CARLO DE OLIVEIRA MARTINS

**Análise proteômica diferencial em válvula
mitral na doença reumática cardíaca**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Luiza Guilherme Guglielmi

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está
disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Martins, Carlo de Oliveira

Análise proteômica diferencial em válvula mitral na doença reumática cardíaca /
Carlo de Oliveira Martins. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Luiza Guilherme Guglielmi.

Descritores: 1.Cardiopatia reumática 2.Doenças das válvulas cardíacas
3.Degeneração mixomatosa 4.Autoimunidade 5.Matriz extracelular 6.Humanos
7.Proteômica 8.Eletroforese em gel diferencial bidimensional

USP/FM/DBD-063/13

Dedico este trabalho

às primeiras pessoas que viram o cientista no menino que eu era:

à minha avó Cecy de Oliveira Martins (in memorian)

à professora Maria de Lourdes D'Ávila Assumpção (in memorian)

Agradecimentos

Esta etapa de doutorado foi repleta de desafios, científicos e pessoais. Evoluí bastante, e foram muitas pessoas que me apoiaram nesta fase, de perto ou de longe, que me incentivaram com sua sabedoria, com suas palavras e com seu exemplo. Terminei esta etapa muito diferente de quando comecei, -muito melhor! Gostaria de destacar algumas das pessoas que contribuíram para meu amadurecimento, às quais agradeço de coração!

Tenho um agradecimento especial ao prof. dr. Edecio Cunha-Neto, que me ajudou em todas as etapas do trabalho, que de fato foi meu co-orientador, do início até o último instante, que me orientou em todos estes caminhos da ciência, me iniciou nas técnicas de proteômica, e com quem discuti e aprendi muito durante toda esta jornada;

Agradeço imensamente ao prof. dr. Jorge Kalil, exemplo para mim há longo tempo, homem de ciência, incansável, que sempre dividiu com os alunos seus ensinamentos e exemplos de vida, agradeço também pelo aprendizado que me proporcionou. Sua atuação constante foi essencial para me incluir e me apaixonar pelo mundo da ciência;

Minha orientadora, profa. dra. Luiza Guilherme, que sempre teve as portas abertas para mim, com quem tive a oportunidade de aprender muito, desde o desenho experimental até às conclusões, passando pelas questões burocráticas que nos cercam, e com quem tive a oportunidade valiosa de me desenvolver como cientista;

Profa. dra. Verônica Coelho, e a todo o grupo de transplante e imunorregulação, que me deram sugestões inestimáveis, sempre dispostos a ajudar e apoiar;

Keity Souza Santos, minha amiga desde o primeiro instante, presença constante durante todo o desenvolvimento do trabalho, colega de bancada e de discussão sobre metodologias e resultados;

Virgínia M. F. Resende, com quem dividi muitos dos problemas e das alegrias de superá-los;

Helen A. Arcuri, que me auxiliou com valiosas sugestões de Bioinformática, e pelas longas conversas;

Meus amigos, que já passaram pelo laboratório e que me ajudaram muito no início do trabalho: Maísa Takenaka, Hernandez Silva, Carolina L. Ramos;

O pessoal do grupo de Febre Reumática: Edilberto Postol, Frederico Ferreira, Karen Köhler, Samar F. Barros, Raquel Alencar, Selma Palácios, Simone Santos, Washington Silva, Fernanda Alegria;

Karine M. Amicis, que foi amiga constante, e colega durante toda esta etapa de amadurecimento científico, e que dividiu comigo as dificuldades e as alegrias;

Nathália M. Santos, minha amiga incondicional em todos os momentos, com quem também dividi muitas dificuldades e alegrias;

Priscila Teixeira, que me deixou dicas e sugestões inestimáveis nos experimentos de proteômica, sempre foi uma amiga prestativa e uma cientista perspicaz;

Minhas colegas de bancada, em uma infinidade de experimentos, Aline S. Bossa, Fernanda Bruni, Isabela Navarro e Monique Baron;

Meus amigos, Rafael R. de Almeida e Vinícius C. Santana, pelas críticas sempre muito bem pontuadas, pela amizade e pelas sugestões;

Minhas amigas Andréia Kuramoto e Eliane Mairena, pelo suporte e dedicação incondicionais ao trabalho e ao grupo;

Minhas amigas Luciana Nogueira e Maria Carolina Luque, com quem tive conversas sempre muito produtivas e agradáveis, pelo auxílio nos experimentos, principalmente na microscopia confocal;

Amanda F. Frade, sempre minha amiga, sempre disposta a ajudar;

Minhas amigas Vanessa Alves e Andrezza França, pela amizade sincera e pelas discussões sobre nossos trabalhos;

Todos os amigos do LIM-60, de quem não me atrevo a dizer os nomes por receio de esquecer algum;

Os colegas do projeto Imunologia nas Escolas, que me acompanharam e acompanham em outro braço desse desafio: o de levar ciência aos jovens;

Os colegas do Laboratório de Biologia Vascular, em especial ao Leo e ao Vitor, por dividirem tão generosamente seus conhecimentos, e por estarem sempre dispostos a ajudar;

Lea Demarchi, pela inestimável ajuda com a interpretação dos experimentos de imunohistoquímica e histologia, e pelas discussões sobre aspectos clínicos e anatomopatológicos da Doença Reumática Cardíaca;

O grupo do Laboratório de Toxinologia da UNESP de Rio Claro, em especial ao prof. Dr. Mario Palma, com quem aprendi muito sobre proteômica e espectrometria de massas;

Adriana Paes Leme, Romênia R. Domingues e todo o pessoal do LNBio, que me auxiliaram incondicional e muito gentilmente no uso do espectrômetro de massas e nas identificações das proteínas;

Nilsa R. Damasceno-Rodrigues do Laboratório de Biologia Celular (Depto. Patologia-FMUSP), que me ajudou a realizar os cortes para microscopia e Angela Basan, que me auxiliou com os experimentos de imunohistoquímica;

Os médicos do grupo de cirurgia valvular do InCor: Dr. Pablo Pommerantzeff, Dr. Carlos Manuel Brandão e Dr. Roney Sampaio pelos valiosos fragmentos de valva mitral para este estudo, cedidos gentilmente;

O pessoal do setor administrativo, Jair Muro, Sonia Romero, Gisele Fekete, e ao Marcos, pelo suporte nas questões burocráticas e pela presteza em ajudar;

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe Vanicy, ao Darcy e ao meu avô Nico, que me deram suporte e ombro nos momentos mais difíceis desta jornada;

Agradeço à minha avó Wanda (in memorian), que acompanhou o início desta minha trajetória e está olhando lá de cima o resultado do meu esforço;

Agradeço ao meu irmão Leonardo, pelo exemplo de cientista que é e por tudo o que representa para mim, pelas conversas e pelo ombro amigo, principalmente;

Agradeço à minha esposa e companheira, Léia, por manter-se firme ao meu lado mesmo quando as coisas não iam tão bem...

“Aonde quer que vá, vá de todo o coração.”

(Confúcio)

***“A descoberta consiste em ver o que todos viram e em pensar no
que ninguém pensou.”***

(Albert Szent-Györgyi)

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO:	1
1.1. A estrutura das valvas mitral e aórtica	1
1.2. Febre Reumática e Doença Reumática Cardíaca	5
1.2.1. Patofisiologia	6
1.2.2. Streptococcus pyogenes	8
1.2.3. Epidemiologia	9
1.2.4. Suscetibilidade genética	11
1.2.5. Mecanismos de autoimunidade	12
1.2.6. Diagnóstico	16
1.2.7. Tratamento	17
1.3. Degeneração mixomatosa	19
1.4. Métodos Proteômicos	21
1.5. Proteoma do tecido valvar	27
2. OBJETIVOS:	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29

3. MÉTODOS:	31
3.1. Delineamento experimental.....	31
3.2. Obtenção das amostras	32
3.3. Cortes histológicos	34
3.3.1. Coloração por Hematoxilina-eosina (HE)	35
3.4. Preparo do extrato proteico e eliminação de interferentes	35
3.5. Eletroforese unidimensional	38
3.6. Eletroforese bidimensional – DIGE	39
3.7. Eletroforese bidimensional – preparativo	43
3.8. Análise das diferenças de expressão proteica	44
3.9. Digestão ingel e extração dos peptídeos	45
3.10. Identificação das proteínas por Espectrometria de Massas.....	48
3.11. Análise dos resultados obtidos por espectrometria de massas	48
3.12. Análise das alterações funcionais observadas	49
3.13. Western Blotting.....	50
3.14. Imunohistoquímica (IHQ)	51
3.15. Microscopia confocal	53
3.16. Análise Estatística.....	54
4. RESULTADOS:	55
4.1. Análise histológica.....	55
4.2. Extração proteica em valva mitral humana	57

4.3.	Análise do padrão eletroforético das proteínas de valva mitral	58
4.3.1.	Separação de proteínas por eletroforese bidimensional	59
4.3.2.	Gel bidimensional de valva mitral marcado por DIGE.....	60
4.4.	Identificação global das proteínas de valva mitral humana	60
4.5.	Análise da expressão diferencial das proteínas por DIGE	62
4.5.1.	Agrupamento das variações de expressão	62
4.5.2.	Análise de agrupamento hierárquico.....	66
4.5.3.	Análise de componente principal (PCA).....	69
4.5.4.	Funções Biológicas Alteradas	70
4.6.	Validação dos Resultados de expressão diferencial	76
4.6.1.	Vimentina	77
4.6.2.	Colágeno do tipo-VI	79
4.6.3.	Vitronectina	81
4.6.4.	Lumican	81
4.7.	Imunohistoquímica	82
4.7.1.	Vimentina	83
4.7.2.	Colágeno tipo-VI	84
4.7.3.	Lumican	85
4.8.	Colocalização de colágeno do tipo-VI e lumican.....	85
4.9.	Alterações das vias funcionais nas doenças valvares.....	87
5.	DISCUSSÃO	95

6. CONCLUSÕES	121
7. ANEXOS:	123
7.1. Soluções utilizadas.....	123
7.2. Teste de marcação para os fluoróforos.....	133
7.3. Identificação global das proteínas de valva mitral.....	135
8. REFERÊNCIAS	141

Lista de abreviaturas

1-DE	Eletroforese Unidimensional
2-DE	Eletroforese Bidimensional
ACN	Acetonitrila
BSA	Albumina de soro bovino (do Inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CID	Dissociação induzida por colisão (do inglês, <i>Collision-Induced Dissociation</i>)
CTL	Grupo Controle
Cy2, Cy3 e Cy5	Fluoróforos para experimentos de expressão diferencial em gel
DIGE	Expressão diferencial em gel (do inglês, <i>Differential InGel Expression</i>)
DMX	Grupo Degeneração Mixomatosa
DRC	Grupo Doença Reumática Cardíaca
DRC-EST	Grupo Doença Reumática Cardíaca com Estenose Valvar
DRC-INS	Grupo Doença Reumática Cardíaca com Insuficiência Valvar
ESI-qToF	Eletrospray acoplado a detecção de íons por tempo de voo
FR	Febre Reumática
GFAP	Protein ácida de fibra da glia (do ingles, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
HE	Hematoxilina Eosina (coloração)
IEF	Isoeletrofocalização

IHQ	Imunohistoquímica
IPG	Gradiente de focalização isoeletrica
kDa	kilo Dalton
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas ionização por spray de elétrons com fragmentação dos íons
MPT	Modificações Pós Traducionais
m/z	Relação massa/carga
PBS	Tampão salino fosfato (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCA	Análise de componente principal (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>)
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecilssulfato de sódio
TBS	Tampão salino com tris (do inglês, <i>Tris Buffered Saline</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético (do inglês, <i>TriFluoroacetic Acid</i>)
VEC	Célula endotelial valvular (do inglês, <i>valvular endothelial cell</i>)
VIC	Célula intersticial valvular (do inglês <i>valvular interstitial cell</i>)

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação da estrutura da valva mitral.....	2
Figura 2 - Fluxograma de trabalho.....	30
Figura 3 - Distribuição das idades entre os grupos.....	32
Figura 4 - Análise histológica das biópsias utilizadas no estudo.....	56
Figura 5 - Avaliação do rendimento da extração proteica em relação aos grupos.....	57
Figura 6 - Análise eletroforética das proteínas de valva mitral humana e suína.....	68
Figura 7 - Perfil eletroforético bidimensional em valva mitral humana após padronização da extração de proteínas.....	59
Figura 8 - Marcação das proteínas por DIGE em valva mitral humana.....	60
Figura 9 - Perfil eletroforético global de valva mitral humana.....	61
Figura 10 - Diagrama de Venn para os <i>spots</i> diferenciais	64
Figura 11 - Agrupamento hierárquico, de acordo com a expressão proteica diferencial.....	68
Figura 12 - Representação da distribuição por PCA segundo o grupo.....	70
Figura 13 - Imagem representativa das membranas de <i>Western Blotting</i>	76
Figura 14 - Avaliação da expressão diferencial das bandas mais leves de Vimentina na DRC.....	78
Figura 15 - Representação do MASCOT para os peptídeos identificados no spot 1697, referentes a VIME_HUMAN.....	79

