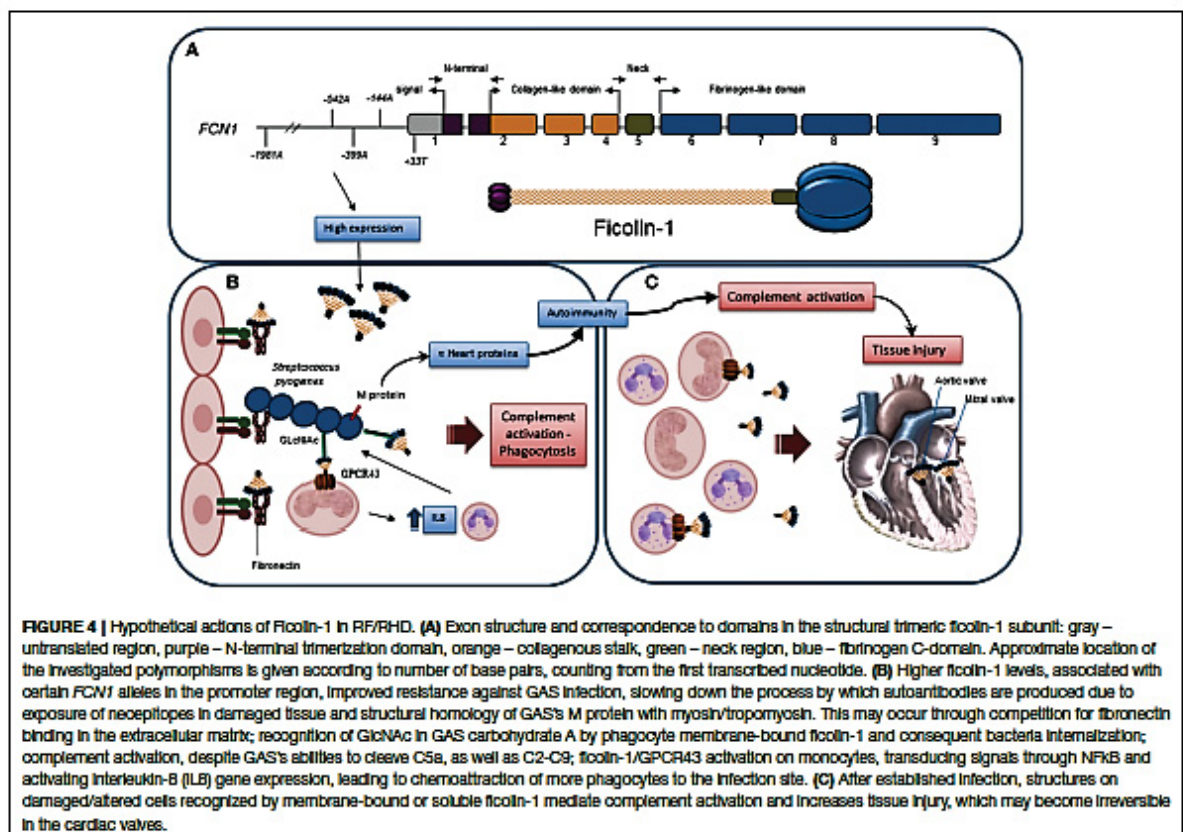
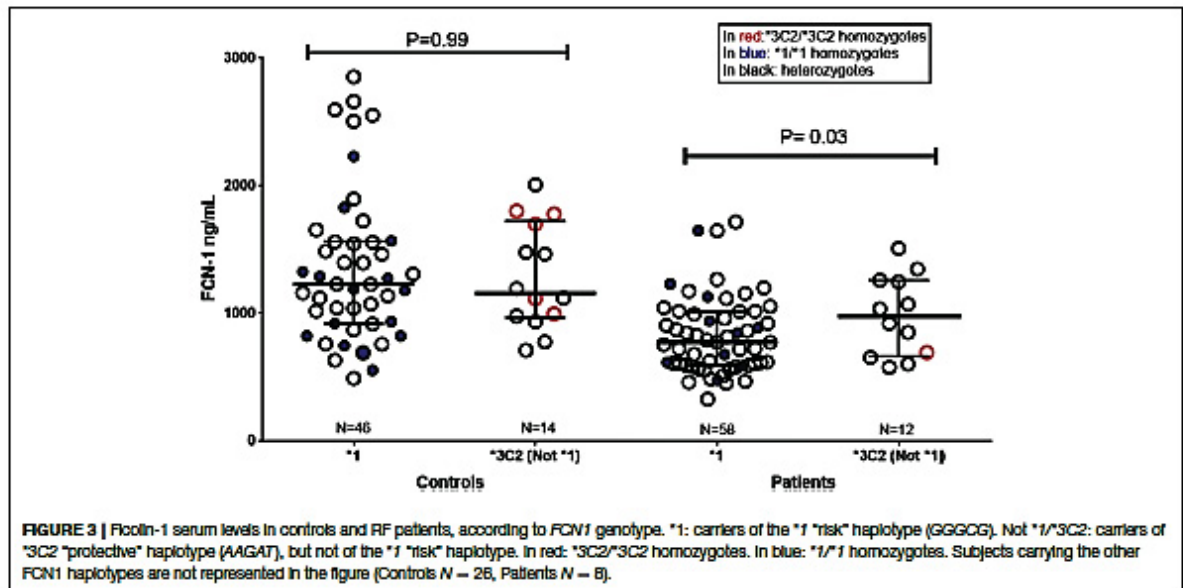


FIGURE 2 | Ficolin-1 serum levels in controls and RF patients. RHD, Rheumatic Heart Disease; RFo, Rheumatic Fever only (not present RHD).



(27), as well as ficolin-1 deficiency in a mouse model of collagen Ab-induced arthritis (41).

Lower ficolin-1 levels were found in RF patients, an effect that might purely indicate considerable ficolin-1 consumption in RF. In contrast to our study, ficolin-1 serum levels were higher in patients with vasculitis syndrome or rheumatoid arthritis, than in those with myositis, whereas no difference was observed among patients with systemic lupus erythematosus and Behcet's disease (42). Ficolin-1 levels further correlated with several inflammatory markers, including C-reactive protein (CRP), serum amyloid protein (SAP) and complement factor C3 (42) and strongly associated with the severity of ischemic stroke, in another group (43). Interestingly, part of the benefit of intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy relies on ficolin-1 pull-down (reported for Kawasaki disease, the most common form of acquired heart disease in childhood) (44). IVIG therapy has also been proven beneficial for Sydenham's Chorea associated with rheumatic fever (45). Moreover, anti-ficolin-1 mAb ameliorated symptoms of collagen antibody-induced arthritis (CAIA) in animal model (42). Additionally, acute injury leads to higher *FCNI* gene expression, due to specific regulatory proteins such as hypoxia factor HIF-1 $\alpha$  (46). This collection of evidence is in line with our results associating high-*FCNI* producing promoter variants with heart damage, in later stages of the disease.

This study has some limitations, especially regarding sample size of individuals with measured ficolin-1 levels which probably affected some of the results. Increased ficolin-1 levels were observed in patients carrying the \*3C2 haplotype, however this effect was not evident among controls possibly due to low sample size. In addition we cannot dismiss the possibility that there may be other causal variants responsible for modulating *FCNI* expression, not investigated in this study, such as rs12377780 (in intron 1), rs7857015 (5' upstream) and rs7858307 (3' UTR) (<http://raggr.usc.edu/>). Well-designed case control studies including higher number of individuals and different *FCNI* gene polymorphisms are necessary to better define the

action of ficolin-1 in RF. Concluding, we suggest a role for ficolin-1 in fighting GAS infection, with a possible damaging effect when infection succeeds, due to excessive complement activation. Inhibiting the final steps of complement activation may be a therapeutic clue for preventing valvar damage in patients with RHD.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

FA, AB, LG, and IM-R designed the study and analyzed the data. SC performed all the assays, analyzed the data, and performed statistical tests. All of the authors contributed toward manuscript preparation and revision, and provided final approval of the version to be published.

## FUNDING

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Fundação Araucária and BNDES (The National Bank for Economic and Social Development).

## ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge all the patients for their participation in this study, and the staff of the Molecular Immunology Laboratory of HC/UFRP for their assistance. We are thankful to CAPES and CNPq for research grants to IM-R, and to BNDES (The National Bank for Economic and Social Development) for its research grants to LG.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03009/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Steer AC. Historical aspects of rheumatic fever. *J Pediatr Child Health* (2015) 51:21–27. doi: 10.1111/jpc.12808
- Guilherme L, Kalil J. Rheumatic heart disease: molecules involved in valve tissue inflammation leading to the autoimmune process and Anti-*S. pyogenes* vaccine. *Front Immunol* (2013) 4:352. doi: 10.3389/fimmu.2013.00352
- Bono-Neri F. Acute rheumatic fever: global persistence of a preventable disease. *J Pediatr Heal Care* (2017) 31:275–84. doi: 10.1016/j.pedhc.2016.09.001
- 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) 14:710–25. doi: 10.1016/j.autrev.2015.04.005
- Zühlke LJ, Beaton A, Engel ME, Hugo-Hamman CT, Karthikeyan G, Katzenellenbogen JM, et al. Group A streptococcus, acute rheumatic fever and rheumatic heart disease: epidemiology and clinical considerations. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* (2017) 19:15. doi: 10.1007/s11936-017-0513-y
- Roberts K, Colquhoun S, Steer A, Reményi B, Carapetis J. Screening for rheumatic heart disease: current approaches and controversies. *Nat Rev Cardiol* (2013) 10:49–58. doi: 10.1038/nrcardio.2012.157
- Tian C, Hromatka BS, Kiefer AK, Eriksson N, Noble SM, Tung JY, et al. Genome-wide association and HLA region fine-mapping studies identify susceptibility loci for multiple common infections. *Nat Commun* (2017) 8:599. doi: 10.1038/s41467-017-00257-5
- Matsushita M. Ficolins in complement activation. *Mol Immunol* (2013) 55:22–6. doi: 10.1016/j.molimm.2012.08.017
- Garred P, Honoré C, Ma YJ, Rørvig S, Cowland J, Borregaard N, et al. The genetics of ficolins. *J Innate Immun* (2009) 2:3–16. doi: 10.1159/000242419
- Ermer D, Weckel A, Agarwal V, Frick DM, Björck L, Blom AM. Binding of complement inhibitor C4b-binding protein to a highly virulent *Streptococcus pyogenes* M1 strain is mediated by protein H and enhances adhesion to and invasion of endothelial cells. *J Biol Chem* (2013) 288:32172–83. doi: 10.1074/jbc.M113.502955
- Ramaswamy R, Spina GS, Fae KC, Pereira AC, Nishihara R, Messias Reason JJ, et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. *Clin Vaccine Immunol* (2008) 15:932–6. doi: 10.1128/CVI.00324-07
- Beltrame MH, Catarino SJ, Goeldner I, Boldt ABW, de Messias-Reason JJ. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Front Pediatr* (2015) 2:148. doi: 10.3389/fped.2014.00148