Figura 16 - Comparação da expressão de Colágeno do tipo VI nos grupos estudados.....	80
Figura 17 - Comparação da expressão de Vitronectina nos grupos estudados.....	81
Figura 18 - Expressão de Lumican nos grupos estudados.....	82
Figura 19 - Localização de vimentina em tecido valvar cardíaco.....	83
Figura 20 - Localização de colágeno do tipo-VI em tecido valvar cardíaco.....	84
Figura 21 - Localização de lumican em tecido valvar cardíaco.....	85
Figura 22 - Colocalização de colágeno tipo-VI e lumican.....	86
Figura 23a - Representação gráfica da rede de interações entre as proteínas diferenciais na doença reumática cardíaca (portadores de insuficiência e de estenose).....	91
Figura 23b - Representação gráfica da rede de interações entre as proteínas diferenciais na doença reumática cardíaca com insuficiência mitral exclusivamente.....	92
Figura 23c - Representação gráfica da rede de interações entre as proteínas diferenciais na doença reumática cardíaca com estenose mitral exclusivamente.....	93
Figura 23d - Representação gráfica da rede de interações entre as proteínas diferenciais na degeneração mixomatosa exclusivamente.....	94
 Figura 1 suplementar - Marcação das proteínas extraídas de valva mitral humana (Cy2, Cy3 e Cy5).....	 134

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Critérios de Jones.....	16
Tabela 2 - Identificação dos sujeitos da pesquisa e massa da biópsia utilizada.....	34
Tabela 3 - Desenho dos géis analíticos para análise por DIGE.....	39
Tabela 4 - Protocolo de isoeletrofocalização para as fitas de 24 cm.....	39
Tabela 5 - Parâmetros para busca das identificações por MS/MS.....	47
Tabela 6 - Parâmetros de diluição dos anticorpos para Western Blotting	49
Tabela 7 - Parâmetros de diluição dos anticorpos para imunohistoquímica.....	50
Tabela 8 - Alterações de expressão proteica observadas no grupo DRC <i>versus</i> os grupos CTL e DMX	66
Tabela 9a - “spots” com expressão diferencial exclusiva na DRC-INS.....	72
Tabela 9b - “spots” com expressão diferencial exclusiva na DRC-EST...	73
Tabela 9c - “spots” com expressão diferencial exclusiva na DMX.....	74
Tabela 9d - “spots” com expressão diferencial compartilhada por mais de um grupo.....	75
 Tabela 1 suplementar - Identificação global das proteínas identificadas em valva mitral.....	 135

Resumo

Martins CO. *Análise proteômica diferencial em válvula mitral na doença reumática cardíaca* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 166p

A Doença Reumática Cardíaca (DRC) é uma séria complicação de orofaringite causada por determinados sorotipos de *Streptococcus pyogenes* não tratada adequadamente em indivíduos suscetíveis. É um grande problema de saúde pública, principalmente nos países não desenvolvidos e em desenvolvimento, como Brasil, Índia, países da África, regiões de população aborígine da Austrália, e Egito. É altamente debilitante e com alta taxa de mortalidade devido ao comprometimento cardíaco. As lesões miocárdicas iniciais regredem, mas as lesões valvares, principalmente a mitral e a aórtica, são irreversíveis e progressivas. Muitos estudos já caracterizaram a resposta imune celular (linfócitos T) e humoral nos indivíduos acometidos pela doença. Mimetismo molecular e espalhamento de epítipo são os principais mecanismos que se pensa estar envolvidos na patogênese da DRC. Avaliamos, nesta pesquisa, o perfil de expressão proteica em valvas mitrais de indivíduos acometidos por DRC. Para detectar alterações específicas desta doença, comparamos as expressões de proteínas nos grupos portadores de DRC com insuficiência (DRC-INS) e com estenose (DRC-EST) a um grupo de indivíduos com degeneração mixomatosa de valva mitral (DMX) e outro sem valvulopatias (CTL). Alterações especificamente observadas em tecido mitral na DRC-INS ou DRC-EST em fases avançadas da doença podem explicar o mecanismo de desenvolvimento desses dois tipos de lesão. Foram encontradas 25 “spots”, correspondendo a 29 proteínas diferencialmente expressas nos grupos com valvulopatias, refletindo principalmente alterações na matriz extracelular. Encontramos importante clivagem diferencial da vimentina, cuja proteína íntegra possui 54 kDa, formando fragmentos com ~40 e ~45 kDa, aumentados na DRC, principalmente na DRC-INS. O colágeno do tipo VI, com aproximadamente 95 kDa, encontrou-se com expressão diminuída exclusivamente no grupo DRC-INS. A Vitronectina foi encontrada aumentada em na DMX e na DRC-EST, em relação ao grupo controle, principalmente na DRC-EST. Lumican, por sua vez, teve expressão diminuída na DMX e na DRC-EST, apesar de possuir um único “spot” com expressão aumentada na DRC. Utilizando métodos de análise de padrões de expressão protéica *in silico* foram identificados conjuntos de proteínas capazes de discriminar as amostras de valva mitral por etiologia da doença. O presente trabalho pode auxiliar na elucidação dos mecanismos de desenvolvimento da doença e de alterações estruturais do tecido mitral em resposta às lesões autoimunes, bem como no diagnóstico da DRC.

Descritores: 1. Cardiopatia reumática; 2. Doenças das válvulas cardíacas; 3. Degeneração mixomatosa; 4. Autoimunidade; 5. Matriz extracelular; 6. Humanos; 7. Proteômica; 8. Eletroforese em gel diferencial bidimensional.

Summary

Martins CO. *Differential proteomic analysis in mitral valves in rheumatic heart disease*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013. 166p

Rheumatic Heart Disease (RHD) is a serious complication of oropharyngitis caused by some serotypes of *Streptococcus pyogenes* not properly treated in susceptible individuals. It is a public health concern, mainly for undeveloped and developing countries, such as Brazil, India, some countries in Africa, aboriginal regions in Australia, and Egypt. It is highly debilitating with a high mortality rate due to cardiac commitment. Initial myocardial lesions disappear, but valvar lesions, mainly mitral and aortic, are irreversible and progressive. Many studies have characterized cellular (T lymphocytes) and humoral responses in individuals affected by the disease. Molecular mimicry and epitope spreading are the main mechanisms thought to be involved in the pathogenesis of RHD. We evaluated, in this research, the profile of protein expression in mitral valves from individuals affected by RHD. To detect alterations specific of this disease, we compared protein expression in the group of RHD with regurgitation (RHD-RGT) and stenosis (RHD-STN) to a group of individuals with mitral valve myxomatous degeneration (MXD) and another group without valvulopathies (CTL). Alterations specifically observed in the mitral tissue of RHD-RGT and RHD-STN in advanced stages of the disease can explain the mechanism of development for these two kinds of lesions. Twenty-five spots, corresponding to 29 proteins were found to be differentially expressed in the valvulopathy groups, reflecting mainly alterations in extracellular matrix. We found important differential cleavage of vimentin, the whole protein having 54 kDa, in fragments with ~40 and ~45 kDa, increased in RHD, mainly in RHD-RGT. Collagen type-VI, with approximately 95 kDa, was found to have decreased expression exclusively in the RHD-RGT group. Increased expression of Vitronectin was detected in DMX and RHD-EST groups, compared to the CTL group, mainly in the RHD-STN. Lumican, in turn, had decreased expression in the MXD and RHD-STN groups. By using *in silico* methods for analysis of patterns of protein expression, we identified sets of proteins capable of discriminating mitral valve samples by disease etiology. The present study might help elucidating the mechanisms of disease development and structural alterations in the mitral tissue in response to the autoimmune lesions, as well as in the diagnosis of RHD.

Descriptors: 1.Rheumatic Heart Disease; 2.Heart valve diseases; 3.Myxomatous degeneration; 4.Autoimmunity; 5.Extracellular matrix; 6.Humans; 7.Proteomics; 8.Two-dimensional difference gel electrophoresis.

1. INTRODUÇÃO

Valvopatias são doenças do tecido valvar que podem acometer uma ou mais das valvas cardíacas (mitral, aórtica e tricúspide). Do ponto de vista clínico, as que acometem a valva mitral têm maior relevância, devido a sua característica anatômica durante o bombeamento de sangue pelo ventrículo esquerdo para a grande circulação. São de etiologias diversas, mas todas cursam com desorganização da matriz do tecido valvar, com prolapso ou estenose de seus folhetos.

Neste trabalho, estudamos a expressão proteica como ferramenta para avaliação das anomalias decorrentes da doença reumática cardíaca (DRC) comparada a degeneração mixomatosa, em relação à expressão de proteínas na valva hígida.

1.1. *A estrutura das valvas mitral e aórtica*

A valva mitral é um tecido laminar, avascular, rico em matriz extracelular, cujas proteínas são secretadas por células intersticiais valvares, com fibroblastos, e recoberto em ambas as faces por células endoteliais. É composta por tecido conjuntivo, com função de coordenar o sentido do fluxo sanguíneo durante o ciclo cardíaco, sendo derivada do miocárdio ⁽¹⁾. A Figura 1, derivada de Orton et al ⁽²⁾, é uma representação esquemática da estrutura das valvas mitral e aórtica, com seus principais componentes e mostra a direção do fluxo sanguíneo.

2 INTRODUÇÃO

Em corte transversal do tecido valvar, observa-se 3 camadas: **a)** superior, que é composta basicamente por células intersticiais, células de músculo liso e elastina; **b)** esponjosa é composta majoritariamente por proteoglicanos e glicosaminoglicanos; **c)** camada fibrosa, rica em colágeno do tipo I e elastina ⁽²⁾, conforme Figura 1a.

Figura 1: Representação da estrutura da valva mitral. a) Representação esquemática (Adaptado de Orton et al, 2012 ⁽³⁾): são evidenciadas as três camadas valvares, com seus componentes principais e a direção do fluxo sanguíneo; **b)** Microfotografia de valva mitral suína, HE, 200x, com a identificação das três camadas, coloração por hematoxilina-eosina

A camada atrial está em contato com o átrio cardíaco, e recebe o fluxo sanguíneo, sendo bastante elástica. A camada esponjosa ocupa a maior espessura da valva, sendo responsável pela distribuição da arquitetura valvar. A camada fibrosa é responsável por evitar o refluxo sanguíneo, possuindo bastante resistência.

A matriz extracelular das valvas mitrais cardíacas é estratificada em camadas ricas em elastina, proteoglicanos e colágenos que conferem propriedades físicas e biomecânicas distintas aos folhetos e estruturas de suporte ⁽⁴⁾.

Tecidos cuja função é estrutural normalmente são ricos em elementos de matriz extracelular, majoritariamente constituída por camadas de colágenos, laminina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Sua composição varia de acordo com o tecido, sendo que poucos estudos são voltados à análise da composição da valva mitral humana ^(5, 6), uma vez que o objetivo normalmente é entender sua composição para a produção de valvas artificiais mais parecidas com o tecido humano.

A ativação de algumas vias de sinalização é muito importante tanto para a valvulogênese quanto na doença valvar. Apesar de modelos animais terem ajudado a elucidar os mecanismos que levam à doença valvar, estes modelos ainda não são completos, com diferenças importantes em muitas situações. Para a DRC, objeto do presente estudo, ainda não existe nenhum modelo animal que possa reproduzir fidedignamente as alterações observadas.

4 INTRODUÇÃO

Malformações valvares congênitas e doenças valvares são caracterizadas por desregulação da matriz, levando a remodelamento, perda da organização celular e quase sempre por calcificação ⁽¹⁾.

A valva mitral é composta por dois folhetos: o anterior e o posterior. As cordas tendinosas (*chordae tendineae*) são contíguas à face livre dos folhetos e se ligam a dois músculos papilares cada. A espessura das valvas geralmente não ultrapassa 1 mm ⁽³⁾.

Os tipos celulares característicos das valvas cardíacas são as VECs (células endoteliais valvares) e as VICs (células intersticiais valvares) ⁽¹⁾, anteriormente chamadas de fibroblastos valvares. As VECs são basicamente células endoteliais que recobrem ambos os folhetos valvares. Sua senescência está envolvida com degeneração de valva aórtica ⁽⁷⁾, principalmente a senescência de progenitores destas células. As VICs são células mais homogeneamente distribuídas no tecido, por todo seu estroma. Possuem algumas características de fibroblastos, e podem ser ativadas em determinadas doenças, dando origem a células descritas anteriormente como miofibroblastos ⁽³⁾. Atualmente, são descritas como células intersticiais valvares ativadas (aVICs). Elas são responsáveis pela manutenção da homeostase do tecido valvar, secretando e degradando proteínas extracelulares, atuando como imunorreguladoras, e no reparo e remodelamento de lesões do tecido valvar ^(5, 8). Entretanto, seu estudo é dificultado porque este tipo celular perde as características após algumas passagens em meio de cultura.

1.2. Febre Reumática e Doença Reumática Cardíaca

A febre reumática é uma doença autoimune desencadeada por mimetismo molecular e se desenvolve após infecção de orofaringe causada pelo *Streptococcus pyogenes* ⁽⁹⁾, que afeta 3-4% das crianças não-tratadas adequadamente. A primeira descrição relacionando infecção prévia por estreptococos do grupo A e o desenvolvimento de manifestações reumáticas foi publicada em 1931 ⁽¹⁰⁾. Caracteriza-se por um quadro febril seguido de dores articulares após infecção pelo *Streptococcus pyogenes*.