13. Mukherjee S, Jagadeeshprasad MG, Banerjee T, Ghosh SK, Biswas M, Dutta S, et al. Proteomic analysis of human plasma in chronic rheumatic mitral stenosis reveals proteins involved in the complement and coagulation cascade. *Clin Proteomics* (2014) 11:1–18. doi: 10.1186/1559-0275-11-35
14. Wu X, Yue Q, Jia W, Zhang J, Ouyang H, Xin D, et al. A novel approach for characterizing variations in serum peptides in rheumatic heart disease. *Indian J Med Res* (2017) 145:365–72. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_1581\_14
15. Garred P, Borregaard N. The ficolins. *J Innate Immun* (2010) 2:1–2. doi: 10.1159/000254982
16. Boldt ABW, Boschmann SE, Catarino SJ, Andrade FA, de Messias-Reason IJ. MASP1 and MASP2. In Choi S, editor. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. New York, NY: Springer New York (2016). p.1–18.
17. Vignesh P, Rawat A, Sharma M, Singh S. Complement in autoimmune diseases. *Clin Chim Acta* (2017) 465:123–30. doi: 10.1016/j.cca.2016.12.017
18. Honoré C, Hummelshøj T, Hansen BE, Madsen HO, Eggleston P, Garred P. The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum* (2007) 56:598–607. doi: 10.1002/art.22564
19. Rørvig S, Honore C, Larsson L-I, Ohlsson S, Pedersen CC, Jacobsen LC, et al. Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP. *J Leukoc Biol* (2009) 86:1439–49. doi: 10.1189/jlb.1008606
20. Zhang J, Yang L, Ang Z, Yeong SL, Tran TTT, Anand GS, et al. Secreted M-Ficolin anchors onto monocyte transmembrane G protein-coupled receptor 43 and cross talks with plasma C-reactive protein to mediate immune signaling and regulate host defense. *J Immunol* (2010) 185:899–910. doi: 10.4049/jimmunol.1001225
21. Kjaer TR, Hansen AG, Sørensen UBS, Nielsen O, Thiel S, Jensenius JC. Investigations on the pattern recognition molecule M-ficolin: quantitative aspects of bacterial binding and leukocyte association. *J Leukoc Biol* (2011) 90:425–37. doi: 10.1189/jlb.0411201
22. Ren Y, Ding Q, Zhang X, Zhang X. Ficolins and infectious diseases. *Virol Sin* (2014) 29:25–32. doi: 10.1007/s12250-014-3421-2
23. Ammitzbøll CG, Kjaer TR, Steffensen R, Stengaard-Pedersen K, Nielsen HJ, Thiel S, et al. Non-synonymous polymorphisms in the FCN1 gene determine ligand-binding ability and serum levels of M-ficolin. *PLoS ONE* (2012) 7:e50585. doi: 10.1371/journal.pone.0050585
24. Kasperkiewicz K, Eppa Ł, Swierzko AS, Bartłomiejczyk MA, Zuber ZM, Siniewicz-Luzencyk K, et al. Lectin pathway factors in patients suffering from juvenile idiopathic arthritis. *Immunol Cell Biol* (2017) 95:666–75. doi: 10.1038/icb.2017.31
25. Addobbati C, de Azevedo Silva J, Tavares NAC, Monticeli O, Xavier RM, Brenol JCT, et al. Ficolin gene polymorphisms in Systemic Lupus Erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Hum Genet* (2016) 80:1–6. doi: 10.1111/ahg.12129
26. Boldt ABW, Sanchez MIN, Stahlke ERS, Steffensen R, Thiel S, Jensenius JC, et al. Susceptibility to leprosy is associated with M-ficolin polymorphisms. *J Clin Immunol* (2013) 33:210–9. doi: 10.1007/s10875-012-9770-4
27. Haerynck F, Van Steen K, Cattaert T, Loeys B, Van Daele S, Schelstraete P, et al. Polymorphisms in the lectin pathway genes as a possible cause of early chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis patients. *Hum Immunol* (2012) 73:1175–83. doi: 10.1016/j.humimm.2012.08.010
28. Vander Cruyssen B, Nuytinck L, Boullart L, Elewaut D, Waegeman W, Van thielen M, et al. Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (2007) 46:1792–5. doi: 10.1093/rheumatology/kem266
29. Munthe-Fog L, Hummelshøj T, Honoré C, Møller ME, Skjoldt MO, Palsgaard J, et al. Variation in FCN1 affects biosynthesis of ficolin-1 and is associated with outcome of systemic inflammation. *Genes Immun* (2012) 13:515–22. doi: 10.1038/gene.2012.27
30. Schafranski MD, Stier A, Nishihara R, Messias-Reason IJT. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. *Clin Exp Immunol* (2004) 138:521–5. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02645.x
31. Schafranski MD, Pereira Ferrari L, Scherner D, Torres R, Jensenius JC, de Messias-Reason IJ. High-producing MBL2 genotypes increase the risk of acute and chronic carditis in patients with history of rheumatic fever. *Mol Immunol* (2008) 45:3827–31. doi: 10.1016/j.molimm.2008.05.013
32. Messias Reason IJ, Schafranski MD, Jensenius JC, Steffensen R. The association between mannose-binding lectin gene polymorphism and rheumatic heart disease. *Hum Immunol* (2006) 67:991–8. doi: 10.1016/j.humimm.2006.08.296
33. Messias-Reason IJ, Schafranski MD, Krennsner PG, Kun JFJ. Ficolin 2 (FCN2) functional polymorphisms and the risk of rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Clin Exp Immunol* (2009) 157:395–9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03975.x
34. Catarino SJDS, Boldt ABW, Beltrame MH, Nishihara RM, Schafranski MD, de Messias-Reason IJ. Association of MASP2 polymorphisms and protein levels with rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Hum Immunol* (2014) 75:1197–202. doi: 10.1016/j.humimm.2014.10.003
35. Carithers LJ, Moore HM. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Biopreserv Biobank* (2015) 13:307–8. doi: 10.1089/bio.2015.29031.hmm
36. Degn SE, Jensenius JC, Thiel S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. *Am J Hum Genet* (2011) 88:689–705. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.011
37. Thiel S, Kolev M, Degn S, Steffensen R, Hansen AG, Raseva M, et al. Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. *J Immunol* (2009) 182:2939–47. doi: 10.4049/jimmunol.0802053
38. Ma YJ, Skjoldt M-O, Garred P. Collectin-11/MASP complex formation triggers activation of the lectin complement pathway—the fifth lectin pathway initiation complex. *J Innate Immun* (2013) 5:242–50. doi: 10.1159/000345356
39. Hamada S, Kawabata S, Nakagawa I. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* (2015) 91:539–59. doi: 10.2183/pjab.91.539
40. Swierzko AS, Bartłomiejczyk MA, Brzostek A, Lukaszewicz J, Michalski M, Dziadek J, et al. Mycobacterial antigen 85 complex (Ag85) as a target for ficolins and mannose-binding lectin. *Int J Med Microbiol* (2016) 306:212–21. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.04.004
41. Banda NK, Acharya S, Scheinman RI, Mehta G, Takahashi M, Endo Y, et al. Deconstructing the lectin pathway in the pathogenesis of experimental inflammatory arthritis: essential role of the lectin ficolin B and mannose-binding protein-associated serine protease 2. *J Immunol* (2017) 199:1835–45. doi: 10.4049/jimmunol.1700119
42. Katayama M, Ota K, Nagi-Miura N, Ohno N, Yabuta N, Nojima H, et al. Ficolin-1 is a promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Int Immunol* (2018) 1–10. doi: 10.1093/intimm/dxy056
43. Kouchaki E, Babamohammadi A, Nikouejad H, Sehat M. Association of serum levels of Pentraxin-3, M-ficolin, and surfactant protein A with the severity of ischemic stroke complement activators in ischemic stroke. *Iran J Allergy Asthma Immunol* (2017) 16:140–6.
44. Okuzaki D, Ota K, Takatsuki SI, Akiyoshi Y, Naoi K, Yabuta N, et al. FCN1 (M-ficolin), which directly associates with immunoglobulin G1, is a molecular target of intravenous immunoglobulin therapy for Kawasaki disease. *Sci Rep* (2017) 7:6–11. doi: 10.1038/s41598-017-11108-0
45. Dean SL, Singer HS. Treatment of sydenham's chorea: a review of the current evidence. *Tremor Other Hyperkinet Mov* (2017) 7:456. doi: 10.7916/D8W95GJ2
46. Merchant S, Korbelik M. Upregulation of genes for C-reactive protein and related pentraxin/complement proteins in photodynamic therapy-treated human tumor cells: enrolment of PI3K/Akt and AP-1. *Immunobiology* (2013) 218:869–74. doi: 10.1016/j.imbio.2012.10.010

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Catarino, Andrade, Boldt, Guilherme and Messias-Reason. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 4.2 ARTIGO 2

Título: Ficolin-3 in Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease

Submetido no periódico: Immunology Letters em janeiro/2020

Fator de Impacto: 3,276

Escore de citação: 5,1

Qualis: A4

### **Ficolin-3 in Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease**

Sandra Jeremias Catarino<sup>1</sup>; Fabiana Antunes Andrade<sup>1</sup>; Lorena Bavia<sup>1</sup>; Luiza Guilherme<sup>2</sup>; Iara Jose Messias-Reason<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Molecular Immunopathology Laboratory, Department of Medical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

<sup>2</sup> Heart Institute (InCor), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

\* Corresponding author: Prof. Dr. Iara Jose Messias Reason, Departamento de Patologia Médica, Serviço de Anatomia Patológica, Hospital de Clínicas. R. General Carneiro, 181, CEP 80060-900, Curitiba, PR, Brazil. email: iarareason@hc.ufpr.br. Tel. 55 41 33601800 (6523)

**Abbreviations:** RF: Rheumatic Fever, RHD: Rheumatic Heart Disease, RFo: Rheumatic Fever only, *FCN3*: ficolin-3 gene, LP: Lectin Pathway, CRP: C-Reactive Protein, MAC: Membrane Attack Complex, GAS: Group A *Streptococcus*, LD: Linkage Disequilibrium, GlcNAc: N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine, MBL: Mannose-binding lectin.

**Funding:** This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and Fundação Araucária.



## Highlights

- Ficolin-3 is involved in the pathophysiology of RF/RHD
- Ficolin-3 is highly consumed in RF/RHD
- Low ficolin-3 levels can be associated with RF progression

## ABSTRACT

Rheumatic fever (RF) and chronic rheumatic heart disease (RHD) are complications of oropharyngeal infection caused by *Streptococcus pyogenes*. Despite the importance of Complement against infections and autoimmunity, studies on the role of the lectin pathway in RF and RHD are scarce. Thus, our aim was to evaluate the association of Ficolin-3 serum levels, *FCN3* polymorphisms and haplotypes with the susceptibility to RF and RHD. We investigated 179 patients with a history of RF (126 RHD and 53 RF only) and 170 healthy blood donors as control group. Ficolin-3 serum concentrations were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Three *FCN3* single nucleotide polymorphisms (SNPs rs532781899, rs28362807 and rs4494157) were genotyped through PCR-SSP (sequence-specific amplification) method. Lower ficolin-3 serum levels were observed in RF patients when compared to controls (12.81 $\mu$ g/mL vs. 18.14 $\mu$ g/mL respectively,  $p < 0.0001$ , OR 1.22 [1.12-1.34]), and in RHD in comparison to RF only (RFo) (12.72  $\mu$ g/mL vs. 14.29  $\mu$ g/mL respectively,  $p = 0.016$ , OR 1.38 [1.06-1.80]). Low Ficolin-3 levels ( $< 10.7 \mu$ g/mL) were more common in patients (39.5%, 30/76) than controls (20.6%, 13/63,  $p = 0.018$ , OR=2.51 [1.14-5.31]), and in RHD (44.4%, 28/63) than RFo (15.4%, 2/13,  $p = 0.007$ , OR=3.08 [1.43-6.79]). On the other hand, *FCN3* polymorphism/haplotype were not associated with ficolin-3 serum levels or the disease. Low ficolin-3 levels might be associated with RF, being a potential marker of disease progression.

**Keywords:** *FCN3*, Ficolin-3, polymorphism, haplotype, Rheumatic Fever, Rheumatic heart disease.

## 1 INTRODUCTION

Acute rheumatic fever (RF) is an inflammatory disease that results from inadequate treatment of *Streptococcus pyogenes* oropharyngeal infection. The disease usually manifests from 2 to 3 weeks after infection (BURKE; CHANG, 2014), and the main clinical manifestations of RF include arthritis and cardiac involvement. The least frequent manifestations comprise Sydenham's chorea, erythema marginatum e subcutaneous nodules (BARASH, 2013; BARBOSA et al., 2009). Long-term untreated RF patients might progress to rheumatic heart disease (RHD), which can lead to heart failure and premature death (CARAPETIS et al., 2018; SHARMA; TOOR, 2019). The cardiac involvement during RF can result in chronic rheumatic heart disease (RHD), which can lead to heart failure and premature death (CARAPETIS et al., 2018). The annual worldwide incidence of acute RF is 5-51 per 100,000 population (TIBAZARWA; JA; MAYOSI, 2008) affecting in most cases children and adolescents from low-income and developing countries (GUILHERME; KALIL, 2013; STEER, 2015).

An important antigenic virulence factor produced by *Streptococcus pyogenes* [also referred to as group A Streptococcus (GAS)] is the M protein, which is anchored in the cell membrane and extends to the bacterial surface forming a coat (METZGAR; ZAMPOLLI, 2011). M protein shares structural homology with human proteins primarily cardiac myosin and vimentin, as well as other proteins as tropomyosin, keratin and laminin (reviewed by (GUILHERME et al., 2011)). Due to mimicry between M protein epitopes and cardiac components, it has been proposed that this protein is the main trigger for autoimmunity in individuals with genetic predisposition to RF (GUILHERME; KALIL, 2002). Another highly conserved GAS antigen is composed by N-acetyl-beta-D-glucosamine (GlcNAc) (CUNNINGHAM, 2000; KRAUSE; MCCARTY, 1961), which also displays cross reactivity with laminin present in the heart valves (CUNNINGHAM, 2000, 2012; GOLDSTEIN; HALPERN; ROBERT, 1967) and cardiac myosin (MALKIEL et al., 2000). GlcNAc was shown to be recognized by the soluble complement pattern recognition receptors, ficolins (MATSUSHITA, 2013).

The complement system has a crucial role in the innate immune system, with three main activities: defense against infection, clearance of immune complexes and cell debris, and link between innate and adaptative immunity. It consists of about 60 soluble plasma and cell surface proteins and can be activated on the surface of pathogens, and damaged cells

by the classical, alternative and lectin pathways (ELVINGTON; LISZEWSKI; ATKINSON, 2016; RICKLIN et al., 2010). The lectin pathway is initiated when pattern recognition molecules [mannose binding lectin (MBL), collectin-11 (CL-11) and ficolins 1-3] bind to carbohydrates and acetylated compounds (GARRED et al., 2016; KJAER et al., 2015). Ficolin-3 is the most abundant protein of the lectin pathway with plasma concentration around 18.4  $\mu\text{g/mL}$  (KRARUP et al., 2005), and it is mainly expressed in liver and lung (AKAIWA et al., 1999; HUMMELSHOJ et al., 2008a). Ficolin-3 recognizes a wide variety of microorganisms, including *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, *Aerococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Influenza A virus*, *Hepatitis C virus*, *Tripanosoma cruzi*, *Giardia intestinalis* (*G. lamblia*, *G. duodenalis*) (as reviewed by (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015)), but not *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* (KRARUP et al., 2005). There are no reports on the binding of ficolin-3 in *S. pyogenes*. However, ficolin-3 was shown to bind to GlcNAc (SUGIMOTO et al., 1998), the main carbohydrate antigen of the GAS cell wall (HURST et al., 2018).

Associations between initiators proteins of the lectin pathway and RF and RHD have been described. MBL deficiency was shown to contribute to the development and progression of RHD in young people (JIN; JI; HU, 2001) and MBL serum levels were low in RHD patients in a Yemeni study (SCALZI et al., 2010). On the other hand, high MBL levels associated to *MBL2* genotypes were observed in Brazilian RHD patients (MESSIAS REASON et al., 2006) and reported to confer risk to acute and chronic carditis in RF patients (SCHAFRANSKI et al., 2008). Furthermore, polymorphisms in the promoter region of the *FCN2* gene were associated with susceptibility to RHD in RF Brazilian patients (MESSIAS-REASON et al., 2009). More recently, *FCN1* polymorphisms/haplotypes were associated to the susceptibility to RF/RHD, with low ficolin-1 serum levels being found in RF patients (CATARINO et al., 2018).

Despite the importance of the complement against infection and autoimmunity, studies on the role of the lectin pathway in acute RF and chronic RHD, as well as their relationship with GAS infection remain scarce. The present study attempts to evaluate the association of Ficolin-3 serum levels and *FCN3* polymorphisms with the susceptibility to RF and RHD. To our knowledge, this is the first investigation on ficolin-3 and RF.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Subjects and samples

All patients and control subjects provided written informed consent in accordance with the *Declaration of Helsinki*. This study was approved by the local medical ethics committee (approval number: 2658.265). We investigated a total of 179 patients from the Children's Unit of the Hospital Pequeno Príncipe and at the Cardiology Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas of the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil, with a history of RF, all of them with ASO (anti streptolysin O) titers higher than 250 units, characterizing a precedent streptococcal infection and diagnosed according to Jones' modified criteria (BEATON; CARAPETIS, 2015); 49 (27.4%) males and 130 (72.6%) females; with a mean age of 37 years (range = 7-76 years) (Table 1). Among them, 126 had RHD, confirmed by the transthoracic echocardiogram showing rheumatic involvement of the mitral or aortic valves, and 53 did not present RHD, but had RF history and were designated as "rheumatic fever only" (RFo) patients. None of the patients presented other inflammatory disease, neoplasia, infective endocarditis or other infections at the time their blood was collected. The control group included 170 blood donors from The Clinical Hospital of the University Federal of Paraná, with a mean age of 37 years (range = 18-61 years), 66 (38.8%) males and 104 (61.2%) females.

### 2.2 Ficolin-3 measurement

Ficolin-3 serum concentrations were measured in 76 patients and 63 controls using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) SEB903Hu Cloud-Clone Corp. (Texas, USA). Relative low ficolin-3 concentration was defined as  $<10.7 \mu\text{g/mL}$ , which corresponded to the 25th percentile among controls.

### 2.3 FCN3 genotyping

DNA extraction from peripheral blood was performed using The QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN (Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. The genotype method was performed by PCR-SSP (sequence-specific amplification) method as previously described (ANDRADE et al., 2017a). Three *FCN3* single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped: rs532781899 SNP (*g.1637delC*) in exon 5, rs28362807 (*g.3524\_3532insTATTTG GCC*) in intron 5 and rs4494157 (*g.4473C>A*) in

intron 7.

## 2.4 Statistics

Allele, genotype and haplotype frequencies were obtained by direct counting. Exact tests of Guo and Thompson for testing the hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium were accomplished using ARLEQUIN v.3.5.2.2 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>). Test of independence were performed by the Exact Fisher test using the SISA quantitative skill tables. The results were corrected by multivariate binary logistic regression with the software package STATA v. 9.2. Ficolin-3 levels were compared between groups by nonparametric Mann-Whitney/Kruskal-Wallis test using GraphPad Prism v.7.03. Correction for associated demographic factors (sex, age and ethnic group) and clinical factors were applied in the reduced logistic regression model where sample size was adequate. p-Values < 0.05 were considered significant.

**TABLE 1** – Clinical and demographic data of RF and RHD patients

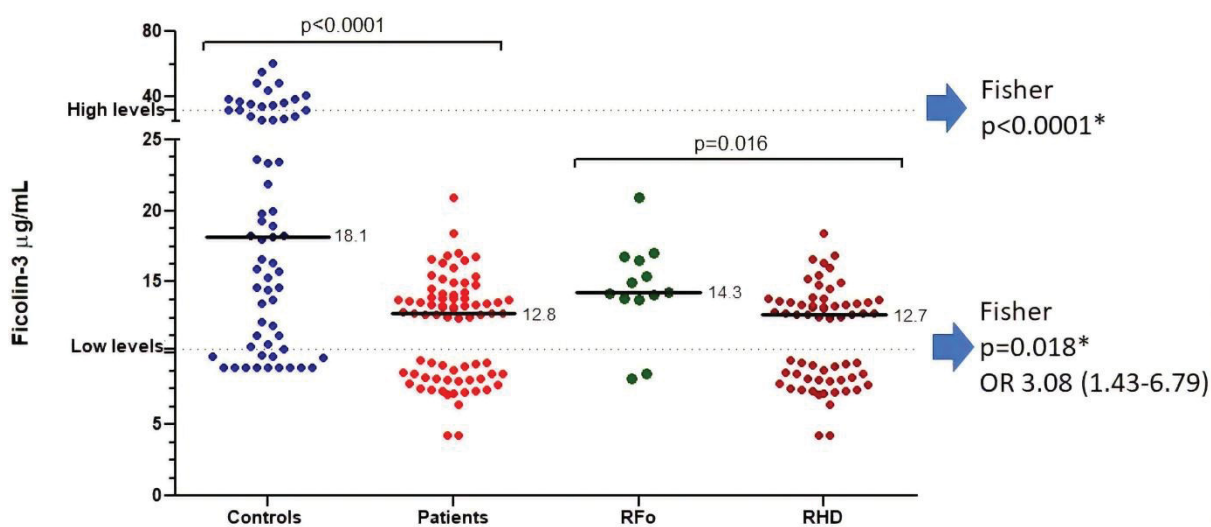
Total RF and RHD Patients	179
Males	49 (27.4%)
Females	130 (72.6%)
Mean age	37 years
Rheumatic heart disease (RHD)	126 (70.4%)
Mitral stenosis	70 (55.5%)
Aortic stenosis	20 (15.9%)
Tricuspid stenosis	3 (2.4%)
Mitral insufficiency	59 (46.8%)
Aortic insufficiency	27 (21.4%)
Tricuspid insufficiency	25 (19.8%)
Rheumatic Fever only (RFo)	53 (29.6%)
Carditis	35 (66%)
Arthritis	21 (39.6%)
Subcutaneous nodules	4 (7.5%)
Chorea	4 (7.5%)
Erythema marginatum	1 (1.9%)

### 3 RESULTS

#### 3.1 Ficolin-3 levels

Ficolin-3 serum levels were lower in patients (median: 12.81  $\mu\text{g/mL}$ ), compared to controls (18.14  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0.0001$ , OR 1.22 [1.12-1.34]), and in RHD (12.72  $\mu\text{g/mL}$ ) compared with RFo patients (14.29  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p = 0.016$ , OR 1.38 [1.06-1.80]), after correction for age, sex and ethnic group (Figure 1).

Furthermore, low Ficolin-3 levels ( $< 10.7 \mu\text{g/mL}$ ) were more common in patients (39.5%, 30/76) than controls (20.6%, 13/63,  $p = 0.018$ , OR=2.51 [1.14-5.31]), and in RHD (44.4%, 28/63) than RFo patients (15.4%, 2/13,  $p = 0.007$ , OR=3.08 [1.43-6.79]). On the other hand, high ficolin-3 levels ( $> 31.3 \mu\text{g/mL}$ ) were found only in controls (25.4%, 16/63,  $p < 0.0001$ ) (Figure 1).



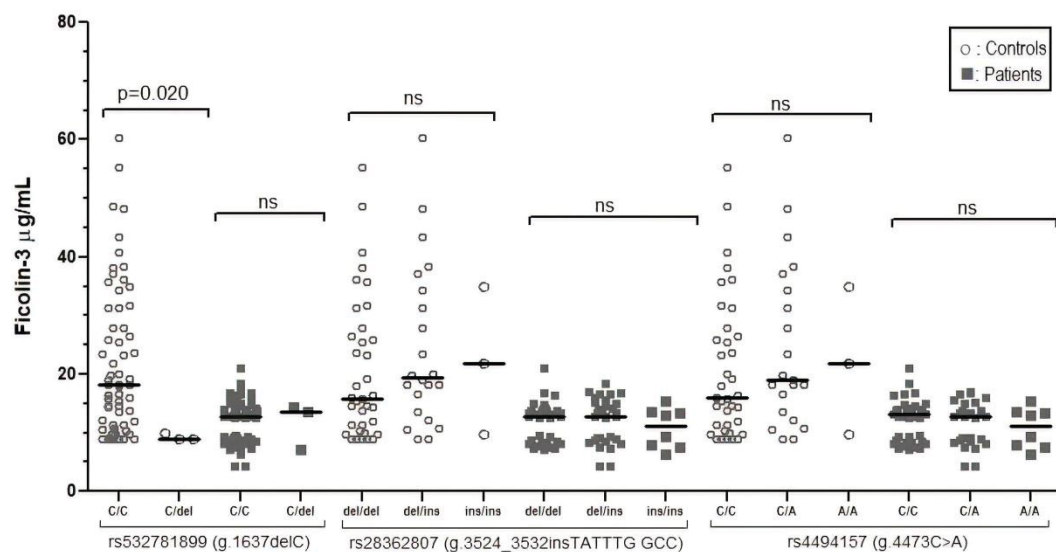
**Figure 1. Distribution of Ficolin-3 levels in the investigated groups.** Serum ficolin-3 levels were evaluated by ELISA and the data are presented as median. The frequency of low and high ficolin-3 producers among patients and controls (\*) was evaluated by Exact Fisher test. A low ficolin-3 level was defined as  $< 10.7 \mu\text{g/mL}$ , which corresponded to the 25th percentile, and high levels  $> 31.3 \mu\text{g/mL}$ , corresponding to the 75th percentile among controls. Odds ratio (OR) with 95% of confidence interval. The median of serum ficolin-3 levels were compared between controls and patients, and RF only (RFo) and RHD patients by Mann-Whitney test considering  $p < 0.05$  as significant.

### 3.2 *FCN3* polymorphisms and haplotypes

Genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium. The allelic frequencies in patients and controls did not differ from those reported in the Ensembl genome browser for CEU (North Americans of Northern and Western European ancestry from Utah). High linkage disequilibrium (LD) was observed between the two non-coding SNPs rs28362807 (intron 5) and rs4494157 (intron 7), as indicated by the correlation coefficient values ( $r^2$ ) (Supplementary Figure S1). There was no difference in the allelic, genotypic and haplotypic frequencies between controls and RF patients, as well as RHD and RFo groups (Supplementary Table S1).

### 3.3 *FCN3* polymorphisms and Ficolin-3 levels

The *g.1637del/1637C* heterozygote controls had lower ficolin-3 median concentration (9.0  $\mu\text{g/mL}$ ) than *g.1637C/1637C* homozygote controls (18.23  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.020$ ). The same was not observed in RF patients ( $p=0.958$ ). In order to determine the effect of the SNPs rs28362807 (intron 5) and rs4494157 (intron 7) in ficolin-3 levels, all *g.1637del/1637C* individuals were excluded from the analyses. No association between these SNPs with ficolin-3 levels in controls and patients or in RHD and FRo patients was observed (Figure 2 and Supplementary Fig. S2/S3).



**Figure 2. Distribution of Ficolin-3 serum levels regarding *FCN3* alleles.** Serum ficolin-3 levels were evaluated by ELISA and the data are presented as median. Ficolin-3 levels from controls and patients were categorized according to the polymorphisms evaluated rs532781899, rs28362807 and rs4494157. The median of serum ficolin-3 levels was compared between alleles by Mann-Whitney or Kruskal Wallis test considering  $p < 0.05$  as significant.

#### 4 DISCUSSION

We presented here novel findings that indicate a role for ficolin-3 of complement in the pathophysiology of RF and RHD. Levels significantly low of ficolin-3 were both associated to RF and RHD. Although the *FCN3* polymorphisms were not associated with ficolin-3 serum levels or the disease, *g.1637del/1637C* genotype was related to low levels of the protein in controls. To the best of our knowledge, this is the first study addressing ficolin-3 serum levels and *FCN3* gene polymorphisms in the development of RF and RHD.

Markedly lower ficolin-3 levels in RF patients and in RHD possibly indicate protein consumption due to complement activation upon GAS infection and chronic inflammation. We hypothesize that in the early RF stage ficolin-3, the main activator of the lectin pathway, binds to *S. pyogenes* capsule by GlcNAc molecules (ZACHO et al., 2012). This interaction may lead to complement activation by the lectin pathway, consequently decreasing ficolin-3 levels in serum. With the progression of the infection, ficolin-3 may possibly bind to self-altered and dying cardiac cells originated during tissue damage mediated by autoantibodies from molecular mimicry between GAS and heart tissue proteins (HONORÉ et al., 2007), resulting in an even lower ficolin-3 concentration in RHD patients. Thus, decreasing ficolin-3 levels seems to be related with disease progression in RF patients. Although ficolin-3 levels showed significant results between RFo and RHD, the hypothesis raised here should be interpreted carefully given the low sample size in the former group. A larger RFo population is required in order to confirm the role of lower ficolin-3 in RHD patients. The direct binding of ficolin-3 with GAS has not yet described, it is know that GlcNAc is a ligand for ficolins (SUGIMOTO et al.,



1998), and could therefore be a potential target for ficolin-3. Nevertheless, GAS evasion mechanisms have been described including the expression of surface-bound virulence factors or secretion of complement evasion factors which allow the escape of immune recognition and prevent phagocytosis (LAABEI; ERMERT, 2018).