Doença reumática cardíaca é a complicação mais grave e debilitante, desenvolvendo-se aproximadamente em 4 a 8 semanas - ou até mais tardiamente – após a infecção em aproximadamente 30% dos indivíduos com febre reumática, decorrente de mecanismos autoimunes celulares e humorais, com reconhecimento de proteínas principalmente do tecido cardíaco estão envolvidos ⁽¹¹⁾, com a produção de citocinas inflamatórias ⁽¹²⁾, com acometimento do pericárdio, miocárdio e endocárdio ⁽¹³⁾. A pericardite e a miocardite curam em aproximadamente um mês, porém, a endocardite promove lesão das valvas, principalmente mitral e aórtica, evoluindo para insuficiência cardíaca. A cardite é caracterizada por infiltração de células mononucleares, vasculite e alterações degenerativas do tecido conjuntivo ⁽¹⁴⁾.

Outros acometimentos pós-estreptocócicos podem ser a poliartrite migratória, que ocorre em cerca de 90% dos casos sintomáticos, e é caracterizada por dores articulares; Coreia de Sydenham, que afeta o sistema nervoso central, causando movimentos involuntários de braços e pernas (possivelmente pelo reconhecimento cruzado de regiões da tubulina) ⁽¹⁵⁾; eritema *marginatum*, caracterizado por manchas avermelhadas difusas na pele

(exantema), nódulos subcutâneos, na forma de saliências disformes na pele. A cepa causadora da infecção é bastante determinante no desenvolvimento destas manifestações, bem como a resposta imune do indivíduo afetado.

As valvas cardíacas, principalmente a mitral, são os principais tecidos afetados na DRC, na qual ocorre encurtamento das cordas tendinosas e formação de vegetações na extremidade livre das valvas, com calcificações e fibrose irreversíveis.

1.2.1. Patofisiologia

O nódulo de Aschoff é o achado histológico patognomônico da doença e está presente em 30 a 40% das biópsias, evoluindo em três fases distintas: exsudativa, proliferativa e cicatricial ⁽¹⁶⁾. A fase exsudativa caracteriza-se pela presença de edema, exsudação, degeneração e fragmentação das fibras colágenas, é mediada por células mononucleares e polimorfonucleares e há a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α . Na fase proliferativa, a lesão é constituída por monócitos, macrófagos e linfócitos, predominantemente células T CD4⁺, e há secreção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-2 ⁽¹⁷⁾. A fase final do nódulo de Aschoff é de natureza cicatricial e apresenta fibrose e hialinização ⁽¹⁶⁾.

A inflamação leva a neovascularização, que aumenta o aporte de linfócitos ao local de lesão, levando à inflamação granulomatosa e ao estabelecimento da doença crônica. Episódios repetidos de agudização da febre reumática causam dano inflamatório e formação de cicatrizes nas valvas

cardíacas. O objetivo da profilaxia com penicilina é reduzir a recorrência de exposição aos antígenos estreptocócicos ⁽¹⁸⁾.

O desenvolvimento das reações autoimunes é subdividido em quatro fases distintas e consecutivas: **1)** faringite estreptocócica, **2)** degradação do estreptococo com identificação e processamento dos antígenos, **3)** febre reumática aguda, **4)** doença reumática cardíaca crônica ⁽¹⁸⁾. As duas últimas etapas são decorrentes do desenvolvimento de resposta imune mediada por anticorpos e resposta celular. Entretanto, pacientes com incompetência mitral podem permanecer assintomáticos por até 10 anos, devido a mecanismos compensatórios de dilatação atrial e ventricular esquerda antes do início da disfunção sistólica ventricular esquerda ⁽¹⁹⁾. A fibrose desenvolve-se mais tardiamente, como resultado de valvulite persistente ou recorrente ⁽²⁰⁾.

A gravidade da cardite parece estar intimamente relacionada com a idade de início dos sintomas: quanto mais precoce, pior o prognóstico ⁽²¹⁾. Os mecanismos que levam a lesão cardíaca ainda não são bem compreendidos, mas uma tríade parece ser bastante importante no desencadeamento da doença: predisposição genética do paciente, antígenos bacterianos, principalmente a região N-terminal da proteína M e uma resposta imune com aumento da expressão de moléculas inflamatórias (quimiocinas, integrinas, citocinas) ^(22, 23).

Na proteína M5, a região imunodominante está localizada entre os aminoácidos 81-103, sendo reconhecida por clones de linfócitos T intralesionais e periféricos. Esses linfócitos produzem TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-4. Um número reduzido de linfócitos infiltrantes nas valvas são capazes de produzir IL-4, ao contrário do miocárdio, sugerindo que o baixo número de células com

capacidade para regular a inflamação seja responsável pela manutenção e progressão das lesões valvares ⁽²⁴⁾. Entretanto, há infiltrado de linfócitos T em valvas aórticas com calcificações não-reumáticas, tanto nas valvas bicúspides quanto tricúspides .

A DRC pode se manifestar por dois tipos de lesão valvar distintos:

- 1) Insuficiência valvar, na qual ocorre perda da manutenção da tensão dos folhetos, resultando em dificuldades do fechamento da valva mitral por regurgitação;
- 2) Estenose valvar, na qual acontece rigidez excessiva dos folhetos valvares, dificultando a abertura dos dois folhetos mitrais e, por consequência, diminuindo o fluxo sanguíneo no coração.

1.2.2. ***Streptococcus pyogenes***

O *Streptococcus pyogenes* (estreptococo do grupo A de Lancefield) é uma bactéria Gram-positiva que causa algumas das infecções mais comuns em humanos ⁽²⁵⁾, como faringite, pioderma, impetigo, síndrome do choque tóxico, fascite necrotizante, além de febre puerperal. O fator de virulência bacteriano mais estudado é a proteína M, com grande variabilidade antigênica, que tem entre suas funções a inibição da fagocitose, devido à ligação da porção variável N-terminal à proteína inibidora de ligação da porção C4b do complemento e porção Fc do IgA.

Os estreptococos também possuem moléculas de superfície e secretadas que atuam como exotoxinas, como é o caso da família Spe (SpeA, SpeB e SpeC), que podem atuar como cisteína proteases e aumentar a adesão

ao epitélio ⁽²⁶⁾. As moléculas SpeB e EndoS também clivam imunoglobulina do tipo G (IgG) ⁽²⁷⁾, diminuindo a opsonização das bactérias ⁽²⁸⁾.

1.2.3. *Epidemiologia*

O *S. pyogenes* está envolvido em 15 a 30 % dos casos de faringite aguda em crianças ⁽²⁹⁾ e em 10 % dos casos em adultos ⁽³⁰⁾. Infecções invasivas por *S. pyogenes* somam cerca de 10.000 casos por ano nos Estados Unidos, com cerca de 1.350 mortes ⁽³¹⁾. Globalmente, são cerca de 663.000 novos casos por ano, com cerca de 163.000 mortes ⁽³²⁾; entretanto, dados epidemiológicos de países em desenvolvimento são muito raros para a maioria das doenças, e podem estar subestimados ⁽³³⁾.

Febre reumática e doença reumática cardíaca têm um impacto socioeconômico importante no Brasil, sendo estimados em 1,3% do total da renda familiar. O custo estimado é de US\$ 51.144.347,00. As valvulopatias mais prevalentes são: insuficiência mitral (9,2%), estenose mitral (45,1%) ⁽³⁴⁾ – segundo dados de 2001. No Brasil, em 2003, a incidência era de 3% entre as crianças e adolescentes, sendo responsável por cerca de 40% das cirurgias cardíacas no país ⁽³⁵⁾.

A taxa de recorrência de episódios de agudização de febre reumática entre crianças e adolescentes no Brasil é de 20% ⁽³⁶⁾, revelando a necessidade de melhores políticas de prevenção e tratamento. Outras regiões de alta prevalência de febre reumática são: Austrália ⁽³⁷⁾, Nova Zelândia ⁽³⁸⁾, Havaí ⁽³⁹⁾ e Índia, com 0,5 a 11 casos a cada 1000 crianças ⁽⁴⁰⁾.

Em 2005, foram relatados 15,6 milhões de casos no mundo, sendo que 80% estão nos países em desenvolvimento. O pico de prevalência de doença reumática cardíaca é entre os 20 a 40 anos; sendo que crianças em idade escolar representam 20% dos casos ⁽³³⁾. Estudos com ecocardiografia são entre 10 e 13 vezes mais sensíveis para detectar doença reumática cardíaca do que os testes mais simples de auscultação. Entretanto, há algum debate sobre a validade desse teste na detecção de alterações cardíacas leves ^(41, 42) e sobre a possibilidade de seu uso em larga escala para triagem populacional.

Em países desenvolvidos, como a Austrália, em que certas populações aborígenes apresentam alta prevalência de febre reumática ⁽³⁷⁾, o subdiagnóstico de febre reumática (avalia 3 casos, de 2003 a 2007), em que, à suspeita inicial incorreta de artrite séptica foi constatado posteriormente – por ecocardiografia - serem casos já estabelecidos de moderados a graves de doença reumática cardíaca ⁽⁴³⁾ ainda é um problema.

Nas últimas décadas, apesar de haver um rápido declínio de doença reumática cardíaca nos países industrializados, os países em desenvolvimento têm observado crescimento na notificação desses casos. Estudos epidemiológicos, por ecocardiografia, revelam que a prevalência deles é subestimada nesses países. São necessárias estratégias preventivas primárias: tratamento da orofaringite e o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Estima-se que, nos países em desenvolvimento, surjam 200.000 novos casos/ano e cerca de 180.000 mortes ⁽²⁰⁾. Entretanto, há relatos de aumento de casos de febre reumática em uma área bastante urbanizada, em Trieste na

Itália. Estes ressurgimentos estão relacionados com o aparecimento focal de cepas reumatogênicas de *S. pyogenes*, mostrando que esta é uma doença que ainda não desapareceu nos países industrializados e merece atenção constante (44).

1.2.4. **Suscetibilidade genética**

Há vários mecanismos de suscetibilidade genética descritos para a patogênese da DRC. O mais importante talvez seja o sistema HLA (do inglês, Antígeno Leucocitário Humano). O aumento na expressão de moléculas HLA-DR em fibroblastos de valva cardíaca em indivíduos com cardite reumática ativa, demonstrado por imunofluorescência e imunohistoquímica em tecido miocárdico e valvar levou à hipótese de correlacionamento entre infecção prévia por *Streptococcus pyogenes* e o desenvolvimento de lesões autoimunes ⁽⁴⁵⁾. Outro estudo mostrou que linfócitos B provenientes de indivíduos com doença reumática cardíaca apresentavam citotoxicidade quando colocados em contato com anticorpos de coelhos imunizados com antígeno de parede bacteriana do estreptococo. A citotoxicidade foi muito maior com linfócitos B que possuíam o HLA-DR4 ⁽⁴⁶⁾. Analisando células humanas provenientes de uma população brasileira de 40 indivíduos com febre reumática foi observada importante associação entre antígenos de classe II do HLA com desenvolvimento de febre reumática e doença reumática cardíaca. O HLA-DRw53 estava presente em 72,9% dos pacientes e o HLA-DR7 em 57,5% dos indivíduos ⁽⁴⁷⁾. Em 1994, um estudo de cossegregação analisou a hipótese de gene de susceptibilidade à febre reumática no complexo HLA ou muito perto dele. Foram analisados 66

indivíduos saudáveis e 51 com febre reumática ⁽⁴⁸⁾. Hoje sabemos que vários antígenos leucocitários humanos estão associados com a doença. Entre eles, o HLA-DR7 é predominantemente observado em diferentes etnias e está associado com o desenvolvimento de lesões valvares, como demonstram estudos epidemiológicos ⁽⁴⁹⁾.

Um polimorfismo no gene do antagonista do receptor de IL-1 (genótipo A1/A1), na região de pares de bases 86 com repetição em tandem no segundo intron do IL1RN, está relacionado com menor gravidade da doença, em análise de população brasileira ⁽⁵⁰⁾.

Um estudo relacionando o reconhecimento de peptídeos da proteína M5 com os alelos de antígenos leucocitários humanos comprovou que a região imunodominante da M5 (81-96) causou aumento no reconhecimento e proliferação de linfócitos T periféricos e intralesionais em pacientes HLA-DR7⁺ e DR53⁺ ⁽⁵¹⁾.

É também descrito o aparecimento de endocardite espontânea em camundongos com TCR transgênico para reconhecimento de glicose-6-fosfato isomerase. Esses animais também desenvolvem artrite, sendo que o dano valvar foi considerado dependente de FcRγ, e não de C5 ⁽⁵²⁾.

1.2.5. Mecanismos de autoimunidade

O mimetismo molecular pode estar envolvido em algumas doenças autoimunes. Alguns pontos são de relevância no estudo do mecanismo que leva a quebra de tolerância: primeiro, é difícil distinguir se a resposta imune

leva a destruição tecidual, ou se é uma resposta contra o hospedeiro; segundo, predisposição genética deve estar envolvida no mimetismo, porque a apresentação do autoantígeno é dependente de sua ligação ao HLA; terceiro, com ou sem mecanismos de autoimunidade, o hospedeiro deve ter um conjunto de linfócitos autorreativos. Sinalização por receptores de reconhecimento de patógenos (PRR) e perda de sinais regulatórios pode estar envolvida ⁽⁵³⁾.