Previous studies found that low ficolin-3 levels were associated with increased complement activation and with aggravation and progression of chronic heart failure (PROHÁSZKA et al., 2013). Decreased ficolin-3 levels were also observed in sarcoidosis (SVENDSEN et al., 2008), chemotherapy-related infections in children (SCHLAPBACH et al., 2009b) and Crohn's disease (SCHAFFER et al., 2013). In contrast, higher ficolin-3 levels were observed in different conditions. In HIV and HIV/HCV patients, the authors suggested a compensatory mechanism of upregulation of ficolin-3 (TIZZOT et al., 2018); and in leprosy patients, this was possibly related to *FCN3* haplotypes (ANDRADE et al., 2017a). Higher ficolin-3 serum levels were also observed in systemic lupus erythematosus (ANDERSEN et al., 2009), ovarian cancer patients (SZALA et al., 2013), children with acute leukemia (SCHLAPBACH et al., 2009a), and associated with shorter graft survival after kidney transplantation (SMEDBRÅTEN et al., 2015).

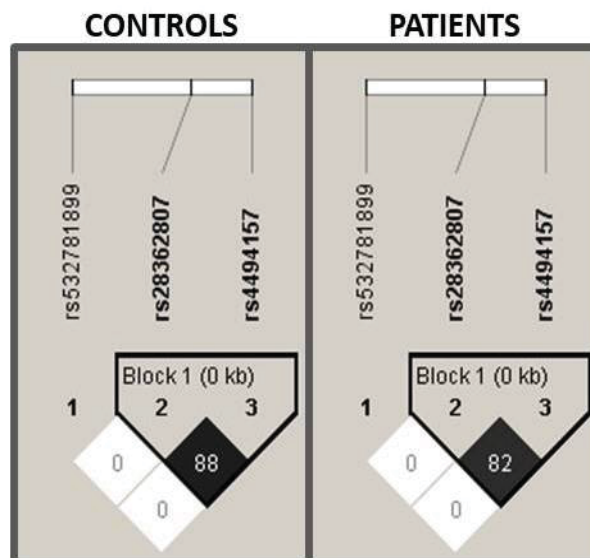
Lower ficolin-3 observed in RF and RHD patients was not related to the *FCN3* gene polymorphisms investigated here (rs532781899, rs28362807 and rs4494157). The effect of the frameshift polymorphism g.1637delC (rs532781899) known to cause ficolin-3 deficiency (MUNTHER-FOG et al., 2009) was observed only in controls but not in RF or RHD, probably due to low sample size. Similarly, *FCN3* polymorphisms evaluated here seem not to be related with the development of RF or RHD, since allelic, genotypic and haplotypic frequencies were equally distributed among the groups. However, *FCN3* polymorphisms have already been associated with recurrent infections (MICHALSKI et al., 2011; MUNTHER-FOG et al., 2008) and high ficolin-3 concentration in leprosy patients (ANDRADE et al., 2017a).

Importantly, our results corroborate previous studies showing the impact of lectin pathway proteins in the pathophysiology of RF and RHD. Ficolin-1, 2 and MASP-2 protein levels as well as *FCN1*, *FCN2* and *MASP2* gene polymorphisms seem to play an important role in the development of RF and establishment of RHD (CATARINO et al., 2014, 2018; MESSIAS-REASON et al., 2009).

Our study has some limitations such as the number of samples with measured ficolin-3 concentration, especially in the RFo group. Ficolin-3 serum levels were performed only in 40% of patients/controls samples, which may have affected the results. In addition, we had no access to patients follow up neither their clinical outcome. Moreover, we cannot dismiss the possibility that there may be some causal variants responsible for modulating *FCN3* expression, not investigated in this study. Whereas ficolin-3 levels showed significant results between RFo and RHD, the relevance of these findings should be confirmed in a larger sample of patients.

In conclusion, our results show that low ficolin-3 levels might be associated with RF, being a potential marker of disease progression. Since RF still has a major impact in developing countries, knowledge about its immunopathology may be key to the discovery of new strategies in fighting the disease.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

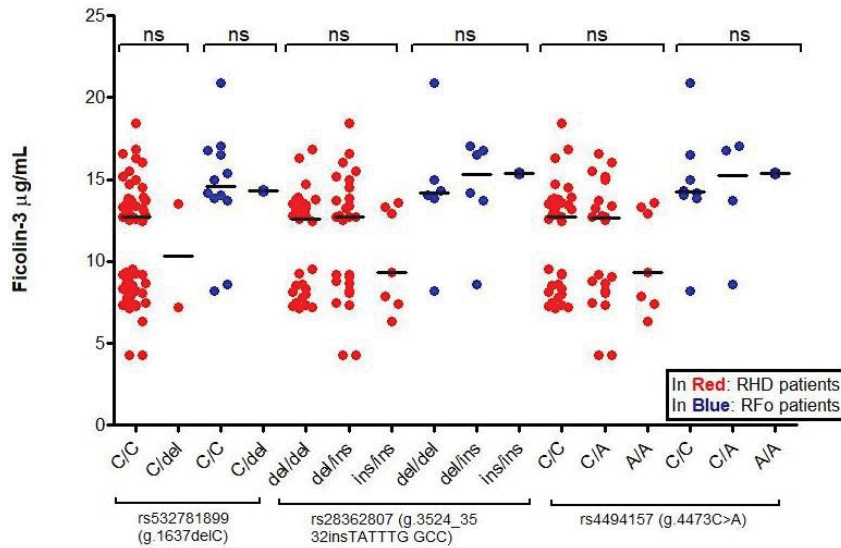


**Figure S1. Linkage disequilibrium between *FCN3* single nucleotide polymorphisms.** LD was calculated based on the data for controls and RF patients. Black squares represent high LD and white low LD as measured by the correlation coefficient ( $r^2$ ) between sites, which values are shown inside of the squares. SNP identifiers are indicated on the abscissas.

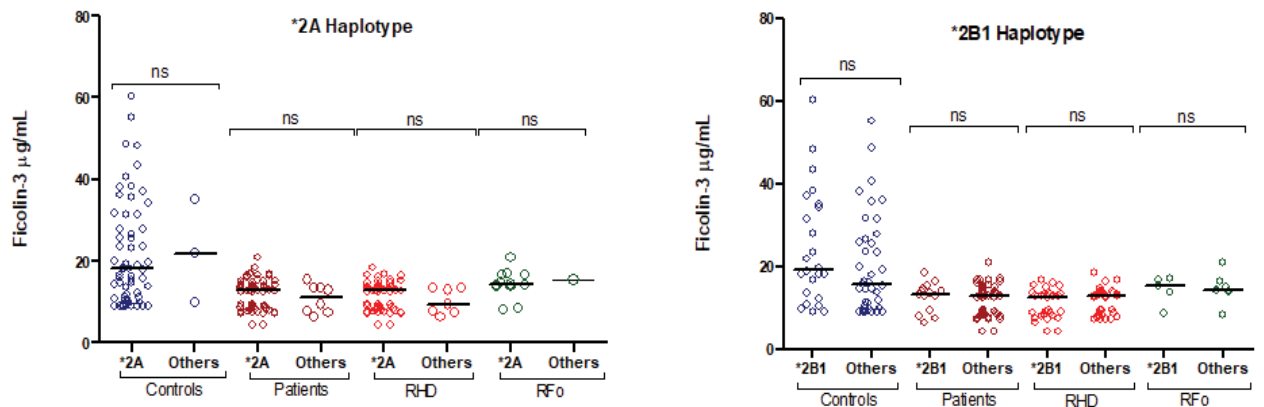
TABLE S1. *FCN3* genotype, allele and haplotype frequencies (%).

dbSNP		Controls	RF <i>per se</i>	RHD	RFo
<b>rs532781899</b>		N=170	N=179	N=126	N=53
Genotype	<i>g.1637C/1637C</i>	96.5	97.2	96.8	98.1
	<i>g.1637del/1637C</i>	3.5	2.8	3.2	1.9
		n=358	n=340	n=252	n=106
Allele	<i>g.1637C</i>	98.2	98.6	98.4	99.0
	<i>g.1637del</i>	1.8	1.4	1.6	1.0
<b>rs28362807</b>					
Genotype	<i>g.3524_3532del/3524_3532del</i>	54.7	50.8	51.6	49.0
	<i>g.3524_3532del/3524_3532ins</i>	35.3	43.6	42.8	45.3
	<i>g.3524_3532ins/3524_3532ins</i>	10.0	5.6	5.6	5.7
Allele	<i>g.3524_3532del</i>	59.7	53.6	54.4	51.9
	<i>g.3524_3532ins</i>	40.3	46.4	45.6	48.1
<b>rs4494157</b>					
Genotype	<i>g.4473C/4473C</i>	57.6	58.1	57.9	58.5
	<i>g.4473C/4473A</i>	34.2	36.3	36.5	35.8
	<i>g.4473A/4473A</i>	8.2	5.6	5.6	5.7
Allele	<i>g.4473C</i>	61.8	60.9	60.7	61.3
	<i>g.4473A</i>	38.2	39.1	39.3	38.7
<b>Phylogenetic nomenclature</b>	<b>Haplotype</b>	n=340	n=358	n=252	n=106
*2A	C del C	71.2	71.5	71.8	70.8
*2B1	C ins A	25.2	23.7	23.8	23.6
*1	C ins C	1.8	3.6	3.2	4.7
*2B2.2A	del del C	1.2	1.2	1.2	0.9
*2B2	del ins C	0.6	0	0	0

N: number of individuals. n: number of chromosomes. dbSNP: nomenclature according to the Single Nucleotide Polymorphism database; RHD: rheumatic heart disease; RFo: rheumatic fever without heart commitment. Different combinations of investigated polymorphisms resulted in 5 observed haplotypes, as previously described (Andrade et al., 2017).



**Figure S2. Distribution of Ficolin-3 serum levels regarding *FCN3* alleles in patients.** Serum ficolin-3 levels were evaluated by ELISA and the data are presented as median. Ficolin-3 levels from RHD and RFo patients were categorized according to the polymorphisms evaluated rs532781899, rs28362807 and rs4494157. The median of serum ficolin-3 levels was compared between alleles by Mann-Whitney or Kruskal Wallis test considering  $p < 0.05$  as significant.



**Figure S3. Distribution of Ficolin-3 levels in the patients.** Ficolin-3 levels in individuals with and without the *FCN3* \*2A haplotype and the *FCN3* \*2B1 haplotype. Comparisons were made using Mann-Whitney test. Bars indicate median values.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para melhor entendimento do papel das ficolinas-1 e -3 do sistema complemento na fisiopatologia da FR, doença negligenciada que ainda apresenta grande impacto social e econômico em países em desenvolvimento (WATKINS et al., 2017). As ficolinas são moléculas que atuam no reconhecimento de uma ampla gama de padrões moleculares associados a patógenos e auto antígenos alterados, levando a ativação do complemento pela via das lectinas, fagocitose, lise celular e efeitos inflamatórios (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015). Estudos anteriores mostraram a contribuição de componentes da via das lectinas na suscetibilidade e expressão clínica da FR; contudo o possível papel das ficolinas-1 e -3 na FR e CRC ainda não havia sido avaliado. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que ambas ficolina-1 e -3 atuam na fisiopatologia da FR possivelmente contribuindo no combate à infecção por GAS e no desenvolvimento da doença.

Foi observado um papel protetor contra FR e CRC para quatro das cinco variantes avaliadas (rs2989727: c.-1981A, rs10120023: c.-542A, rs10117466: c.-144A e rs10858293: c.33T) na região promotora do gene *FCN1*. Estes alelos ocorrem no haplótipo \*3C2 (AAGAT), o qual também foi associado com proteção contra a FR e com concentrações mais altas de ficolina-1 entre os pacientes. Esses alelos estão relacionados com alta expressão de *FCN1* no tecido subcutâneo adiposo e três deles apresentam o mesmo efeito em células do sangue periférico (GTEx portal) (CARITHERS; MOORE, 2015). Por outro lado, os alelos mais frequentes destes SNPs compõem o haplótipo filogeneticamente ancestral \*1 (GGGCG), o qual foi associado com maior suscetibilidade à FR. Por outro lado, os alelos c.-1981A e c.-144A foram associados ao desenvolvimento da estenose valvar e insuficiência mitral, respectivamente. Os resultados indicam um papel duplo da ficolina-1 na FR. Por um lado, tendo um papel protetor no combate à infecção por GAS e provável efeito prejudicial com a progressão da doença, possivelmente devido a participação no processo inflamatório e ativação excessiva do complemento.

Concentrações significativamente mais baixas de ficolina-1 e ficolina-3

foram observadas em pacientes, quando comparados aos controles, indicando possível consumo devido à ativação do complemento frente à infecção por GAS e processo inflamatório. Além disso, os níveis de ficolina-3 foram ainda menores em pacientes com CRC comparados com aqueles sem acometimento cardíaco, indicando que os níveis decrescentes de ficolina-3 parecem estar relacionados à progressão da doença.

Corroborando esses achados, as concentrações de ficolina-1 nos pacientes com haplótipo de “susceptibilidade” \*1 foram 21% menores comparadas as observadas no haplótipo “protetor” \*3C2. No presente trabalho os polimorfismos avaliados do gene *FCN3* não foram associados aos níveis séricos de ficolina-3 ou à doença, entretanto, o genótipo *g.1637del/1637C*, o qual apresenta o alelo de deleção (*g.1637del*) conhecido por causar deficiência de ficolina-3 (MUNTHER-FOG et al., 2009) foi relacionado a baixos níveis da proteína em controles.

Nosso estudo apresenta algumas limitações, como número amostral baixo na determinação das concentrações séricas das ficolinas, que inclui 40% dos pacientes e controles, além da falta de acompanhamento clínico dos pacientes. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de existirem outras variantes genéticas causais responsáveis pela modulação da expressão de *FCN1* e *FCN3*, não investigadas neste estudo. Para minimizar estes efeitos, os resultados obtidos foram corrigidos por regressão logística a fim de garantir maior confiabilidade.

Destacamos ainda, que os objetivos propostos neste projeto foram alcançados, com a finalização de dois artigos, um deles publicado em periódico Qualis A1. Os resultados obtidos apontam importantes associações que contribuem para melhor entendimento do papel das ficolinas-1 e -3 na FR e CRC. Todo conhecimento adquirido a respeito da fisiopatologia da FR auxilia a compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na doença. Estudos adicionais envolvendo um número amostral maior de pacientes, bem como acompanhamento clínico, além de outros componentes do sistema imune inato são desejáveis a fim de se buscar novas estratégias de prevenção, vacinas, diagnóstico precoce e tratamento, visando melhor controle da doença em um futuro próximo.

## 6 CONCLUSÕES

- a) As concentrações séricas de ficolina-1 e ficolina-3 foram significativamente mais baixas nos pacientes em relação aos controles
- b) Nos pacientes com CRC as concentrações de ficolina-3 foram mais baixas quando comparados aos pacientes FRo
- c) Concentrações de ficolina-3 inferiores a 10,7 µg/mL foram mais frequentes em pacientes quando comparado aos controles, e nos pacientes CRC quando comparados aos pacientes FRo.
- d) Os alelos *c.-1981A*, *c.-542A*, *c.-144* e *c.33T* de *FCN1* foram significativamente associados à proteção tanto de FR como CRC
- e) O haplótipo \*3C2 (AAGAT) de *FCN1* foi associado à proteção contra FR e CRC corroborando a associação dos alelos observada
- f) O haplótipo \*1 (GGGCG) de *FCN1* foi associado à maior suscetibilidade a FR e CRC
- g) Concentrações séricas de ficolina-1 nos pacientes com haplótipo \*1 foram menores quando comparados aqueles com haplótipo \*3C2
- h) Os alelos *c.-1981* e *c.-144A* de *FCN1* foram associados ao desenvolvimento da estenose valvar e insuficiência mitral, respectivamente
- i) Não foi encontrado associação entre genótipos, alelos ou haplótipos de *FCN3* com FR ou CRC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 8<sup>o</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2015.
- ADDERSON, E. E. et al. Molecular Analysis of Polyreactive Monoclonal Antibodies from Rheumatic Carditis: Human Anti-N-Acetylglucosamine/Anti-Myosin Antibody V Region Genes. **journal of immunology**, v. 161, n. 4, p. 2020–2031, 15 ago. 1998.
- AGRAHARI, G. et al. Streptococcus pyogenes employs strain-dependent mechanisms of C3B inactivation to inhibit phagocytosis and killing of bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 17, p. 9181–9189, 2016.
- AKAIWA, M. et al. Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 47, n. 6, p. 777–86, jun. 1999.
- ALI, Y. M. et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 7, p. e1002793, jan. 2012.
- ALILAMEDICALCENTER. **ALILA MEDICAL MEDIA**. Disponível em: <<https://www.alilamedicalmedia.com/media/2bd33090-09ac-11e3-8b96-616f204b3a36-streptococcus-pyogenes-bacterium>>. Acesso em: 23 jan. 2020.
- AMEYE, L. et al. M-ficolin levels are associated with the occurrence of severe infections in patients with haematological cancer undergoing chemotherapy. **Clinical and experimental immunology**, v. 167, n. 2, p. 303–8, fev. 2012.
- AMMITZBOLL, C. G. et al. Levels of lectin pathway proteins in plasma and synovial fluid of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Rheumatology International**, v. 32, n. 5, p. 1457–1463, 2012a.
- AMMITZBOLL, C. G. et al. Non-Synonymous Polymorphisms in the FCN1 Gene Determine Ligand-Binding Ability and Serum Levels of M-Ficolin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50585, jan. 2012b.
- AMMITZBOLL, C. G. et al. Brief report: M-ficolin levels reflect disease activity and predict remission in early rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 12, 2013.
- ANDERSEN, T. et al. Serum levels of ficolin-3 (Hakata antigen) in patients with systemic lupus erythematosus. **The Journal of rheumatology**, v. 36, n. 4, p. 757–9, abr. 2009.
- ANDRADE, F. A. et al. Association of a new FCN3 haplotype with high ficolin-3 levels in leprosy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, 2017a.
- ANDRADE, F. A. et al. Serine Proteases in the Lectin Pathway of the Complement System. In: CHAKRABORTI, S.; DHALLA, N. S. (Eds.). **Proteases in Physiology and Pathology**. Singapore: Springer Singapore, 2017b. p. 397–420.
- AZEVEDO, P. M.; PEREIRA, R. R.; GUILHERME, L. Understanding rheumatic fever. **Rheumatology international**, v. 32, n. 5, p. 1113–20, maio 2011.



- BAIRD, R. W. et al. Epitopes of group A streptococcal M protein shared with antigens of articular cartilage and synovium. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 146, n. 9, p. 3132–7, 1 maio 1991.
- BARASH, J. Rheumatic Fever and post-group A streptococcal arthritis in children. **Current infectious disease reports**, v. 15, n. 3, p. 263–8, jun. 2013.
- BARBOSA, P. et al. Diretrizes Brasileiras para o Diagnóstico , Tratamento e Prevenção da Febre Reumática. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 93, n. 3 supl.4, p. 1–18, 2009.
- BEATON, A.; CARAPETIS, J. The 2015 revision of the Jones criteria for the diagnosis of acute rheumatic fever: Implications for practice in low-income and middle-income countries. **Heart Asia**, v. 7, n. 2, 2015.
- BELTRAME, M. H. et al. The Lectin Pathway of Complement and Rheumatic Heart Disease. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, n. January, p. 1–14, 2015a.
- BELTRAME, M. H. et al. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. **Molecular immunology**, v. 67, n. 1, p. 85–100, set. 2015b.
- BIDULA, S.; SEXTON, D. W.; SCHELENZ, S. Ficolins and the recognition of pathogenic microorganisms: An overview of the innate immune response and contribution of single nucleotide polymorphisms. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.
- BLOM, A. M.; VILLOUTREIX, B. O.; DAHLBÄCK, B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? **Molecular immunology**, v. 40, n. 18, p. 1333–46, abr. 2004.
- BOLDT, A. B. W. et al. Susceptibility to leprosy is associated with M-ficolin polymorphisms. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. 1, p. 210–219, 2013.
- BOLDT, A. B. W.; PETZL-ERLER, M. L. A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping. **Human mutation**, v. 19, n. 3, p. 296–306, mar. 2002.
- BURKE, R. J.; CHANG, C. Diagnostic criteria of acute rheumatic fever. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4–5, p. 503–507, 2014.
- CARAPETIS, J. R. et al. The global burden of group A streptococcal diseases. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, n. 11, p. 685–94, nov. 2005.
- CARAPETIS, J. R. et al. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, 2018.
- CARITHERS, L. J.; MOORE, H. M. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project. **Biopreservation and Biobanking**, v. 13, n. 5, p. 307–308, out. 2015.
- CARROLL, M. V; SIM, R. B. Complement in health and disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 12, p. 965–75, 2011.
- CATARINO, S. J. et al. Association of MASP2 polymorphisms and protein levels with rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Human Immunology**, v. 75, n. 12, p. 1197–1202, 2014.
- CATARINO, S. J. et al. Sickening or Healing the Heart? The Association of Ficolin-1 and Rheumatic Fever. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. December, p. 3009, 2018.
- CEDZYŃSKI, M. et al. Editorial: The role of complement in health and disease.

**Frontiers in Immunology**, v. 10, n. AUG, 2019.

CHANG, C. Cutting Edge Issues in Rheumatic Fever. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 42, n. 2, p. 1–25, 2011.

CHEN, M.; DAHA, M. R.; KALLENBERG, C. G. M. The complement system in systemic autoimmune disease. **Journal of autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. J276–86, maio 2010.

CUNNINGHAM, M. W. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 3, p. 470–511, 2000.

CUNNINGHAM, M. W. Streptococcus and rheumatic fever. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 24, n. 4, p. 408–416, 2012.

CUNNINGHAM, M. W. Rheumatic fever, autoimmunity, and molecular mimicry: The streptococcal connection. **International Reviews of Immunology**, v. 33, n. 4, 2014a.

CUNNINGHAM, M. W. Rheumatic fever revisited. **Nature reviews Cardiology**, v. 11, n. 2, p. 123, fev. 2014b.

DEGN, S. E.; JENSENIUS, J. C.; BJERRE, M. The lectin pathway and its implications in coagulation, infections and auto-immunity. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 16, n. 1, p. 21–7, 2011.

DEGN, S. E.; THIEL, S. Humoral pattern recognition and the complement system. **Scandinavian journal of immunology**, v. 78, n. 2, p. 181–93, ago. 2013.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, jan. 2010.

EKDAHL, K. N. et al. Interpretation of serological complement biomarkers in disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2237, 24 out. 2018.

ELVINGTON, M.; LISZEWSKI, M. K.; ATKINSON, J. P. Evolution of the complement system: from defense of the single cell to guardian of the intravascular space. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, 2016.

ENDO, Y. et al. Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecule, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 12, p. 5860–6, 15 dez. 2012.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. **Immunobiology**, v. 212, n. 4–5, p. 371–9, jan. 2007.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. New insights into the role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. **International review of cell and molecular biology**, v. 316, p. 49–110, 2015.

ENGELMAN, D. et al. Screening-detected rheumatic heart disease can progress to severe disease. **Heart Asia**, v. 8, n. 2, p. 67–73, 2016.

ENSEMBL. **THE ENSEMBL PROJECT**. Disponível em: <[https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Explore?r=1:27372680-27373682;v=rs532781899;vdb=variation;vf=21608417](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=1:27372680-27373682;v=rs532781899;vdb=variation;vf=21608417)>. Acesso em: 21 set. 2020.

EVANS-OSSSES, I. et al. Involvement of lectin pathway activation in the

- complement killing of *Giardia intestinalis*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 395, n. 3, p. 382–6, 7 maio 2010.
- FARO, J. et al. L-Ficolin binding and lectin pathway activation by acetylated low-density lipoprotein. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 151, n. 2, p. 275–283, 2008.
- FERRETTI, J. J.; STEVENS, D. L.; FISCHETTI, V. A. **Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations**. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016.
- FISHELSON, Z. et al. Characterization of the initial C3 convertase of the alternative pathway of human complement. **Journal of immunology**, v. 132, n. 3, p. 1430–4, mar. 1984.
- FOSBRINK, M.; NICULESCU, F.; RUS, H. The role of c5b-9 terminal complement complex in activation of the cell cycle and transcription. **Immunologic research**, v. 31, n. 1, p. 37–46, jan. 2005.
- GABRIEL, S. B. et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2225–2229, 21 jun. 2002.
- GARLATTI, V. et al. Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. **The EMBO journal**, v. 26, n. 2, p. 623–33, 24 jan. 2007.
- GARRED, P. et al. The genetics of ficolins. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 1, p. 3–16, 2009.
- GARRED, P. et al. A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, 2016.
- GARRED, P.; BORREGAARD, N. The ficolins. **Journal of innate immunity**, v. 2, n. 1, p. 1–2, jan. 2010.
- GEWITZ, M. H. 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**, v. 131, n. 20, p. 1806–1818, 2015.
- GIALELI, C.; GUNGOR, B.; BLOM, A. M. Novel potential inhibitors of complement system and their roles in complement regulation and beyond. **Molecular Immunology**, v. 102, p. 73–83, 1 out. 2018.
- GOLDSTEIN, I.; HALPERN, B.; ROBERT, L. Immunological Relationship between *Streptococcus A* Polysaccharide and the Structural Glycoproteins of Heart Valve. **Nature**, v. 213, p. 44–47, 1967.
- GRAFFELMAN, J.; WEIR, B. S. On the testing of Hardy-Weinberg proportions and equality of allele frequencies in males and females at biallelic genetic markers. **Genetic Epidemiology**, v. 42, n. 1, p. 34–48, 1 fev. 2018.
- GUILHERME, L. et al. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. **The American journal of pathology**, v. 165, n. 5, p. 1583–91, nov. 2004.
- GUILHERME, L. et al. Genes, autoimmunity and pathogenesis of rheumatic heart disease. **Annals of pediatric cardiology**, v. 4, n. 1, p. 13–21, jan. 2011.
- GUILHERME, L.; KALIL, J. Rheumatic fever: the T cell response leading to

autoimmune aggression in the heart. **Autoimmunity reviews**, v. 1, n. 5, p. 261–6, out. 2002.

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**, v. 4, n. October, p. 352, jan. 2013.

GULLA, K. C.; GUPTA, K.; HAJELA, K. Functional estimation of mannanose binding lectin associated serine protease (MBL-MASPs) in human serum. **The Indian journal of medical research**, v. 130, n. 4, p. 428–32, out. 2009.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, v. 57, n. 4, p. 461–485, mar. 2005.