Reconhecimento cruzado entre regiões da proteína M5 e de peptídeos da miosina cardíaca (principalmente da cadeia leve da meromiosina) é proposto como responsável por mimetismo molecular que leva ao recrutamento de linfócitos T às lesões cardíacas ⁽⁵⁴⁾ e desencadeamento de autoimunidade, com posterior degeneração de reconhecimento. Observou-se o mesmo fenômeno com proteínas derivadas de valva mitral ⁽⁵⁴⁾. Quanto maior a gravidade da lesão autoimune, maior a frequência de reconhecimento desses peptídeos ⁽⁵¹⁾ por populações de linfócitos T infiltrantes.

Outra proteína alvo de anticorpos de reação cruzada é a exotoxina SpeB, cujos anticorpos são reativos a células do endotélio ⁽⁵⁵⁾. Estes anticorpos também reagem contra N-acetil-b-D-glucosamina.

No coração de indivíduos com doença reumática cardíaca, anticorpos anti-laminina e anti-miosina cardíaca, que são produzidos provavelmente por mimetismo molecular com proteínas do estreptococo, levam ao aumento da expressão de VCAM-1, produzindo inflamação, aumento do recrutamento de células T CD4⁺ (cerca de 80% das células infiltrantes) que por períodos prolongados causam reparação cicatricial das valvas ^(18, 56). Anteriormente,

polimorfismos nos genes da laminina demonstraram associação com o desencadeamento de algumas doenças, como cardiomiopatia dilatada, distrofia de Emery-Dreyfuss e lipodistrofia de Dunningans ⁽⁵⁷⁾. É possível que alterações nesta proteína levem a um aumento de sua antigenicidade.

Linfócitos T infiltrantes do coração produtores de um perfil Th1 levam a lesão cardíaca. Insuficiência de células produtoras de IL-4 no tecido valvar contribui para a manutenção e progressão das lesões ⁽²⁴⁾. Tanto a resposta humoral, quanto a celular, (linfócitos T-CD4⁺) podem estar envolvidas no desenvolvimento da doença. Mimetismo molecular entre algum antígeno bacteriano e tecido valvar parece desencadear o reconhecimento cruzado ⁽⁵⁸⁾. Este reconhecimento foi estudado em proteínas de alfa-hélice cardíacas, como laminina, vimentina e miosina. As proteínas estreptocócicas, candidatas ao reconhecimento cruzado, parecem ser a proteína M e n-acetil-glucosaminos da parede bacteriana ⁽⁵⁹⁾.

Outros alvos antigênicos foram encontrados utilizando análise de transcritos de uma biblioteca de cDNA de cardiomiócitos em *E. coli*, sendo observada reação positiva contra soros de indivíduos com febre reumática e acometimento cardíaco, sem resposta para soro de controles com estreptococias recorrentes, ou sem alterações para 8 proteínas, por ELISA ⁽⁶⁰⁾: cadeia pesada de IgG, cadeia 6-leve da miosina, VDRIP ⁽⁶¹⁾, ZnF658, SMC2L1, alfa-catenina ^(62, 63) (essencial para o desenvolvimento valvar, regulando a cascata apoptótica), nexilina, e uma proteína chamada NUANCE, com 798 kDa.

Em experimento por Western Blotting a partir de eletroforese bidimensional de proteínas miocárdicas, foram identificadas 2 enzimas mitocondriais e creatinofosfoquinase como alvo de autoanticorpos em soros de 56 indivíduos com febre reumática e cardite ⁽⁶⁴⁾.

Os títulos de anticorpos dirigidos à porção C-terminal da proteína M e à miosina estão relacionados com a exposição a estreptococos em áreas endêmicas, sem correlação com desenvolvimento de autoimunidade ^(65, 66). A alta prevalência de anticorpos anti-estreptococos em população de região endêmica reflete a alta taxa de infecção por cepas não-reumatogênicas ⁽⁶⁷⁾. Anticorpos anti-SPE B (exotoxina B pirogênica estreptotóxica) reagem também contra células endoteliais, levando a deposição de IgG e ativação do complemento em valvas de camundongos, com apoptose de células intersticiais. O epitopo dominante envolvido nesse reconhecimento é o (296-310): N³[H]-FGYNQSVHQINRGDF-C⁽⁶⁸⁾ ⁽⁵⁵⁾. Foi identificado um octapeptídeo, derivado da proteína M, que liga colágeno e leva a altos títulos de anticorpos contra esta proteína. Este pode ser um motivo importante no desenvolvimento de autoimunidade ⁽⁶⁹⁾.

A recorrência de eventos inflamatórios leva a cicatrização e espessamento das valvas; e postulava-se que também à calcificação. Entretanto, em um grande estudo (2683 participantes com valvulopatias) não foi encontrada correlação entre inflamação e calcificação de valvas ⁽⁷⁰⁾. Indivíduos mais idosos apresentaram mais calcificação. Entretanto, a associação proposta pode ser devido a fatores de risco compartilhados.

1.2.6. *Diagnóstico*

O diagnóstico segue critérios exclusivamente clínicos, conforme mostrado na Tabela 1, segundo Jones em 1944 e revisado pela última vez em 1992 ⁽⁷¹⁾ sendo que dois critérios principais ou um principal e dois secundários confirmam o diagnóstico em casos de surtos agudos, além do histórico de infecção de garganta por *S. pyogenes* nos últimos 45 dias, que não aparece nos critérios porque nem sempre pode ser confirmado ou acessado. Além desses critérios, a ecocardiografia é uma ferramenta importante para o diagnóstico dessa doença.

Tabela 1: Critérios de Jones

Principais	Secundários
Cardite: sopro	Febre
Poliartrite migratória	Artralgia
Eritema marginatum	↑ Proteínas de fase aguda ou leucocitose
Coreia de Sydenham	↑ intervalo PR (eletrocardiograma)
Nódulos subcutâneos	

O desenvolvimento de um método diagnóstico é difícil, devido à baixa incidência, principalmente nos países mais desenvolvidos e que, portanto, têm mais condições de receber tratamento antibiótico com penicilina sempre que apresentarem episódios de tonsilofaringite ⁽⁷²⁾. E as duas manifestações valvares (insuficiência por regurgitação e estenose) só podem ser diferenciadas por auscultação cardíaca ou por ecocardiografia.

1.2.7. *Tratamento*

No momento do diagnóstico da orofaringite por *Streptococcus pyogenes*, o tratamento preconizado é: penicilina V oral 500 mg: 2 a 3 vezes por dia, por 10 dias (a metade desta dose é indicada para crianças). Ou uma única dose de penicilina G benzatina intramuscular de 1.200.000 U. Para crianças com menos de 27 kg, usar a metade da dose. A posologia usual para profilaxia secundária em casos estabelecidos de febre reumática serve para prevenir a recorrência de episódios de agudização e consiste na injeção intramuscular a cada 21 dias de penicilina G benzatina na dose de 1.200.000 U.I.; para crianças com menos do que 20 kg deve-se usar a metade da dose ⁽⁷³⁾. Entretanto, essas medidas são de difícil implementação em países de baixo poder aquisitivo ⁽⁷⁴⁾.

Os tratamentos de escolha para doença reumática valvar consolidada são aqueles em que não há necessidade de troca de valva, para evitar eventos adversos de transplantes. O primeiro é o uso de corticosteroide sistêmico, nos surtos de agudização, entre os processos invasivos, estão a valvuloplastia mitral percutânea com balão de Inoue. 81% dos pacientes não apresenta regurgitação após 7 anos ⁽⁷⁵⁾. Outra opção é a comissurotomia mitral percutânea ⁽⁷⁶⁾, desde que observados certos cuidados com relação à idade do paciente, classe NYHA, anatomia favorável da valva, grau de regurgitação após a intervenção. A taxa de restenose é de 35% em 10 anos. Como opção, pode-se realizar troca de valva por prótese biológica ou artificial.

Não foi observada melhora clínica durante 12 meses dos pacientes que durante episódio agudo de febre reumática receberam doses intravenosas de imunoglobulina, utilizado como imunomodulador ⁽⁷⁷⁾.

O tecido valvar cardíaco (principal alvo das manifestações cardíacas na DRC) é pouco celular, composto principalmente por proteínas de matriz ^(78, 79). Entretanto, o papel das células valvares na patofisiologia tem sido amplamente caracterizado ⁽⁸⁾. Células intersticiais valvares são as mais comuns nas valvas cardíacas e são distintas das células mesenquimais presentes em outros órgãos. Há grande plasticidade anatômica e funcional entre elas. As células intersticiais valvares ativadas são responsáveis pelos processos de proliferação, migração e remodelamento de matriz. Respondem a lesão valvar devido a condições patológicas e forças mecânicas e hemodinâmicas, possuem α -actina de músculo liso. As células intersticiais osteoblásticas são responsáveis por processos de calcificação, condrogênese e osteogênese – secretam fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea ⁽⁸⁾.

A citocina TGF- β 1 interage com metaloproteinases de matriz, induzindo fibrose e remodelamento da estrutura. É discutido o seu papel tanto em situações de pós-isquemia, quanto na profilaxia da cardiomiopatia dilatada e hipertrófica, arritmia e em valvulopatias. Entretanto, são necessários mais estudos que avaliem os efeitos colaterais imunológicos de uma inibição desta molécula ⁽⁸⁰⁾ e do seu papel na fibrose cardíaca.

A serotonina aumenta a expressão e atividade de TGF- β 1, bem como atividade de fosfolipase C. Em modelo de células de valva aórtica de ovelhas, foi caracterizado o receptor 5-HT_{2A}R, como o melhor agonista de serotonina, podendo estar envolvido na sinalização que leva à lesão valvar progressiva ⁽⁸¹⁾.

São descritas, geralmente, cinco etiologias de doenças valvares ⁽⁸²⁾: febre reumática (crônica e aguda), doenças valvares relacionadas à serotonina (carcinoide, relacionada à medicação, por ergotamina, anorexogênica ou pergolida, por outras medicações), doença aórtica degenerativa relacionada à idade, diálise (por doença renal em estágio final), e valva mixomatosa.

Ao comparar as respostas humorais de pacientes com febre reumática com e sem acometimento cardíaco, verificou-se que no grupo com cardite as respostas foram significativamente maiores a fibronectina e colágeno do tipo I. Não está definido se estas proteínas estão presentes nas valvas cardíacas ⁽⁸³⁾.

1.3. *Degeneração mixomatosa*

Outra doença valvar de grande importância clínica e cirúrgica é a degeneração mixomatosa (DMX). Esta é uma doença de etiologia não-inflamatória, crônica, degenerativa, que acomete principalmente a valva mitral, seguida da aórtica e, mais raramente, comprometimento da valva tricúspide ⁽⁸⁴⁾.

A histologia mostra algumas diferenças entre a valva reumática e a mixomatosa. Enquanto que a primeira mostra-se espessa, fibrótica, rígida, com cicatriz, comissuras e cordas fundidas, erodidas, ulceradas e com presença de neovascularização; a valva mixomatosa apresenta-se espessa, macia, borrachosa, com muita substância de base ou de sustentação, comissuras não-fundidas, cordas alongadas e sem erosões. Degeneração mixomatosa é

caracterizada por folhetos mitrais de tamanho aumentado, engrossados, fibrose endocárdica, grande acúmulo de mucopolissacarídeos, ruptura e desorganização das fibras de colágeno e fragmentação das fibras elásticas ⁽⁸⁵⁾. Entretanto, as causas primárias e a patogênese são amplamente desconhecidas. Não há medicamentos ou tratamentos que possam retardar o progresso da degeneração mixomatosa ⁽⁸⁶⁾. Muitos são os trabalhos clínicos, anatomopatológicos, ecodopplercardiográficos, e sobre características genéticas da degeneração mixomatosa, porém a sua etiologia ainda não está totalmente esclarecida ^(87, 88).

É a doença valvar mais comum nos Estados Unidos e Europa ⁽⁸⁹⁾, atingindo preferencialmente idosos. É a patologia mais frequentemente encontrada durante reparo cirúrgico ou troca de valva mitral ⁽⁹⁰⁾. No Brasil, em 12 anos de experiência verificou-se que a degeneração mixomatosa representou 25,9% da etiologia dos pacientes submetidos à plástica da valva mitral ⁽⁹¹⁾. Ressecção quadrangular da folha posterior da valva mitral é a intervenção cirúrgica mais indicada, com prognóstico eficaz por 12 anos, pelo menos ⁽⁹²⁾.

O modelo animal mais fidedigno, e com maior semelhança fisiopatológica com a doença em humanos são os cães ⁽⁹³⁾. Foram estudadas valvas mitrais de cães com degeneração mixomatosa em fase inicial (folhetos com 1 a 2,5 mm de espessura, sem rompimento de cordas), final (folhetos com mais de 2,5 mm de espessura) e de cães saudáveis por iTRAQ (do inglês, Marcação Isobárica para Quantificação Relativa e Absoluta). Foram identificadas mais de 300 proteínas, sendo que 117 estavam diferencialmente expressas. As proteínas diferenciais foram agrupadas de acordo com padrões

de expressão. Este agrupamento demonstrou que a expressão proteica de fase inicial e tardia da doença era muito próxima ⁽⁹⁴⁾, talvez recorrente dos processos adaptativos.