HAERYNCK, F. et al. Polymorphisms in the lectin pathway genes as a possible cause of early chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis patients. **Human immunology**, v. 73, n. 11, p. 1175–83, nov. 2012.

HE, J. Q. J.; WIESMANN, C.; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M. A role of macrophage complement receptor CRIg in immune clearance and inflammation. **Molecular immunology**, v. 45, n. 16, p. 4041–7, out. 2008.

HÉJA, D. et al. Monospecific Inhibitors Show That Both Mannan-binding Lectin-associated Serine Protease-1 ( MASP-1 ) and -2 Are Essential for Lectin Pathway Activation and Reveal Structural Plasticity of MASP-2. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 24, p. 20290–20300, 2012.

HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. **Annual review of immunology**, v. 21, p. 547–78, jan. 2003.

HONORÉ, C. et al. The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. **Arthritis and rheumatism**, v. 56, n. 5, p. 1598–607, maio 2007.

HONORÉ, C. et al. Tethering of Ficolin-1 to cell surfaces through recognition of sialic acid by the fibrinogen-like domain. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 1, p. 145–158, 2010.

HOWARD, M.; FARRAR, C. A.; SACKS, S. H. Structural and functional diversity of collectins and ficolins and their relationship to disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 1, 2018.

HUMMELSHOJ, T. et al. Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen). **Molecular immunology**, v. 45, n. 6, p. 1623–32, mar. 2008a.

HUMMELSHOJ, T. et al. Functional SNPs in the human ficolin (FCN) genes reveal distinct geographical patterns. **Molecular immunology**, v. 45, n. 9, p. 2508–20, maio 2008b.

HURST, J. R. et al. Streptococcal pharyngitis and rheumatic heart disease: the superantigen hypothesis revisited. **INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.**, v. 61, p. 160–175, 2018.

JIN, Z.; JI, Z.; HU, J. [Mannose-binding lectin gene site mutations and the

susceptibility of rheumatic heart disease]. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 81, n. 21, p. 1284–6, 10 nov. 2001.

JONES, T. Diagnosis of rheumatic fever. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 126, p. 481–84, 1944.

KAPLAN, M. H.; DALLENBACH, F. D. Immunologic studies of heart tissue. III. Occurrence of bound gamma globulin in auricular appendages from rheumatic hearts. Relationship to certain histopathologic features of rheumatic heart disease. **The Journal of experimental medicine**, v. 113, p. 1–16, 1 jan. 1961.

KARTHIKEYAN, G.; GUILHERME, L. Acute rheumatic fever. **The Lancet**, v. 392, n. 10142, p. 161–174, 2018.

KATZENELLENBOGEN, J. M. et al. Rheumatic heart disease: Infectious disease origin, chronic care approach. **BMC Health Services Research**, v. 17, n. 1, p. 793, 2017.

KJAER, T. R. et al. Investigations on the pattern recognition molecule M-ficolin: quantitative aspects of bacterial binding and leukocyte association. **Journal of leukocyte biology**, v. 90, n. 3, p. 425–37, set. 2011.

KJAER, T. R. et al. M-ficolin binds selectively to the capsular polysaccharides of streptococcus pneumoniae serotypes 19b and 19c and of a streptococcus mitis strain. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 2, p. 452–459, 2013.

KJAER, T. R. et al. Structural insights into the initiating complex of the lectin pathway of complement activation. **Structure**, v. 23, n. 2, p. 342–351, 2015.

KRARUP, A. et al. Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. **Infection and immunity**, v. 73, n. 2, p. 1052–60, fev. 2005.

KRAUSE, R. M.; MCCARTY, M. Studies on the chemical structure of the streptococcal cell wall. I. The identification of a mucopeptide in the cell walls of groups A and A-variant streptococci. **The Journal of experimental medicine**, v. 114, p. 127–140, 1961.

KUMAR, V. The complement system, toll-like receptors and inflammasomes in host defense: three musketeers' one target. **International Reviews of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 131–156, 2019.

KURAYA, M. et al. Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. **Immunobiology**, v. 209, n. 9, p. 689–97, 15 jan. 2005.

LAABEI, M.; ERMERT, D. Catch Me if you can: Streptococcus pyogenes complement evasion strategies. **Journal of Innate Immunity**, v. 11, n. 1, p. 3–12, 1 dez. 2018.

LESAYRE, P. H. et al. The alternative pathway C3/C5 convertase: chemical basis of factor B activation. **journal of immunology**, v. 123, n. 2, p. 529–34, ago. 1979.

LIU, Y. et al. Human M-Ficolin Is a Secretory Protein That Activates the Lectin Complement Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3150–3156, 2005.

LOW, D. H. P. et al. A novel human tectonin protein with multivalent  $\beta$ -propeller folds interacts with ficolin and binds bacterial LPS. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, 16 jul.

2009.

LU, J. et al. A common genetic variant of FCN3/CD164L2 is associated with essential hypertension in a Chinese population. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 34, n. 5, p. 377–382, ago. 2012.

LUBBERS, R. et al. Production of complement components by cells of the immune system. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 188, n. 2, p. 183–194, 2017.

LYNCH, N. J. et al. L-Ficolin Specifically Binds to Lipoteichoic Acid, a Cell Wall Constituent of Gram-Positive Bacteria, and Activates the Lectin Pathway of Complement. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 2, p. 1198–1202, 15 jan. 2004.

MALKIEL, S. et al. T-cell-dependent antibody response to the dominant epitope of streptococcal polysaccharide, N-acetyl-glucosamine, is cross-reactive with cardiac myosin. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5803–5808, 2000.

MATSUSHITA, M. et al. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 5, p. 2448–54, 2 fev. 1996.

MATSUSHITA, M. Ficolins: Complement-activating lectins involved in innate immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 1, p. 24–32, 2009.

MATSUSHITA, M. Ficolins in complement activation. **Molecular immunology**, v. 55, n. 1, p. 22–6, ago. 2013.

MAURICE, J. Rheumatic heart disease back in the limelight. **The Lancet**, v. 382, n. 9898, p. 1085–1086, set. 2013.

MCNEILLY, C. et al. Predicted coverage and immuno-Safety of a recombinant c-Repeat region based streptococcus pyogenes vaccine candidate. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2016.

MESSIAS-REASON, I. J. et al. Ficolin 2 (FCN2) functional polymorphisms and the risk of rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Clinical and experimental immunology**, v. 157, n. 3, p. 395–9, set. 2009.

MESSIAS-REASON, I. J. DE; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. J. Functional haplotypes that produce normal ficolin-2 levels protect against clinical leprosy. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 6, p. 801–4, 15 mar. 2009.

MESSIAS, I. J.; CAVALCANTI, E.; RADOMINSKI, S. C. Increased frequency of the C4A\*6 rare allele in rheumatic heart disease. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 24, n. 3, p. 164–8, jan. 1995.

MESSIAS REASON, I. J. et al. The association between mannose-binding lectin gene polymorphism and rheumatic heart disease. **Human immunology**, v. 67, n. 12, p. 991–8, dez. 2006.

METZGAR, D.; ZAMPOLLI, A. The M protein of group A Streptococcus is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 402–12, 2011.

MICHALSKI, M. et al. H-ficolin (ficolin-3) concentrations and FCN3 gene polymorphism in neonates. **Immunobiology**, v. 217, n. 7, p. 730–737, 2011.

MICHALSKI, M. et al. Primary Ficolin-3 deficiency - Is it associated with

- increased susceptibility to infections? **Immunobiology**, v. 220, n. 6, p. 711–713, 1 jun. 2015.
- MORENO-AMARAL, A. N. et al. M-ficolin and leukosialin (CD43): new partners in neutrophil adhesion. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. 3, p. 469–474, mar. 2012.
- MUNTHER-FOG, L. et al. Characterization of a polymorphism in the coding sequence of FCN3 resulting in a Ficolin-3 (Hakata antigen) deficiency state. **Molecular immunology**, v. 45, n. 9, p. 2660–6, maio 2008.
- MUNTHER-FOG, L. et al. Immunodeficiency Associated with FCN3 Mutation and Ficolin-3 Deficiency. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 25, p. 2637–2644, 18 jun. 2009.
- MUNTHER-FOG, L. et al. Variation in FCN1 affects biosynthesis of ficolin-1 and is associated with outcome of systemic inflammation. **Genes and immunity**, v. 13, n. 7, p. 515–22, out. 2012.
- NETH, O. et al. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 688–93, fev. 2000.
- PANDA, S. et al. Natural IgG antibodies provide innate protection against ficolin-opsonized bacteria. **EMBO Journal**, v. 32, n. 22, p. 2905–2919, 13 nov. 2013.
- PANDA, S. et al. Molecular interaction between natural IgG and ficolin - Mechanistic insights on adaptive-innate immune crosstalk. **Scientific Reports**, v. 4, 1 abr. 2014.
- PARKS, T.; SMEESTERS, P. R.; STEER, A. C. Streptococcal skin infection and rheumatic heart disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 145–153, abr. 2012.
- PREHM, S. et al. Antibodies against proteins of streptococcal hyaluronate synthase bind to human fibroblasts and are present in patients with rheumatic fever. **Journal of anatomy**, v. 187 ( Pt 2, p. 271–7, out. 1995.
- PROHÁSZKA, Z. et al. Association of ficolin-3 with severity and outcome of chronic heart failure. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60976, jan. 2013.
- RAMASAWMY, R. et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 15, n. 6, p. 932–6, jun. 2008.
- REDDY, K. S. et al. Immunologic and immunogenetic studies in rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Indian journal of pediatrics**, v. 57, n. 5, p. 693–700, 1990.
- REN, Y.; DING, Q.; ZHANG, X. Ficolins and infectious diseases. **Virologica Sinica**, v. 29, n. 1, p. 25–32, fev. 2014.
- RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature immunology**, v. 11, n. 9, p. 785–97, set. 2010.
- RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 3831–3838, 2013.

- ROBERTS, S. et al. Pathogenic mechanisms in rheumatic carditis: focus on valvular endothelium. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 3, p. 507–11, 1 fev. 2001.
- SAHAGUM RUIZ, A. et al. Studies of the binding of ficolin-2 and ficolin-3 from the complement lectin pathway to *Leptospira biflexa*, *Pasteurella pneumotropica* and Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Immunobiology**, v. 220, n. 10, p. 1177–1185, 2015.
- SAIKI, R. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487–91, 1988.
- SAPRU, R. P. et al. Cellular reaction to group A beta-haemolytic streptococcal membrane antigen and its relation to complement levels in patients with rheumatic heart disease. **British medical journal**, v. 2, n. 6084, p. 422–4, 13 ago. 1977.
- SCALZI, V. et al. Anti-endothelial cell antibodies in rheumatic heart disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 161, n. 3, p. 570–575, set. 2010.
- SCHAFFER, T. et al. Increased titers of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in Crohn's disease patients with reduced H-ficolin levels but normal MASP-2 activity. **Journal of Crohn's & colitis**, v. 7, n. 1, p. e1-10, fev. 2013.
- SCHAFRANSKI, M. D. et al. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. **Clinical and experimental immunology**, v. 138, n. 3, p. 521–5, dez. 2004.
- SCHAFRANSKI, M. D. et al. High-producing MBL2 genotypes increase the risk of acute and chronic carditis in patients with history of rheumatic fever. **Molecular immunology**, v. 45, n. 14, p. 3827–31, ago. 2008.
- SCHLAPBACH, L. J. et al. H-ficolin serum concentration and susceptibility to fever and neutropenia in paediatric cancer patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, n. 1, p. 83–89, jul. 2009a.
- SCHLAPBACH, L. J. et al. M-ficolin in the neonatal period: Associations with need for mechanical ventilation and mortality in premature infants with necrotising enterocolitis. **Molecular immunology**, v. 46, n. 13, p. 2597–603, ago. 2009b.
- SCHLAPBACH, L. J. et al. Congenital H-ficolin deficiency in premature infants with severe necrotising enterocolitis. **Gut**, v. 60, n. 10, p. 1438–9, out. 2011.
- SCHLAPBACH, L. J. et al. M-ficolin concentrations in cord blood are related to circulating phagocytes and to early-onset sepsis. **Pediatric Research**, v. 71, n. 4–1, p. 368–374, 2012.
- SHARMA, N.; TOOR, D. Impact of Socio-Economic Factors on Increased Risk and Progression of Rheumatic Heart Disease in Developing Nations. **Current Infectious Disease Reports**, v. 21, n. 6, 1 jun. 2019.
- SIKA-PAOTONU, D. et al. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 15085, 2016.
- SMEDBRÅTEN, Y. V. et al. High ficolin-3 level at the time of transplantation is an independent risk factor for graft loss in kidney transplant recipients. **Transplantation**, v. 99, n. 4, p. 791–796, 1 abr. 2015.
- SPINA, G. S. Doença reumática: negligenciada, mas ainda presente e mortal.



**Rev Med**, v. 87, n. 2, p. 128–41, 2008.

STEER, A. C. Historical aspects of rheumatic fever. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 51, n. 1, p. 21–27, 2015.

SUGIMOTO, R. et al. Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 33, p. 20721–7, 14 ago. 1998.

SVENDSEN, C. B. et al. Ficolins and Mannose-Binding Lectin in Danish patients with sarcoidosis. **Respiratory Medicine**, v. 102, n. 9, p. 1237–1242, 2008.

SWIERZKO, A. et al. New functional ligands for ficolin-3 among lipopolysaccharides of *Hafnia alvei*. **Glycobiology**, v. 22, n. 2, p. 267–80, 2012.

SZALA, A. et al. Ficolin-2 and ficolin-3 in women with malignant and benign ovarian tumours. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 62, n. 8, p. 1411–9, ago. 2013.

SZCZYGIELSKA, I. et al. Rheumatic fever – New diagnostic criteria. **Reumatologia**, v. 56, n. 1, 2018.

TANDON, R. et al. Revisiting the pathogenesis of rheumatic fever and carditis. **Nature reviews. Cardiology**, v. 10, n. 3, p. 171–7, mar. 2013.

TANIO, M.; WAKAMATSU, K.; KOHNO, T. Binding site of C-reactive protein on M-ficolin. **Molecular immunology**, v. 47, n. 2–3, p. 215–21, dez. 2009.

TEH, C. et al. M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl-D-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of *Escherichia coli*. **Immunology**, v. 101, n. 2, p. 225–32, out. 2000.

THIEL, S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. **Molecular immunology**, v. 44, n. 16, p. 3875–88, set. 2007.

THOMSEN, T. et al. Ficolins and FIBCD1: Soluble and membrane bound pattern recognition molecules with acetyl group selectivity. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 4, p. 369–381, jan. 2011.

TIBAZARWA, K.; JA, V.; MAYOSI, B. Incidence of acute rheumatic fever in the world: a systematic review of population-based studies. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 94, n. 12, p. 1534–40, 2008.

TIZZOT, M. R. et al. Ficolin-1 and ficolin-3 plasma levels are altered in HIV and HIV/HCV coinfecting patients from southern Brazil. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. OCT, p. 1–7, 2018.

TODAR, K. **Todar's Online Textbook of Bacteriology**. Disponível em: <[www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)>. Acesso em: 11 fev. 2020.

TORRES, R. S. L. A. **Prevalência de estreptococos do grupo A e outros grupos sorológicos em crianças abaixo de sete anos de idade em creches na cidade de Curitiba, Brasil**. [s.l.] Universidade Estadual de Londrina, 2000.

TSUJIMURA, M. et al. Serum concentration of Hakata antigen, a member of the ficolins, is linked with inhibition of *Aerococcus viridans* growth. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 325, n. 1–2, p. 139–46, nov. 2002.

VANDER CRUYSSSEN, B. et al. Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 46, n. 12, p. 1792–1795, dez. 2007.

VERMA, A. et al. Human H-Ficolin Inhibits Replication of Seasonal and Pandemic Influenza A Viruses. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 5, p. 2478–2487, 2012.

WALPORT, M. J. Complement. First of Two Parts. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 14, p. 1058–1066, 2001.

WATKINS, D. A. et al. Global, Regional, and National Burden of Rheumatic Heart Disease, 1990–2015. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 8, 2017.

WILLIAMSON, D. A. et al. M-protein analysis of streptococcus pyogenes isolates associated with acute rheumatic fever in New Zealand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 3618–3620, 1 nov. 2015.

WITTENBORN, T. et al. Characteristics and biological variations of M-ficolin, a pattern recognition molecule, in plasma. **Journal of innate immunity**, v. 2, n. 2, p. 167–80, jan. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Study Group on Rheumatic Heart Disease (2001: Geneva, Switzerland) & World Health Organization (2004). Rheumatic fever and rheumatic heart disease: Report of a WHO Expert Consultation**. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/42898>>.

ZACHO, R. M. et al. Studies of the pattern recognition molecule H-ficolin: Specificity and purification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 11, p. 8071–8081, 2012.

ZANGARI, R. et al. Early ficolin-1 is a sensitive prognostic marker for functional outcome in ischemic stroke. **Journal of Neuroinflammation**, 2016.

ZHANG, J. et al. Secreted M-Ficolin Anchors onto Monocyte Transmembrane G Protein-Coupled Receptor 43 and Cross Talks with Plasma C-Reactive Protein to Mediate Immune Signaling and Regulate Host Defense. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 11, p. 6899–6910, 2010.

## ANEXOS

## ANEXO 1. Protocolo de extração de DNA a partir de sangue total

**Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)**

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, and body fluids using a microcentrifuge. For total DNA purification using a vacuum manifold, see "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol)" on page 29.

**Important points before starting**

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 17).
- 200 µl of whole blood yields 3–12 µg of DNA. Preparation of buffy coat (see page 18) is recommended if a higher yield is required.

**Things to do before starting**

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 16.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

**Procedure**

1. Pipet 20 µl QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 ml microcentrifuge tube.
2. Add 200 µl sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 µl whole blood, plasma, serum, buffy coat, or body fluids, or up to  $5 \times 10^6$  lymphocytes in 200 µl PBS.

If the sample volume is less than 200 µl, add the appropriate volume of PBS.

QIAamp Mini spin columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 µl of an RNase A stock solution (100 mg/ml) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

**Note:** It is possible to add QIAGEN Protease (or proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

**3. Add 200  $\mu$ l Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

If the sample volume is larger than 200  $\mu$ l, increase the amount of QIAGEN Protease (or proteinase K) and Buffer AL proportionally; for example, a 400  $\mu$ l sample will require 40  $\mu$ l QIAGEN Protease (or proteinase K) and 400  $\mu$ l Buffer AL. If sample volumes larger than 400  $\mu$ l are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits is recommended; these can process up to 2 ml or up to 10 ml of sample, respectively.

**Note:** Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

**4. Incubate at 56°C for 10 min.**

DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

**5. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.**

**6. Add 200  $\mu$ l ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.**

If the sample volume is greater than 200  $\mu$ l, increase the amount of ethanol proportionally; for example, a 400  $\mu$ l sample will require 400  $\mu$ l of ethanol.

**7. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000  $\times$  g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.\***

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

Centrifugation is performed at 6000  $\times$  g (8000 rpm) to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again at higher speed until the QIAamp Mini spin column is empty.

**Note:** When preparing DNA from buffy coat or lymphocytes, centrifugation at full speed is recommended to avoid clogging.

**8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500  $\mu$ l Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000  $\times$  g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.\***

It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 if the original sample volume is larger than 200  $\mu$ l.

\* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

9. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500  $\mu$ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000  $\times$   $g$ ; 14,000 rpm) for 3 min.
10. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200  $\mu$ l Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000  $\times$   $g$  (8000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

A second elution step with a further 200  $\mu$ l Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200  $\mu$ l should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200  $\mu$ l increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 25). For samples containing less than 1  $\mu$ g of DNA, elution in 50  $\mu$ l Buffer AE or water is recommended. Eluting with 2  $\times$  100  $\mu$ l instead of 1  $\times$  200  $\mu$ l does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at –30 to –15°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

A 200  $\mu$ l sample of whole human blood (approximately  $5 \times 10^6$  leukocytes/ml) typically yields 6  $\mu$ g of DNA in 200  $\mu$ l water (30 ng/ $\mu$ l) with an  $A_{260}/A_{280}$  ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, refer to pages 24–25 and Appendix A, page 50.

## ANEXO 2. PROTOCOLOS DAS REAÇÕES DE ELISA COM KIT COMERCIAL



**SEA786Hu 96 Tests**  
**Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit**  
**For Ficolin 1 (FCN1)**  
**Organism Species: Homo sapiens (Human)**  
*Instruction manual*

FOR IN VITRO AND RESEARCH USE ONLY  
NOT FOR USE IN CLINICAL DIAGNOSTIC PROCEDURES

### **[ ASSAY PROCEDURE ]**

1. Determine wells for diluted standard, blank and sample. Prepare 7 wells for standard, 1 well for blank.  
Add 100 $\mu$ L each of dilutions of standard (read Reagent Preparation), blank and samples into the appropriate wells. Cover with the Plate sealer. Incubate for 2 hours at 37°C.
2. Remove the liquid of each well, don't wash.
3. Add 100 $\mu$ L of **Detection Reagent A** working solution to each well. Incubate for 1 hour at 37°C after covering it with the Plate sealer.
4. Aspirate the solution and wash with 350 $\mu$ L of 1 $\times$  Wash Solution to each well using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser or autowasher, and let it sit for 1~2 minutes. Remove the remaining liquid from all wells completely by snapping the plate onto absorbent paper. Totally wash 3 times. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against absorbent paper.
5. Add 100 $\mu$ L of **Detection Reagent B** working solution to each well. Incubate for 30 minutes at 37°C after covering it with the Plate sealer.
6. Repeat the aspiration/wash process for total 5 times as conducted in step 4.
7. Add 90 $\mu$ L of **Substrate Solution** to each well. Cover with a new Plate sealer. Incubate for 15 - 25 minutes at 37°C (Don't exceed 30 minutes). Protect from light. The liquid will turn blue by the addition of Substrate Solution.
8. Add 50 $\mu$ L of **Stop Solution** to each well. The liquid will turn yellow by the addition of Stop solution. Mix the liquid by tapping the side of the plate. If color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate and confirm there is no bubble on the surface of the liquid. Then, run the microplate reader and conduct measurement at 450nm immediately.

**SEB903Hu 96 Tests**  
**Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit**  
**For Ficolin 3 (FCN3)**  
**Organism Species: *Homo sapiens* (Human)**  
***Instruction manual***

FOR RESEARCH USE ONLY

NOT FOR USE IN CLINICAL DIAGNOSTIC PROCEDURES

---

---

### **[ ASSAY PROCEDURE ]**

1. Determine wells for diluted standard, blank and sample. Prepare 7 wells for standard, 1 well for blank. Add 100µL each of dilutions of standard (read Reagent Preparation), blank and samples into the appropriate wells. Cover with the Plate sealer. Incubate for 1 hour at 37°C.
2. Remove the liquid of each well, don't wash.
3. Add 100µL of **Detection Reagent A** working solution to each well, cover the wells with the plate sealer and incubate for 1 hour at 37°C.
4. Aspirate the solution and wash with 350µL of 1× Wash Solution to each well using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser or autowasher, and let it sit for 1~2 minutes. Remove the remaining liquid from all wells completely by snapping the plate onto absorbent paper. Totally wash 3 times. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against absorbent paper.
5. Add 100µL of **Detection Reagent B** working solution to each well, cover the wells with the plate sealer and incubate for 30 minutes at 37°C.
6. Repeat the aspiration/wash process for total 5 times as conducted in step 4.
7. Add 90µL of **Substrate Solution** to each well. Cover with a new Plate sealer. Incubate for 10 - 20 minutes at 37°C (Don't exceed 30 minutes). Protect from light. The liquid will turn blue by the addition of Substrate Solution.
8. Add 50µL of **Stop Solution** to each well. The liquid will turn yellow by the addition of Stop solution. Mix the liquid by tapping the side of the plate. If color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate and confirm there is no bubble on the surface of the liquid. Then, run the microplate reader and conduct measurement at 450nm immediately.

### ANEXO 3. DADOS DE TODOS OS PACIENTES

ID	Grupo	Sexo	Idade	Etnia	Cardite	Estenose mitral	Insuficiência Mitral	Estenose aórtica	Insuficiência Aórtica	Estenose tricúspide	Insuficiência tricúspide
1	RHD	Fem.	51	Euro	1	1	0	0	0	0	0
2	RHD	Fem.	61	Euro	1	3	1	0	0	0	0
3	RHD	Fem.	58	Euro	1	3	0	0	0	0	0
4	RHD	Masc.	63	Euro	1	3	0	1	1	0	0
5	RHD	Fem.	56	Euro	1	1	1	1	1	0	0
6	RHD	Fem.	38	Afro	1	2	1	0	1	0	0
7	RHD	Masc.	55	Euro	1	1	2	1	1	0	0
8	RHD	Fem.	36	Euro	1	1	0	0	0	0	0
9	RHD	Fem.	24	Afro	1	1	3	1	3	0	1
10	RHD	Fem.	19	Afro	1	1	0	0	0	0	0
11	RHD	Masc.	70	Euro	1	1	1	0	1	0	1
12	RHD	Fem.	71	Euro	1	3	1	1	1	0	0
13	RHD	Fem.	51	Euro	1	0	0	0	0	0	0
14	RHD	Fem.	60	Euro	1	0	0	0	0	0	0
15	RHD	Fem.	44	Afro	1	1	0	0	0	0	0
16	RHD	Fem.	44	Afro	1	2	2	0	0	0	0
17	RHD	Fem.	39	Euro	1	1	1	0	0	2	1
18	RHD	Fem.	38	Euro	1	0	0	0	0	0	0
19	RHD	Fem.	28	Euro	1	2	1	0	2	0	1
20	RHD	Masc.	26	Euro	1	3	1	0	1	0	0
21	RHD	Fem.	43	Afro	1	1	1	0	0	0	0
22	RHD	Fem.	57	Euro	1	1	0	0	0	0	0
23	RHD	Fem.	39	Afro	1	1	1	0	0	0	0
24	RHD	Fem.	33	Euro	1	2	2	0	0	0	0
25	RHD	Masc.	50	Euro	1	2	1	1	1	0	0
26	RHD	Fem.	59	Euro	1	2	1	1	1	0	0
27	RHD	Fem.	40	Afro	1	0	0	0	0	0	0
28	RHD	Fem.	50	Euro	1	2	1	1	1	0	0
29	RHD	Fem.	56	Afro	1	1	1	0	0	0	0
30	RHD	Masc.	57	Euro	1	1	2	0	0	0	1
31	RHD	Fem.	76	Euro	1	0	0	0	0	0	0
32	RHD	Fem.	56	Euro	1	1	1	1	1	0	0
33	RHD	Fem.	33	Euro	1	2	1	0	0	0	1
34	RHD	Fem.	37	Afro	1	1	1	0	0	0	0
35	RHD	Fem.	61	Euro	1	2	1	1	1	0	1
36	RHD	Masc.	36	Euro	1	1	1	0	0	0	0
37	RHD	Masc.	60	Euro	1	0	1	0	0	0	0
38	RHD	Fem.	53	Euro	1	0	1	0	1	0	1
39	RHD	Masc.	39	Euro	1	0	1	0	1	0	1
40	RHD	Fem.	36	Euro	1	0	2	0	0	0	0
41	RHD	Fem.	56	Euro	1	0	0	0	0	0	3
42	RHD	Fem.	35	Euro	1	1	2	0	0	0	0
43	RHD	Masc.	51	Euro	1	0	0	0	0	0	0
44	RHD	Fem.	58	Euro	1	1	1	0	0	0	1
45	RHD	Fem.	30	Euro	1	3	1	0	1	0	1
46	RHD	Fem.	59	Afro	1	1	1	0	0	0	1
47	RHD	Fem.	37	Euro	1	2	1	0	0	0	0
48	RHD	Masc.	34	Euro	1	0	1	0	0	0	0
49	RHD	Fem.	44	Euro	1	1	1	0	0	0	0