A remoção do gene *Prkar1a* em camundongos causa falha no desenvolvimento do coração e mixomatogênese ⁽⁹⁵⁾. É sugerida predisposição genética tanto em cães quanto em humanos ^(96, 97). As células intersticiais valvares são as responsáveis pelo metabolismo, regulando degradação da matriz e remodelamento na degeneração mixomatosa. Não há alterações significativas nos níveis de mRNA de colágenos, apesar da grande desorganização resultante na arquitetura da matriz valvar ⁽³⁾; colágenos I e III, além de fibrilina, e outras proteínas de matriz, estão relacionados ao prolapso mitral, exibindo um padrão mais difuso, fraco e não-laminar, conforme observado em pacientes, em comparação com doença reumática cardíaca ⁽⁹⁸⁾.

Pesquisa prospectiva na Europa, em 2001, revelou que a maior parte dos casos de estenose de aorta ou regurgitação mitral era devido à degeneração mixomatosa; por outro lado, a estenose mitral foi em grande parte devido à doença reumática cardíaca ⁽⁹⁹⁾.

1.4. Métodos Proteômicos

Proteômica é o “estudo sistemático das muitas e diversas propriedades das proteínas de uma maneira paralela com o objetivo de fornecer descrições detalhadas da estrutura, função e controle dos sistemas biológicos na saúde e na doença” ⁽¹⁰⁰⁾. O termo “proteoma” foi cunhado em

1994 por Mark Wilkins ⁽¹⁰¹⁾ para definir o conjunto de todas as proteínas codificadas pelo genoma de um organismo. Apesar de grandes avanços nos métodos e tecnologias, que permitiram análises em larga-escala, integração dos diversos tipos de dados e simulações computacionais, a análise de todas as proteínas de um organismo ainda é um vislumbre futurístico, devido principalmente às dificuldades na extração e separação de conjuntos grandes de proteínas e na identificação de algumas proteínas por espectrometria de massas, devido a maior dificuldade de ionização, e à falta de maturação dos algoritmos usados nos estudos proteômicos. Entretanto, avanços no preparo de amostras, espectrometria de massas e análise computacional, têm transformado a análise proteômica em uma ferramenta amplamente utilizável para a comunidade de biólogos celulares ⁽¹⁰²⁾.

A expressão das proteínas em uma determinada situação não é necessariamente diretamente relacionada à quantificação de mRNA por técnicas de PCR em tempo real ^(103, 104), uma vez que a correlação entre os resultados pode ser pouco significativa. É discutida com base em modelagem teórica matemática, na qual avalia-se a correlação entre a quantidade de mRNA e a sua tradução em proteína. Processos de elongação e utilização de códons são responsáveis pela falta de correlação observada nos experimentos ⁽¹⁰⁵⁾. Estudos em *Escherichia coli* demonstraram claramente esta discrepância, reforçando a complementariedade dos métodos ⁽¹⁰⁶⁾.

A primeira descrição de separação eletroforética de proteínas com base tanto na massa molecular quanto no ponto isoelétrico ocorreu em 1975 ⁽¹⁰⁷⁾, com criação de gradiente de pH baseada em anfólitos em solução. O método foi aperfeiçoado com o uso de gradiente de pH imobilizado ⁽¹⁰⁸⁾, permitindo a

melhor separação de proteínas com pl extremamente alcalino ou ácido. Modificações posteriores continuaram a ser implementadas ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾, tanto para a preparação das amostras quanto em relação aos protocolos de eletroforese e detecção das proteínas. Ao lado do *shotgun* (digestão do conjunto das proteínas, e aplicação diretamente no espectrômetro) são as únicas técnicas que podem ser usadas rotineiramente para quantificação de grandes conjuntos de amostras. Fornece análise de proteínas intactas, permitindo separação de isoformas e MPTs ⁽¹¹²⁾.

O advento de gradientes de pH estreitos aumentou em muito o número de proteínas identificadas nos experimentos de proteômica ⁽¹¹³⁾, pois eles podem ser sobrepostos formando um contínuo desde valores bastante ácidos até ao extremo de alcalinidade.

Melhores reagentes para reidratar as fitas de pH imobilizado, como o Destreak (GE Healthcare, Upssala), também foram capazes de aumentar a resolução nos géis ⁽¹¹⁴⁾, permitindo a análise em tecidos contendo muitos interferentes, como o adiposo ⁽¹¹⁵⁾.

A proteômica permite examinar alterações globais na expressão proteica no coração doente e pode fornecer subsídios para desvendar os mecanismos celulares envolvidos em disfunção cardíaca e que podem resultar na geração de novos marcadores diagnósticos e terapêuticos ⁽¹¹⁶⁾. Mais do que simplesmente criar grandes bancos de dados de proteínas, o objetivo da proteômica é encontrar significado para alterações na expressão de proteínas que permitam investigação dos mecanismos subjacentes às patologias, facilitando a identificação da natureza de sua modificação ⁽¹¹⁷⁾.

Por maior que seja a cobertura de proteínas atingida, dificilmente se conseguirá uma cobertura completa ⁽¹¹⁸⁾, quer por métodos baseados em gel quanto por abordagens livres de gel, ou mesmo por combinações das duas tecnologias ⁽¹¹⁹⁾. O genoma humano é composto por cerca de 20.000 genes, que codificam cerca de 100.000 proteínas, das quais 10.000 são expressas no coração. Experimentos de eletroforese bidimensional (2-DE) de pequena escala podem separar até 2.000 a 3.000 proteínas; em larga-escala, esse número pode chegar a 10.000 “spots” proteicos ⁽¹²⁰⁾.

Métodos livres de gel foram descritos para aumentar a sensibilidade e a linearidade das detecções em proteômica.

Outra abordagem é a combinação de métodos eletroforéticos e cromatográficos, também conhecida como separação multidimensional ⁽¹²¹⁾. Podem ser acopladas: eletroforese bidimensional, cromatografia líquida em “tandem” e cromatografia líquida acoplada a eletroforese microcapilar. Estas metodologias abrem possibilidades futuras de integração na separação e quantificação de proteínas em amostras biológicas.

Para pesquisa de biomarcadores, é necessário encontrar proteínas específicas, que estejam presentes em determinada patologia, em um grande número de pessoas. Através da proteômica de populações – grandes estudos, em larga escala, pode-se validar biomarcadores já estudados em análises de rastreamento ⁽¹²²⁾. Três estágios são requeridos para que a proteômica clínica melhore o cuidado com a saúde ⁽¹²³⁾: **1)** descoberta (proteínas candidatas e perfis de coortes humanas e animais); **2)** validação (especificidade e seletividade determinados por grandes coortes humanas); e **3)** implementação (testes clínicos com apoio regulatório). Algumas bases de dados construídas a

partir de 2-DE disponíveis na internet podem fornecer informações importantes sobre o proteoma em tecido cardíaco em humanos e em ratos ⁽¹²⁴⁻¹²⁸⁾.

É importante ressaltar que as análises proteômicas não representam o conjunto total de proteínas de uma determinada fonte em dado momento ou situação, e nem as relações entre elas representam necessariamente relações verificadas *in vivo* ⁽¹²⁹⁾. Proteínas expressas em pequena quantidade (p. ex. sinalizadoras) podem representar uma porção importante do proteoma, e são pouco representadas em análises por eletroforese bidimensional, bem como proteínas de membrana. Além disso, isoformas podem migrar em posições não relacionadas no gel, dificultando a quantificação de uma determinada proteína ⁽¹³⁰⁾. Para melhorar a representatividade de proteínas pouco expressas, têm-se tentado fracionamento de organelas celulares ⁽¹³¹⁾.

A extração de proteínas para análise por eletroforese bidimensional envolve ruptura do tecido ou das células em cultura, desnaturação das proteínas e solubilização em tampão adequado. Esta ruptura de tecidos e/ou células, pode ser feita com maceração do material congelado em nitrogênio líquido com cadinho e pistilo ⁽¹³²⁾, ou equipamentos nos quais o material é rompido em presença do tampão de lise, como Polytron ⁽¹³³⁻¹³⁵⁾ ou Precellys ^(136, 137). É muito importante que o procedimento seja feito com a amostra em refrigeração, não ultrapassando 4 °C, para evitar proteólise e carbamilação da uréia presente nos tampões comumente usados.

Interferentes são substâncias que podem ser extraídas conjuntamente com as proteínas e que, caso sejam mantidos no extrato, irão prejudicar as etapas analíticas, que são: quantificação, aplicação (ou carregamento) da amostra, isoeletrofocalização, separação por massa molecular. A eliminação

dos interferentes pode ser feita por colunas de dessalinização, por diálise, colunas de troca iônica, de afinidade, ou de exclusão molecular, filtração a baixa pressão com filtros de poros de tamanho definido, precipitação, reextração, entre outros ⁽¹⁰⁹⁾.

Em tecidos fibrosos, é prática comum utilizar precipitação com cloreto de cetilpiridínio ou combinação deste com digestão de glicosaminoglicanos ⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾, ou ultracentrifugação ⁽¹⁴¹⁾. Polissacarídeos podem se ligar a proteínas e precipitá-las, ou alterar sua mobilidade, criando estrias horizontais e aumentando o tempo de focalização. É sugerida precipitação das proteínas para eliminar este interferente ⁽¹⁴²⁾.

DIGE® (GE Healthcare, Upsalla) é uma metodologia de multiplexação de amostras em um único gel, diminuindo a variação intergel, com detecção fluorescente e que permite trabalhar com quantidades mínimas de proteínas. Devido ao uso de quantidades tão pequenas de proteínas (50 µg de amostra por gel), os métodos de preparo da amostra devem ter cuidados redobrados ⁽¹⁴³⁾. O método foi extensamente revisado na literatura ^(109, 143) com resultados amplamente validados por outros métodos. Um passo importante no aperfeiçoamento desta tecnologia foi incorporação do “pool” interno como padrão de normalização dos géis ⁽¹⁴⁴⁾. O programa Decyder® (GE Healthcare, Upsalla) é o mais utilizado para avaliação dos resultados de expressão protéica diferencial por 2-DE DIGE, por sua facilidade de reprodução dos resultados e simplicidade técnica. Mas outros programas são propostos para complementar as análises, com algoritmos baseados em microarranjos de proteínas ⁽¹⁴⁵⁾.

1.5. *Proteoma do tecido valvar*

São escassos os estudos de proteoma em tecido valvar, em parte devido ao baixo rendimento proteico das amostras e em parte por causa da grande quantidade de interferentes, como glicosaminoglicanos presentes nesse tipo de tecido elástico e avascular em condições fisiológicas ^(68, 146). Uma solução achada foi o carregamento de uma quantidade grande de proteínas (2 mg de proteínas em fitas de 17 cm com pH 3-10) e a coloração por prata no estudo de valvas aórticas em aneurisma de aorta ascendente ⁽¹⁴⁷⁾.

As tentativas de estudo de células intersticiais valvares em cultura não foram muito profícuas, uma vez que ocorrem muitas alterações em seu metabolismo, como diminuição da expressão de colágeno tipo I e aumento da transcrição dos genes de collagenases, estromelisinases e metaloproteinases de membrana ⁽⁵⁾. Esta inibição, principalmente de metaloproteinases, pode estar envolvida na diminuição da estenose, como observado em tecido miocárdico ⁽¹⁴⁸⁾, mascarando o fenótipo destas células.

A organização da matriz extracelular valvar é conservada entre diversas espécies. Valvas estenóticas de pacientes pediátricos com valva aórtica bicúspide foram comparadas com valvas de galinhas e camundongos utilizando métodos de histoquímica, imunohistoquímica e microscopia eletrônica ⁽⁶⁸⁾. Valvas doentes apresentavam-se mais alargadas, com aumento de deposição de material extracelular, desorganização dos colágenos e proteoglicanos, fibras elásticas em menor número e fragmentadas, desarranjo celular sem sinais de calcificação ou de proliferação. Entretanto, o estudo não avaliou as causas

dessas alterações, simplesmente relata os achados e correlaciona com a patologia das doenças.

Foram identificadas, em valvas aórticas e pulmonares de camundongos, através de eletroforese unidimensional e LC-MS/MS, 2710 proteínas (codificadas por 1513 genes), incluindo mais de 300 proteínas extracelulares abundantes ⁽⁷⁸⁾.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Investigar alterações na expressão proteica decorrentes de lesão autoimune no tecido valvar de pacientes com doença reumática cardíaca (DRC) em relação a indivíduos sadios e pacientes com degeneração mixomatosa (DMX), que possam contribuir para a elucidação dos mecanismos de disfunção valvar e de desestruturação de matriz observados na DRC, além de permitir uma melhor compreensão das alterações moleculares.

2.2. *Objetivos específicos*

a) Identificar padrões de expressão proteica diferencial entre as amostras de tecido valvar de pacientes portadores de DRC com insuficiência mitral (DRC-INS), estenose mitral (DRC-EST), em relação a indivíduos sem lesão valvar e a pacientes portadores de DMX;

b) Investigar vias funcionais e interações relativas a proteínas diferencialmente expressas que possam classificar as lesões em indivíduos que apresentem DRC-INS ou DRC-EST;

c) Avaliar a localização das proteínas diferencialmente expressas no tecido valvar.

3. MÉTODOS

A água utilizada em todos os experimentos foi purificada pelo sistema MilliQ (Millipore Corporation). Os reagentes utilizados foram de grau analítico das marcas Amersham Bioscience/GE, Merck ou Sigma. Nos procedimentos de eletroforese bidimensional foram utilizados reagentes da marca GE Healthcare, e PlusOne. Os solventes utilizados foram de grau padrão para HPLC. Todos os procedimentos envolvendo análise fluorescente foram realizados com o operador utilizando luvas sem talco, no escuro, e as soluções filtradas em filtro com poros de 0,22µm.

3.1. *Delineamento experimental*

Este estudo é uma pesquisa experimental, controlada, retrospectiva, randomizada, não-cega, onde estudamos biópsias de valvas mitrais de indivíduos com doença reumática cardíaca, com insuficiência ou estenose mitral, comparadas a biópsias de indivíduos com degeneração mixomatosa e de um grupo sem valvulopatias. As biópsias foram provenientes de cirurgia corretiva. Foi observado o padrão de variação de expressão de proteínas mitrais, por eletroforese bidimensional com marcação por DIGE® (GE Healthcare) e identificação por espectrometria de massas. A lista de proteínas geradas foi submetida a análise “in silico” para investigar as interações e possíveis mecanismos envolvidos na disfunção valvar. Em seguida, a quantificação de

algumas destas proteínas foi validada por teste com anticorpos específicos. A localização destas proteínas também foi testada por testes de imunohistoquímica.

Figura 2: Fluxograma de trabalho. Mostra as etapas analíticas utilizadas para o presente estudo de análise proteômica.

3.2. Obtenção das amostras

Biópsias suínas:

Foram obtidas valvas mitrais de porcos utilizados durante as aulas práticas do Departamento de Cirurgia Experimental, após injeção letal endovenosa de cloreto de potássio, segundo os critérios do Comitê de Ética da FMUSP.

Biópsias humanas:

Segundo as normas do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da USP (CAPPesq), todo material de origem humana recebido pelo Laboratório possui Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), assinado pelos pacientes submetidos à cirurgia para correção valvar, ou por um familiar. Foi utilizado fragmento de tecido de valva mitral obtido de pacientes em cada uma das seguintes condições, em conformidade com o protocolo (0053/07), aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa, como segue:

- Indivíduos-controle (CTL): fragmento de tecido valvar de 7 indivíduos doadores de coração, encaminhados para transplante no Complexo HC-FMUSP, ou com *causa mortis* não relacionada a complicações cardíacas, cujo órgão não pôde ser utilizada por motivos técnicos;
- Pacientes com Degeneração Mixomatosa (DMX): fragmento de tecido valvar de 6 biópsias coletadas no momento da cirurgia valvar no serviço de Cirurgia Valvar do InCor-FMUSP;
- Pacientes com Doença Reumática Cardíaca, com insuficiência mitral (INS) predominante: fragmento de tecido valvar de 8 biópsias coletadas no momento da cirurgia valvar no serviço de Cirurgia Valvar do InCor-FMUSP;
- Pacientes com Doença Reumática Cardíaca, com estenose mitral predominante (EST): fragmento de tecido valvar de 6 biópsias coletadas no momento da cirurgia valvar no serviço de Cirurgia Valvar do InCor-FMUSP.

As valvas mitrais humanas foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia do InCor-FMUSP imediatamente após sua excisão no ato cirúrgico em tubos de poliestireno com tampa de rosca (Cryo.S, Greiner Bio-One,

Cambridge, Inglaterra), em recipiente com gelo, e, no Laboratório, foram imediatamente armazenadas em galão de nitrogênio líquido, identificadas e catalogadas em arquivo eletrônico. O Laboratório mantém registro eletrônico dos materiais recebidos, com identificação de sua origem, número de registro no HC, dados clínicos e laboratoriais. A comparação entre as idades dos indivíduos é apresentada na Figura 3.

Figura 3: Distribuição das idades entre os grupos. CTL: grupo controle; DMX: grupo degeneração mixomatosa; DRC: doença reumática cardíaca com insuficiência (INS) ou estenose (EST). Não houve diferença significativa entre as idades dos grupos. Análise estatística por ANOVA: não há diferença entre os grupos.

3.3. Cortes histológicos

As biópsias foram mantidas sob congelamento e incluídas em Tissue-Tek® para corte em criostato, a -25 °C, com espessura de 6 µm, em lâminas de microscopia silanizadas. Em cada lâmina foram colocados cerca de 4 cortes de cada material. Para avaliar a qualidade dos cortes e do material, adicionalmente, foi feita coloração por hematoxilina-eosina destes.

3.3.1. *Coloração por Hematoxilina-eosina (HE)*

As lâminas com os cortes histológicos de valvas mitrais foram mantidas em congelamento até o momento da coloração. A coloração de HE foi feita seguindo-se o seguinte protocolo:

Álcool 96º	5 minutos
Álcool 70º	2 minutos
Lavar em água	
Hematoxilina	1,5 minutos
Lavar em água	
Eosina	2 minutos
Lavar em água	
Álcool 96º	1 minuto
Álcool 100º	3 minutos
Xilol	1 minuto

Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínula e entelan. Depois, foram observadas ao microscópio óptico comum, e fotografadas em aumentos de 100x, 200x e 400x.

3.4. *Preparo do extrato proteico e eliminação de interferentes*

Para a padronização da técnica, foi utilizado material valvar suíno. Para os testes de expressão proteica diferencial e identificação de proteínas, foram utilizadas valvas provenientes dos indivíduos da pesquisa, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Identificação dos indivíduos da pesquisa e massa da biópsia utilizada

Grupo	Número amostra	Idade (anos)	Sexo	Biópsia (mg)
CONTROLE	CTL1	33	M	130
	CTL2	35	M	170
	CTL3	38	F	100
	CTL4	56	M	170
	CTL5	49	M	80
	CTL6	46	F	60
	CTL7	45	F	70
DEGENERÇÃO MIXOMATOSA	DMX1	39	M	90
	DMX2	75	M	100
	DMX3	73	F	50
	DMX4	25	F	90
	DMX5	24	F	60
	DMX6	62	M	100
DRC COM INSUFICIÊNCIA	INS1	21	M	90
	INS2	62	M	90
	INS3	64	F	110
	INS4	57	F	80
	INS7	73	F	60
	INS8	61	M	100
	INS9	42	M	70
DRC COM ESTENOSE	EST1	51	F	100
	EST2	28	F	90
	EST3	38	M	150
	EST4	37	F	140
	EST5	51	F	200
	EST6	56	M	90

Extração das proteínas de valva mitral:

O procedimento para preparo do extrato de proteínas para análise proteômica foi padronizado em material suíno. O tecido valvar foi retirado do congelamento e mantido em banho de gelo. Imediatamente antes da extração de proteínas, foi lavado em tampão PBS gelado. O homogenato protéico foi feito em solução de lise (solução 1), em banho de gelo. Para cada 100 mg de tecido foram utilizados 400 µl de tampão. O rompimento foi realizado em Polytron PowerGen 1000™ (Fischer Scientific, Suwannee, GA, USA), por ciclos de 30 segundos, a 30.000 rpm e 4°C, até que não houvessem fragmentos visíveis. O extrato foi mantido em congelamento a -20 °C *overnight*. Em seguida, o extrato foi sonificado (Sonic Dismembrator 60, Fisher Scientific) por 5 ciclos de 10 segundos, em banho de gelo, com 1 minuto de intervalo entre os ciclos. O material foi, então, mantido em banho de gelo por mais 30 minutos e centrifugado por 60 minutos a 16.200 xg a 4 °C para eliminar qualquer material insolúvel.

Eliminação de interferentes:

Os interferentes foram eliminados por diálise e posterior concentração por centrifugação a vácuo. O extrato obtido em foi mantido em congelador a -20 °C por cerca de 1 dia antes de ser colocado em membrana de diálise Spectra-Por (Spectra Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA), com poro de 3,5 kDa, por 48 horas a 4 °C em água. Posteriormente, os extratos proteicos foram centrifugados a vácuo em equipamento SpeedVac SC 100, até sua completa secagem. As proteínas foram ressuspensas em 400 µl de tampão de lise (solução 1).

Quantificação das proteínas:

Os extratos obtidos foram quantificados pelo método modificado de Bradford (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA); a curva-padrão foi feita com albumina. As concentrações foram ajustadas para cerca de 5 µg/µl pela adição de tampão de lise (solução 1), para permitir melhor marcação pelo DIGE.

Ajuste do pH:

Para marcação com as cianinas fluorescentes utilizadas na metodologia do DIGE, os extratos devem estar com pH em torno de 8,5. As proteínas presentes na valva tendem a abaixar um pouco o pH do tampão de lise – originalmente 8,5. A verificação do pH foi feita com fita indicadora, na faixa alcalina. O ajuste, quando necessário, foi realizado pela adição de NaOH 0,05mM (solução 2).

Avaliação do rendimento final:

O rendimento final das extrações foi avaliado em relação ao peso inicial do fragmento da biópsia utilizado. Este resultado foi calculado pela divisão da quantidade absoluta de proteína obtida em cada amostra pelo seu peso.

3.5. Eletroforese unidimensional

A integridade dos extratos foi avaliada por eletroforese unidimensional sob condições desnaturantes, em gel de SDS-PAGE a 12,5% (solução 4), com fase de empilhamento em gel SDS-PAGE a 4% (solução 5). Foram utilizados 20 µg de proteína de cada amostra, em tubo Eppendorf, em tampão de amostra (solução 6). A corrida foi feita em equipamento Mini-VE (GE) a temperatura ambiente, em tampão Laemmli (solução 7) a 1X no ânodo e no

cátodo, e marcadores de peso molecular GE-Amersham®. A primeira etapa, ou de empilhamento, foi realizada a 60 V, durante 15 minutos. A segunda etapa, analítica, foi realizada a 120 V, até que a linha de frente atingisse o final do gel.

Após o término da corrida, o gel foi fixado em solução de fixação (solução 8) por um mínimo de 2 horas, com agitação constante (Multi-Purpose Rotator mod. 2314, Barnstead/Lab-Line Corp, Dubuque. Iowa, EUA). A coloração foi feita por Coomassie coloidal G-250 (solução 9) por 3 a 4 dias. O gel foi posteriormente descorado com água Milli-Q, com agitação e sucessivas trocas de água, até que a coloração de fundo estivesse límpida o suficiente.

Obtenção e análise das imagens de 1-DE:

As imagens foram obtidas utilizando-se um foto-digitalizador ImageScanner (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) e analisadas pelo *software* Image Master Platinum versão 5 (desenvolvido pelo Swiss Institute of Bioinformatics, GeneBio e Amersham Biosciences). As análises densitométricas foram feitas com a ferramenta IQ-Tools, para comparação intra-grupos.

3.6. Eletroforese bidimensional – DIGE

A marcação das amostras foi feita conforme instruções do fabricante.

Teste de marcação:

A avaliação da eficiência e uniformidade da marcação pelos fluoróforos foi feita em gel unidimensional de SDS-PAGE a 12,5%. O *pool* das amostras (50 µg) foi marcado com cada um dos fluoróforos, segundo a metodologia descrita anteriormente. O volume total das três marcações é colhido em um mesmo tubo,

no escuro, e adicionado ao tampão de amostra (solução 6). O material é fervido por 2 minutos e aplicado em uma raia no sistema SE-260 (Mini-VES). A marcação foi realizada em triplicata, em miocárdio e em valva mitral humanas, e as amostras foram analisadas em paralelo.

Teste de aplicação de amostra:

O *paper bridge* foi padronizado para carregamento de proteínas em géis preparativos com material suíno. Era necessário confirmar se esse tipo de carregamento seria o mais resolutivo para material de origem humana com carregamento analítico. Para este teste utilizamos fitas de 13 cm, pH 3-10, em géis de SDS-PAGE a 10%. As fitas foram carregadas com 250 ug de proteínas, carregadas por reidratação *ingel*, *paper bridge* no cátodo e no ânodo. Foram usadas proteínas obtidas de pool de três valvas mitrais suínas e humanas.

Reidratação e aplicação da amostra:

Para os experimentos de expressão diferencial por DIGE, foram usadas fitas de isoeletrofocalização de 24 cm, pH 3-10 NL (IPG Strips, GE Healthcare). As fitas foram reidratadas com tampão de reidratação (solução 13) e amostra por 20 horas.

As amostras marcadas foram misturadas em cada tubo tipo Eppendorf envolto em papel alumínio, conforme a Tabela 3, sendo que 50 µg adicionais de um *pool* contendo quantidade igual de proteínas de todas as amostras, marcado com Cy2, foi colocado em cada tubo. Após isso, a mistura foi diluída em igual volume de tampão de amostra - DIGE 2X (solução 14).

As amostras foram carregadas à fita de isoeletrofocalização (IEF) durante a etapa de reidratação, diluídas em tampão de amostra (solução 14), com adição de 1% de IPG-buffer.

Tabela 3: Desenho dos géis analíticos para análise por DIGE

	Cuba 1		Cuba 2	
Posição	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5
1	CTL1	INS1	(vazio)	
2	DMX1	EST1	Preparativo	
3	INS4	CTL4	CTL3	DMX3
4	EST3	EST5	DMX2	DMX4
5	Preparativo		INS2	EST4
6	(vazio)		EST2	CTL2

As amostras foram focalizadas em equipamento IPG-Phor (GE Healthcare), com capacidade para 12 fitas simultaneamente, através do protocolo descrito na Tabela 4. O acúmulo total de voltagem em cada fita durante a fase de isoeletrofocalização (IEF) foi de cerca de 40.000 Vh.