50	RHD	Fem.	52	Euro	1	0	0	1	1	0	1
51	RHD	Fem.	56	Euro	1	0	0	0	0	0	0
52	RHD	Masc.	46	Euro	1	0	1	0	0	0	0
53	RHD	Fem.	35	Afro	1	1	1	1	0	0	1
54	RHD	Masc.	34	Euro	1	0	0	0	0	1	1
55	RHD	Fem.	48	Euro	1	2	0	1	1	0	1
56	RHD	Fem.	51	Euro	1	1	1	1	1	0	1
57	RHD	Fem.	41	Euro	1	2	2	0	0	0	1
58	RHD	Fem.	39	Afro	1	1	1	0	0	0	0
59	RHD	Fem.	42	Euro	1	0	0	0	0	0	0
60	RHD	Fem.	50	Euro	1	1	1	1	1	0	0
61	RHD	Masc.	66	Euro	1	1	1	1	1	0	0
62	RHD	Masc.	35	Euro	1	1	1	0	0	0	0
63	RHD	Fem.	59	Euro	1	1	0	0	0	0	0
64	RHD	Fem.	42	Euro	1	2	0	0	0	0	0
65	RHD	Fem.	38	Euro	1	2	0	0	0	0	0
66	RHD	Masc.	37	Euro	1	2	0	1	1	1	0
67	RHD	Masc.	47	Afro	1	1	1	0	1	0	0
68	RHD	Fem.	43	Euro	1	2	0	1	0	0	0
69	RHD	Fem.	33	Euro	1	2	0	1	0	0	1
70	RHD	Fem.	69	Euro	1	2	2	0	0	0	0
71	RHD	Fem.	42	Euro	1	1	0	0	0	0	0
72	RHD	Fem.	57	Afro	1	1	0	0	0	0	0
73	RHD	Fem.	45	Euro	1	1	1	0	0	0	1
74	RHD	Fem.	32	Euro	1	1	0	0	0	0	0
75	RHD	Fem.	38	Afro	1	2	1	0	1	0	1
76	RHD	Fem.	38	Euro	1	1	1	0	0	0	0
77	RHD	Fem.	46	Euro	1	1	1	0	1	0	1
78	RHD	Fem.	30	Euro	1	1	0	0	0	0	0
79	RHD	Fem.	44	Euro	1	2	1	1	1	0	0
80	RHD	Masc.	57	Euro	1	1	1	0	0	0	0
81	RHD	Masc.	47	Euro	1	2	1	0	0	0	0
82	RHD	Fem.	54	Euro	1	1	2	1	1	1	0
83	RHD	Masc.	46	Afro	1						
84	RHD	Masc.	46	Afro	1						
85	RHD	Fem.	41	Euro	1	1	1	0	1	0	0
86	RHD	Fem.	45	Euro	1	1	0	1	1	0	0
87	RHD	Masc.	43	Euro	1	2	1	2	2	0	1
88	RHD	Fem.	30	Afro	1	2	2	3	1	0	0
89	RHD	Fem.	58	Euro	1	3	1	1	1	0	1
90	RHD	Fem.	46	Euro	1						
91	RHD	Fem.	46	Euro	1						
92	RHD	Masc.	54	Euro	1	1	1	0	1	0	1
93	RHD	Fem.	40	Euro	1	2	1	0	0	0	1
94	RHD	Fem.	32	Euro	1	1	1	0	0	0	0
95	RHD	Fem.	38	Euro	1	2	0	0	1	0	1
96	RHD	Fem.	51	Euro	1	1	0	0	0	0	0
97	RHD	Fem.	46	Euro	1						
98	RHD	Fem.	58	Euro	1	1	1	0	1	0	1
99	RHD	Fem.	46	Euro	1						
100	RHD	Fem.	38	Euro	1	1	3	0	1	0	1
101	RHD	Fem.	63	Euro	1	2	1	0	1	0	1

102	RHD	Fem.	25	Euro	1	1	1	0	1	0	0
103	RHD	Fem.	56	Euro	1	1	0	0	0	0	0
104	RHD	Masc.	40	Euro	1	1	1	0	1	0	0
105	RHD	Masc.	40	Euro	1	1	1	0	1	0	0
106	RHD	Fem.	31	Euro	1	2	1	0	0	0	0
107	RHD	Fem.	46	Euro	1						
1R	RFo	Fem.	19	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2R	RFo	Masc.	21	Afro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3R	RFo	Masc.	14	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4R	RFo	Fem.	23	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5R	RFo	Fem.	18	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6R	RFo	Fem.	24	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7R	RFo	Masc.	21	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8R	RFo	Fem.	21	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9R	RFo	Fem.	26	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10R	RFo	Masc.	27	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11R	RFo	Fem.	31	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12R	RFo	Fem.	18	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13R	RFo	Masc.	24	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
14R	RFo	Masc.	15	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15R	RFo	Masc.	26	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16R	RFo	Masc.	19	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17R	RFo	Masc.	23	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
18R	RFo	Fem.	31	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
19R	RFo	Masc.	8	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20R	RFo	Fem.	29	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
21R	RFo	Masc.	26	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22R	RFo	Fem.	15	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23R	RFo	Masc.	30	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
24R	RFo	Masc.	29	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25R	RFo	Fem.	26	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26R	RFo	Fem.	16	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
27R	RFo	Fem.	31	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
28R	RFo	Masc.	27	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
29R	RFo	Masc.	20	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
30R	RFo	Fem.	31	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
31R	RFo	Fem.	27	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32R	RFo	Masc.	23	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
33R	RFo	Fem.	23	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
34R	RFo	Fem.	16	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
35R	RFo	Fem.	25	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
36R	RFo	Masc.	26	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
37R	RFo	Fem.	22	Afro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
38R	RFo	Fem.	33	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
39R	RFo	Fem.	15	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
40R	RFo	Masc.	10	Afro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
41R	RFo	Fem.	20	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
42R	RFo	Fem.	17	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
580	RHD	Fem.	66	Afro	1						
126	RFo	Masc.	26	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
437	RHD	Fem.	18	Euro	1						
438	RFo	Fem.	13	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA

447	RFo	Masc.	14	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
455	RFo	Fem.	15	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
463	RFo	Fem.	18	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
466	RFo	Masc.	13	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
468	RFo	Masc.	9	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
691	RHD	Masc.	31	Euro	1						
699	RHD	Fem.	50	Afro	1						
703	RHD	Fem.	29	Euro	1						
707	RHD	Fem.	56	Euro	1						
732	RHD	Masc.	38	Euro	1						
762	RHD	Fem.	47	Euro	1						
764	RHD	Fem.	42	Euro	1						
795	RHD	Masc.	17	Euro	1						
796	RHD	Fem.	34	Euro	1						
800	RHD	Fem.	21	Euro	1						
802	RHD	Fem.	24	Euro	1						
803	RHD	Fem.	40	Euro	1						
805	RHD	Fem.	60	Afro	1						
806	RHD	Masc.	41	Euro	1						
807	RHD	Fem.	38	Euro	1						
812	RHD	Masc.	15	Euro	1						
813	RHD	Masc.	34	Euro	1						
814	RHD	Fem.	21	Afro	1						
825	RHD	Fem.	36	Euro	1						
828	RHD	Fem.	30	Euro	1						
903	RFo	Fem.	33	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
906	RHD	Fem.	43	Afro	1						
940	RHD	Masc.	39	Euro	1						
943	RHD	Fem.	52	Euro	1						
944	RFo	Fem.	61	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
945	RHD	Fem.	60	Euro	1						
949	RHD	Fem.	10	Euro	1						
950	RHD	Fem.	41	Afro	1						
951	RHD	Fem.	45	Euro	1						
954	RHD	Fem.	38	Euro	1						
955	RHD	Fem.	30	Afro	1						
956	RHD	Fem.	66	Euro	1						
957	RHD	Fem.	34	Euro	1						
958	RHD	Masc.	40	Euro	1						
959	RFo	Fem.	24	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
961	RFo	Masc.	33	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
962	RHD	Masc.	20	Euro	1						
964	RHD	Fem.	50	Euro	1						
965	RHD	Fem.	31	Euro	1						
966	RHD	Fem.	37	Euro	1						
967	RHD	Fem.	38	Euro	1						
968	RHD	Masc.	36	Afro	1						
969	RHD	Fem.	38	Euro	1						
970	RHD	Fem.	52	Euro	1						
971	RHD	Fem.	43	Euro	1						
972	RHD	Masc.	27	Euro	1						
974	RHD	Fem.	48	Euro	1						

975	RHD	Fem.	17	Euro	1								
976	RFo	Fem.	67	Euro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
977	RFo	Masc.	33	Euro	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

#### ANEXO 4. DADOS DOS PACIENTES FRo PROVENIENTES DO HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

ID	Idade	Sexo	Etnia	Idade do Primeiro Surto	Idade do Último Surto	Total	Cardite	Artrite	Nódulos	Eritema	Coréia	Em Profilaxia	Término profilaxia (anos)	Profilaxia correta
1	19	Fem.	Euro	6	6	1	2	1	2	2	2	1		1
2	21	Masc.	Afro	6	8	5	2	1	2	2	2	2	21	1
3	13	Masc.	Afro	12	12	1	1	1	2	2	2	1		1
4	22	Fem.	Euro	9	10	5	1	1	2	2	2	2	21	1
5	17	Fem.	Afro	8	8	1	1	2	2	2	2	2	irregular	2
6	23	Fem.	Euro	5	5	1	2	1	2	2	2	2	21	1
7	20	Masc.	Euro	3	3	1	1	1	2	2	2	1		1
8	20	Fem.	Euro	8	8	1	1	1	2	2	2	1		1
9	25	Fem.	Afro	7	7	1	1	1	2	2	2	1		1
10	26	Masc.	Euro	15	15	1	1	2	2	2	2	2	21	1
11	30	Fem.	Euro	3	3	2	1	2	2	2	2	2	21	1
12	17	Fem.	Afro	9	9	1	1	1	2	2	2	1		1
13	23	Masc.	Euro	7	11	2	1	2	2	2	2	2	21	1
14	14	Masc.	Euro	5	5	1	1	1	2	2	2	1		1
15	25	Masc.	Afro	5	5	1	1	2	2	2	2	2	17	1
16	18	Masc.	Afro	7	7	1	1	1	2	2	2	1		1
17	22	Masc.	Afro	6	6	1	1	2	2	2	2	2	21	1
18	31	Fem.	Euro	7	21	10	1	2	2	2	2	2	21	1
19	7	Masc.	Afro	3	3	1	1	2	2	2	2	1		1
20	28	Fem.	Euro	7	7	1	1	2	2	2	2	2	21	1
21	25	Masc.	Afro	8	8	1	1	2	2	2	2	1		1
22	14	Fem.	Afro	6	6	1	1	2	2	2	2	1		1
23	29	Masc.	Euro	16	16	1	1	2	2	2	2	2	21	1
24	28	Masc.	Euro	6	6	1	1	2	2	2	2	2	22	1
25	25	Fem.	Euro	8	8	1	1	2	2	2	2	2	21	1
26	15	Fem.	Euro	8	8	1	1	2	2	2	2	1		1
27	30	Fem.	Euro	11	11	1	1	1	2	2	2	1		1
28	26	Masc.	Euro	10	10	1	1	1	2	2	2	2	21	1
29	19	Masc.	Afro	8	8	1	1	2	2	2	2	2	13	2
30	30	Fem.	Euro	5	5	1	1	2	2	2	2	2	21	1
31	26	Fem.	Euro	8	8	1	1	1	2	2	1	2	21	1
32	22	Masc.	Afro	9	9	1	1	2	2	2	2	2	20	1
33	22	Fem.	Euro	11	11	1	1	1	2	2	2	1		1
34	15	Fem.	Euro	13	13	1	1	2	2	2	2	1		1
35	24	Fem.	Afro	11	11	1	1	2	2	1	2	1		1
36	25	Masc.	Euro	14	14	1	1	1	2	2	2	1		1
37	21	Fem.	Afro	9	9	4	2	2	2	2	1	2	17	1
38	32	Fem.	Afro	15	17	3	1	2	2	2	1	1		1
39	14	Fem.	Euro	10	10	1	2	1	1	2	2	1		1
40	9	Masc.	Afro	9	9	2	1	1	1	2	2	1		1
41	19	Fem.	Euro	14	14	1	2	1	1	2	2	2	16	2
42	16	Fem.	Euro	13	13	1	2	1	1	2	2	1		1