Tabela 4: Protocolo de IEF para as fitas de 24 cm

Etapas	Voltagem (V)	Tempo (h:min)	Acúmulo (Vh)
1	500	3:00	-
2	500-1.000	-	800
3	1.000-8.000	-	13.500
4	8.000	-	21.200
5	500	10:00 (max)	-
6	8.000	0:30	-

Equilíbrio das fitas:

Cada fita de IEF foi equilibrada em duas etapas: redução e alquilação. Para a primeira etapa, foram utilizados 20 ml de solução de equilíbrio (solução 16) por fita, acrescida de DTT (ditiotreitól) a 2%, em tubo cilíndrico de poliestireno, recoberto com papel-alumínio, para evitar contato com a luz. Cada tubo foi homogeneizado por 25 minutos, ao fim dos quais a solução foi desprezada. Na segunda etapa, a solução de equilíbrio (solução 16) foi acrescida de IAA (iodoacetamida) a 2,5% e foram colocados também 20 ml desta solução em cada tubo, homogeneizados por 25 minutos.

Segunda dimensão:

O equipamento de eletroforese *Ettan Dalt-Six*® foi montado conforme instruções do fabricante. A primeira fase da corrida, ou de empilhamento, foi realizada com 1 W/fita, durante 45 minutos. A segunda fase, ou analítica, foi realizada com 15 W/fita, ou até o máximo de 100 W por cuba, por cerca de 4 horas, ou até que o “front” do gel atinja a porção inferior.

Obtenção e análise das imagens:

As imagens foram obtidas imediatamente após a eletroforese, com os géis ainda entre as duas placas, que foram extensivamente lavadas com água Milli-Q, para retirar o SDS. As imagens foram analisadas com auxílio do programa ImageQuant, nos comprimentos de onda de excitação de cada um dos fluoróforos: Cy2, Cy3 e Cy5, em equipamento “Typhoon 9410 Variable Mode Imager” (Amersham Biosciences/GE healthcare), usando os seguintes parâmetros: Cy2, 488nm de excitação e filtro de emissão de 520/40nm BP (do inglês, “Band Pass”, refere-se à amplitude do comprimento de onda do filtro) 40nm; Cy3, 532nm de excitação e filtro de emissão de 580nm BP 40nm;

Cy5, 633nm de excitação e filtro de emissão de 670/40nm BP; e “Deep Purple”, 532nm de excitação e filtro de emissão de 610/30nm BP. Os géis foram escaneados com resolução de 100micra, e a sensibilidade variou de 450 a 550 PTM (medida de intensidade de incidência da luz).

3.7. Eletroforese bidimensional – preparativo

Os géis preparativos foram feitos da mesma maneira que os analíticos (DIGE), com a diferença de que no gel preparativo foram carregados 700 µg de proteínas do *pool* de todas as amostras sem marcação fluorescente, e adicionalmente, 50 µg deste mesmo *pool* marcado com Cy2.

Brevemente, as fitas de isoeletrofocalização de 24 cm; pH 3-10NL foram reidratadas com tampão de lise (solução 1), Destreak Reagent (GE) e IPG buffer pH 3-10NL. A amostra foi carregada durante a focalização da fita, por *paper bridge*. O protocolo de focalização consta da Tabela 4. O equilíbrio foi feito por redução e alquilação das proteínas.

Para a segunda dimensão, as placas de vidro de baixa fluorescência foram silanizadas com BindSilane na parte posterior dos géis, para que este aderisse e permitisse o recorte automatizado dos “spots”. Esta etapa foi feita em géis SDS-PAGE a 10%.

A imagem dos géis foi obtida em Scanner Typhoon, para a amostra marcada com Cy2, para comparação com a imagem corada por Coomassie. Depois do escaneamento, as placas contendo os géis foram abertas, para fixação dos géis em solução metanol/ácido acético (solução 8) por 2 horas, e coloração com Coomassie Brilliant Blue coloidal (solução 9) por 72 horas.

A imagem foi novamente escaneada em Scanner ImageScanner, e as imagens foram analisadas pelo *software* Decyder v.7.0. O nome dos arquivos obedece às regras necessárias para análise posterior por grupos sugerida pelo fabricante.

3.8. Análise das diferenças de expressão proteica

Após obtenção das imagens, estas são carregadas no programa Decyder®, para detecção dos *spots*, agrupamento e combinação de *spots* nos diferentes géis, e análises de diferença de expressão proteica. As combinações entre os géis foram feitas a partir das imagens do fluoróforo Cy2, que marcou em cada gel o pool das amostras. Esse pool representa a média da expressão proteica das amostras analisadas, e sua finalidade é normalizar os géis. De acordo com os *spots* detectados em todos os géis, foram analisadas as diferenças de expressão significativas, segundo o valor de p calculado pelo teste *t-Student*. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados significativos. Proteínas com expressão diferencial em pelo menos um “spot” foram consideradas com expressão diferencial em nossas análises.

O programa calcula sempre as variações entre os grupos dois a dois. Primeiramente, todos os grupos do estudo foram avaliados em relação ao grupo CTL. Posteriormente, em relação ao grupo DMX, e os grupos DRC-INS em relação a DRC-EST. Em seguida, os grupos CTL juntamente com DMX foram comparados a DRC-INS e a DRC-EST em separado, e conjuntamente. Por fim, cada grupo foi comparado à soma de todos os demais. As alterações de “spots” proteicos significativas em todas as comparações são representadas por Diagrama de Venn, de acordo com sua expressão diferencial nos grupos.

Adicionalmente, os grupos foram avaliados pelo método de PCA (Análise de Componente Principal), com 5 componentes, e pelo agrupamento hierárquico das variações de expressão de proteínas (*Hierarchical Clustering*).

O método de PCA avalia as amostras do estudo de acordo com vetores gerados pela análise dos componentes com maiores variações, através dos padrões de abundância proteica, e os coloca em uma figura de maneira que os componentes estão sempre ortogonais entre si. Desta forma, o primeiro componente principal será aquele cujos vetores variam mais entre as amostras analisadas, e assim por diante. O programa utilizado (DeCyder®) tem a capacidade de avaliar até 5 componentes principais. No presente estudo, os gráficos resultantes têm até 5 dimensões ortogonais.

O Agrupamento Hierárquico agrupa tanto as amostras quanto as proteínas de acordo com seus padrões de similaridade de expressão, em um mapa de calor (*heatmap*) em que as gradações de verde (diminuição) até vermelho (aumento) são apresentadas. Dentre as diversas maneiras de agrupar amostras e proteínas, escolhemos a correlação de Pearson (avaliação do coeficiente angular das variações), no qual não importa a abundância, mas os padrões de variação semelhantes, com ligação completa entre variáveis adjacentes, de forma que cada variável (proteína e amostra) seja colocada ao lado da que mais se assemelha, e não por blocos de similaridades.

3.9. Digestão ingel e extração dos peptídeos

Todos os “spots” de interesse do gel bidimensional preparativo foram retirados por perfuração com o auxílio de uma ponteira com 1mm de diâmetro e

colocados dentro de um tubo tipo Eppendorf siliconizado e previamente lavado com metanol. As soluções de bicarbonato de amônio foram feitas a partir de uma solução-mãe a 1M (solução 17).

Descoloração:

Foi acrescentado a cada tubo 200µl de solução de lavagem (solução 18): 50% metanol e 5% ácido acético, por 4 horas a 25°C e o sobrenadante foi desprezado. Esta etapa foi repetida com incubação de 12 a 16 horas a 25°C. O sobrenadante foi também desprezado. Foi acrescentado 200 µl de NH_4HCO_3 25 mM em acetonitrila (ACN) 50% (solução 19), por 60 minutos a 25°C e o sobrenadante foi desprezado. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Depois, foram adicionados 100µL de ACN 100% e os tubos foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. A ACN foi retirada com pipeta e desprezada. Os tubos foram completamente secos por centrifugação a vácuo (SpeedVac) por cerca de 20 minutos, sem permitir aquecimento.

Redução e alquilação:

Na 1ª etapa foram adicionados cerca de 40 µl de ditioneitol (DTT) 10 mM em NH_4HCO_3 25 mM (solução 20). Os tubos foram incubados a 56 °C por 60 minutos. O sobrenadante foi removido e descartado. Permitiu-se que o tubo esfriasse para temperatura ambiente. Depois, para a 2ª etapa, foi adicionado o mesmo volume de iodoacetamida (IAA) 10 mM em NH_4HCO_3 25 mM (solução 21). Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 45 minutos no escuro com agitação ocasional. O sobrenadante foi removido e descartado. Os tubos foram lavados com 100 µl de NH_4HCO_3 25 mM e submetidos a agitação por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e descartado. Os géis dentro dos tubos foram desidratados com 100 µl de

solução 18 durante 5 minutos sob agitação. O sobrenadante foi descartado. Os géis foram submetidos a nova etapa de desidratação com solução 18 durante 5 minutos sob agitação. O sobrenadante foi novamente desprezado. Os géis foram secos completamente por centrifugação a vácuo (SpeedVac) por cerca de 20 minutos, sem permitir aquecimento.

Digestão tripsínica:

Ao “spot” seco foram adicionados 8 µl de solução de NH_4HCO_3 25 mM (solução 22) contendo 0,3 µg de tripsina (Promega) resistente à autólise. O conjunto foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. O excesso de solução foi retirado. Cada spot foi recoberto com cerca de 30 µl de solução de NH_4HCO_3 25 mM. A reação ocorreu por 16 a 18 horas, com incubação a 37 °C.

Extração dos peptídeos:

Foi adicionado a cada tubo 100 µl de solução ACN 50% e TFA 0,45% (solução 23), sendo incubados por 60 min à 37°C. O sobrenadante foi recolhido em um novo tubo. A extração foi repetida por 2 vezes utilizando 50 µl de solução ACN 50% e TFA 0,45% (solução 24) em cada etapa. Para aumentar a eficiência da extração, as amostras foram sonicadas por 10 minutos na última etapa. Os sobrenadantes das duas etapas de extração foram somados em um único tubo e secos por centrifugação a vácuo (SpeedVac).

Os peptídeos foram ressuspensos em 10 µl de TFA 0,45% (pH<4,0) (solução 24) e purificados por microcoluna de cromatografia reversa (zip-tip).

3.10. Identificação das proteínas por Espectrometria de Massas

Os peptídeos tripsínicos provenientes dos “spots” diferencialmente expressos, após ressuspensão em ácido fórmico a 0,1% (solução 25), foram submetidos a análise em equipamento de espectrometria de massas equipado com ESI-qToF modelo Ultima (Waters). Nesse equipamento, cada amostra é inicialmente submetida a cromatografia líquida de alta eficiência em acetonitrila, é ionizada por spray de elétrons, e injetada em câmara de vácuo. Foi aplicado um fluxo constante de amostra, com volume de injeção de 5 µl, com proporção constante de solventes (85% de água e 15% de acetonitrila), durante 10 minutos por cada amostra. Foram analisadas as relações massa/carga na faixa de 100 a 2000, em modo “reflectron” de polarização positiva. Os íons foram detectados de acordo com seu tempo de voo no vácuo e os cinco picos mais intensos foram submetidos a fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID), e a nova detecção pelo tempo de voo dos peptídeos fragmentados.

3.11. Análise dos resultados obtidos por espectrometria de massas

A lista de valores de m/z fornecida para cada íon peptídico foi comparada ao banco de dados do IPI (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/>) de genoma humano, utilizando o software MASCOT (www.matrixscience.com/), com os parâmetros conforme a Tabela 5. O acesso ao banco de dados do IPI foi feito em 6 e 7 de dezembro de 2011. Adicionalmente, foi feita busca na base de dados do UNIPROT (www.uniprot.org/), nos dias 10 e 11 de dezembro de 2011. As identificações similares nas duas buscas foram utilizadas para a construção da Tabela 1 suplementar.

Tabela 5: Parâmetros para busca das identificações por MS/MS

Tipo de pesquisa:	Pesquisa de íons em MS/MS
Enzima:	Tripsina
Modificações fixas:	Carbamidometilação (C)
Modificações variáveis:	Oxidação (M)
Valores de Massa:	Monoisotópicos
Massa da proteína:	Não-restrito
Tolerância para massa de peptídeo:	±0,5 Da
Tolerância para massa de fragmento:	±0,5 Da
Máximo de clivagens perdidas:	1
Tipo de instrumento:	ESI-Quad-ToF

3.12. *Análise das alterações funcionais observadas*

Para análise de alterações funcionais/metabólicas observadas no experimento de expressão proteica diferencial (DIGE) foi utilizado o software Ingenuity Pathway Analysis® (IPA), disponível pela internet em www.ingenuity.org. Foram utilizados os valores de expressão relativa e de confiança (p) – calculado pelo DeCyder - para estes *spots*, bem como seus códigos do UNIPROT. O IPA é alimentado, e regularmente atualizado, com as informações de interações entre moléculas biológicas (proteínas, cofatores, mRNA, microRNA,...) e vias funcionais nas quais estas moléculas estão envolvidas. Portanto, a partir de um grupo de moléculas de interesse, ele identifica redes de interação entre elas e com outras moléculas-chave para uma rede robusta de interações. Por padrão, o programa classifica 35 moléculas na rede, para garantir a significância biológica dos resultados. A partir dos dados de expressão diferencial, foi possível a determinação, dentro de cada grupo, das vias funcionais com alterações

quantitativas, através do resultado do programa, que é uma figura com as redes de interação. As moléculas que alimentaram o programa e foram envolvidas na rede de interações significativamente importantes são mostradas em verde quando diminuídas e em vermelho quando aumentadas. As análises foram realizadas para os grupos DRC (INS+EST), DRC-INS, DRC-EST e DMX, todos em relação ao grupo CTL.

3.13. *Western Blotting*

As seguintes proteínas com expressão diferencial nos experimentos de 2D-DIGE e com função importante na matriz extracelular ou na manutenção do citoesqueleto foram validadas por *Western Blotting*: colágeno do tipo VI (sc-20649, Santa Cruz, Heidelberg, Germany), Lumican (sc-166871, Santa Cruz, Heidelberg, Germany), Vitronectina (sc-7776, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) e Vimentina (ab45939, Abcam, San Francisco, CA). Suas expressões foram normalizadas de acordo com a expressão de beta-actina (ab8226, Abcam, San Francisco, CA, USA).

Foram carregados 30 ug de proteína das amostras do estudo em cada poço de cuba de eletroforese do tipo Mini-VES (GE Healthcare) e as proteínas foram separadas por massa molecular, segundo o protocolo descrito para eletroforese unidimensional. A transferência para membranas de nitrocelulose foi feita em sistema Semi-Dry por 1 hora e 30 minutos a 0,8 mA/cm². Após a transferência, a membrana foi corada com corante de Ponceau (solução 11) por cerca de 1 minuto e descorada com água deionizada para avaliação da eficiência da transferência. Em seguida, foi bloqueada em solução 12 por 1 hora, com agitação constante. O anticorpo primário foi incubado por 12 a 16 horas, em

câmara fria, com agitação constante, nas diluições constantes da Tabela 6, a seguir. Após, as membranas foram lavadas por três vezes de 10 minutos com tampão TBS-tween (solução 12b), sob agitação. Foram então, incubadas com anticorpo secundário, segundo informações da Tabela 6, por 12 a 16 horas, em câmara fria com agitação. Então, foram lavadas novamente por mais 3 vezes de 10 minutos com solução TBS-tween (solução 12b). Todos os anticorpos foram diluídos em tampão de bloqueio (solução 12).

Em sequência, foram reveladas com ECL-plus (GE Healthcare) por 5 minutos no escuro, secas e reveladas em Scanner Typhoon, com comprimento de onda de excitação para quimioluminescência de ECL-plus, a 100 pixels.

Tabela 6: Parâmetros de diluição dos anticorpos para Western Blotting

Anticorpo primário (IgG)	Anticorpo secundário (IgG)	Diluição primário	Diluição secundário
Anti-vimentina	Anti-IgG camundongo	1:2000	1:5000
Anti-colágeno-VI-A1	Anti-IgG coelho	1:2000	1:5000
Anti-vitronectina	Anti-IgG cabra	1:1000	1:2000
Anti-lumican	Anti-IgG camundongo	1:2000	1:5000
Anti-actina	Anti-IgG camundongo	1:5000	1:5000

3.14. Imunohistoquímica (IHQ)

Para avaliar a localização das proteínas de interesse, foi feita reação de imunoperoxidase em cortes das biópsias congeladas de valva mitral dos indivíduos arrolados no estudo.

Os parâmetros para os anticorpos utilizados nos testes de IHQ são sumarizados na Tabela 7:

Tabela 7: Parâmetros de diluição dos anticorpos para imunohistoquímica (IHQ)

Anticorpo primário (IgG)	Anticorpo secundário (IgG)	Diluição primário	Diluição secundário
Anti-vimentina	Anti-IgG camundongo	1:500	1:2000
Anti-colágeno tipo-VI	Anti-IgG coelho	1:500	1:2000
Anti-lumican	Anti-IgG camundongo	1:200	1:2000

Cortes transversais de tecido congelado de valva mitral humana de espessura 6µm foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co; St. Louis, Missouri, EUA). O processo de fixação foi feito ao colocar as lâminas em um banho de acetona por 30 min a 4 °C. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão PBS pH 7,4. O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com água oxigenada 10v (3%) por 5 minutos, e depois de lavado muito bem em água corrente, água destilada e tampão fosfato salino (PBS). O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com imersão das lâminas em caseína diluída em tampão fosfato pH 7,4 (Synth, São Paulo, Brasil) por 5 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (IgG) diluídos em PBS-BSA (1%) por 12 a 16 horas a 4°C em câmara úmida, lavados por 3 vezes (3 minutos) com PBS, e posteriormente incubados com o anticorpo secundário (IgG) ABC kit VECTASTAIN (Vector Laboratories – USA) por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Para as proteínas

vitronectina, lumican e TGF-beta, o tempo de incubação com o anticorpo secundário foi de 12 horas a 4 °C. O reagente cromogêneo utilizado foi Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha), por 1 a 3 minutos, de acordo com o aparecimento de coloração marrom nas lâminas. Posteriormente foi feita a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha), durante 2 a 3 minutos, para todos os casos. As lâminas foram montadas com Entelan e lamínula.

3.15. *Microscopia confocal*

Os mesmos fragmentos utilizados para os experimentos de IHQ foram utilizados para o preparo de lâminas para testes de microscopia confocal de colocalização para colágeno do tipo-VI e lumican. Foram utilizados cortes transversais de valva mitral com 6 µm de espessura, em lâminas silanizadas. Antes da coloração, o tecido foi fixado nas lâminas por 30 minutos a 4°C com acetona.

As lâminas foram acopladas em cuba de vidro e submetidas a uma seqüência de 5 banhos por 3 minutos com PBS. As lâminas foram secas com papel de filtro cuidadosamente para não atingir o corte. Em cada corte, foram adicionados aproximadamente 40 µl de PBS/Triton 0,2%. As lâminas foram então acondicionadas em câmara úmida (com PBS 1X) por cerca de 30 minutos. As lâminas foram, então, secas cuidadosamente para não danificar o corte e foram adicionados aproximadamente 40ul de PBS/BSA a 2% (para reduzir marcações inespecíficas). Incubamos em câmara úmida por 40 minutos em temperatura ambiente. Secamos cuidadosamente e adicionamos em cada corte 40 ul dos anticorpos primários (previamente diluídos em PBS/BSA 2%). O anticorpo anti-colágeno do tipo-VI foi diluído a 1:100, e o anti-lumican a 1:50. Incubamos por

aproximadamente 15 horas a 4°C, em câmara úmida. Submetemos as lâminas a 5 banhos de 3 minutos com PBS/Tween 0,5% (para remover ligações inespecíficas). Diluímos os anticorpos secundários a 1:200 em PBS/BSA/DAPI. Aplicamos aproximadamente 40ul das diluições em cada corte e incubamos no escuro em T.A por 45 minutos, em câmara úmida. Submetemos as lâminas a 5 banhos com PBS/Tween 0,5% por 3 minutos e secamos cuidadosamente o corte.

Montamos em Hydromount ® entre lâmina e lamínula e armazenamos as preparações a 4 °C no escuro, no máximo por 72 horas, até a aquisição das imagens no microscópio confocal a laser (Bio-Rad MRC 1024 laser scanning confocal).

3.16. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Prisma®. As análises de quantificação e variação de expressão proteica foram realizadas com o programa Decyder®, com a análise dos grupos dois a dois, utilizando o teste *t-Student* com Mann-Whitney. Análises entre mais de dois grupos concomitantemente foram realizadas por ANOVA.

Os valores de “delta” obtidos para a quantificação das proteínas é feito pelo programa Decyder® e seus valores indicam expressão diferencial quando são superiores a 1,0 (aumento da expressão) ou quando são menores do que - 2,0 (diminuição da expressão). Todas as análises foram feitas sem assumir distribuição normal dos valores.

O valor de *score* do IPA® é calculado pelo teste exato de Fisher, sendo que o valor de *p* é calculado como sendo o antilogaritmo do *score*. Dessa forma, um *score* de 25 significa um valor de *p* igual a 10^{-25} .

4. RESULTADOS

4.1. *Análise histológica*

A análise microscópica dos fragmentos valvares mostrou a presença de infiltrado inflamatório e grande celularidade, bem como neovascularização de paredes espessas nas amostras provenientes de pacientes com doença reumática cardíaca e insuficiência valvar (DRC-INS), enquanto que nas amostras provenientes de pacientes com estenose mitral (DRC-EST) observou-se elevado grau de calcificação. Diferentemente, nas amostras dos pacientes com degeneração mixomatosa (DMX) observou-se deposição de material amorfo. O padrão encontrado para os pacientes foi diferente do padrão do tecido valvar normal. A Figura 4 mostra imagens de cortes microscópicos representativas das alterações observadas nos tecidos dos grupos estudados.

Figura 4: Análise histológica das biópsias utilizadas no estudo. As imagens são representativas do tecido valvar dos grupos avaliados (CTL: controle; DMX: degeneração mixomatosa; DRC-INS: doença reumática cardíaca com insuficiência; DRC-EST: doença reumática cardíaca com estenose).

4.2. *Extração proteica em valva mitral humana*

O processo de extração de proteínas forneceu um rendimento que não variou significativamente em função da origem do material: controles (CTL), pacientes com doença reumática cardíaca (DRC) cursando com insuficiência (DRC-INS) ou estenose (DRC-EST), e degeneração mixomatosa (DMX). As únicas variações significativas foram dos indivíduos do grupo CTL e do grupo DRC-EST que apresentaram rendimento mais baixo em relação à valva de origem suína, como mostra a Figura 5. A valva proveniente de porco, identificada como “suíno” foi inserida para comparação, uma vez que a otimização do método foi feita nesse material.

Figura 5: Avaliação do rendimento da extração proteica em relação aos grupos. Rendimento da extração em cada grupo: **CTL**- controle; **DMX**- pacientes com degeneração mixomatosa; **INS** e **EST**- pacientes com doença reumática portadores de insuficiência (INS) ou estenose (EST) valvar. Rendimento em relação ao peso do fragmento de biópsia utilizada. Teste t de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3. *Análise do padrão eletroforético das proteínas de valva mitral*

O padrão proteico em gel unidimensional (1-DE) das proteínas de valva mitral foi comparado com extração em material suíno (valva). A Figura 6 representa o resultado da análise das extrações. Não foi possível estabelecer um padrão diferencial significativo entre as amostras extraídas a partir dessa análise por 1-DE. As proteínas são mais abundantes na região superior do gel (maior massa molecular). As bandas são bem definidas, permitindo análise posterior por DIGE®, e não houve degradação aparente durante o processo de extração.

Figura 6: Análise eletroforética das proteínas de valva mitral humana e suína. MM: marcador de peso molecular; **Controle:** amostras do grupo controle; **DMX:** amostras do grupo degeneração mixomatosa; **INS:** amostras do grupo DRC com insuficiência; **EST:** amostras do grupo DRC com estenose. Foram utilizados 20 µg de proteína por raia. A figura é representativa das extrações realizadas

4.3.1. *Separação de proteínas por eletroforese bidimensional*

Padronização do método

As primeiras separações eletroforéticas não atingiram a resolução de imagem necessária para um estudo proteômico de larga escala, possivelmente devido a interferentes, como glicanos de matriz extracelular, que aderem às proteínas ou alteram sua migração. Após a padronização com rompimento do tecido em equipamento Precellys®, sonicação do extrato e diálise da amostra foi possível a separação de 468 *spots* bem definidos no material valvar humano, conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7: Perfil eletroforético bidimensional em valva mitral humana após padronização da extração de proteínas. Extrato mitral humano (400µg proteína), em fita de IEF 3-10 (13 cm). Proteínas extraídas por rompimento do tecido em equipamento Precellys®, com posterior sonicação e diálise. Gel corado com Coomassie coloidal G-250

4.3.2. *Gel bidimensional de valva mitral marcado por DIGE*

Um exemplo de gel obtido em material humano após marcação com os fluoróforos Cy2, Cy3 e Cy5, bem como a sobreposição das imagens, é mostrado na Figura 8.

Figura 8: Marcação das proteínas por DIGE em valva mitral humana. (a) Sobreposição das imagens obtidas pela marcação com Cy2 (b), Cy3 (c) e Cy5 (d). Fita de IEF 24 cm, pH 3-11NL, gel SDS-PAGE 10%, 50 µg de proteínas marcadas com cada fluoróforo

4.4. *Identificação global das proteínas de valva mitral humana*

Com base no resultado da padronização de extração, foi feita uma eletroforese preparativa com o *pool* de proteínas das amostras do estudo, em

gel maior, de 20 x 24 cm. Para tal, foi realizado novo experimento, utilizando 650 µg de proteínas em fita de 24cm, com intervalo de pH de 3-11NL, para permitir melhor separação eletroforética. Este possibilitou a detecção de 451 spots, dos quais a maioria foi excisada para identificação, conforme Figura 9.

Figura 9: Perfil eletroforético global de valva mitral humana. Fita de IEF de 24 cm, pH 3-11NL, corado por Coomassie coloidal G-250; 650 µg de proteínas. As setas indicam as identificações de cada spot

Estas proteínas foram identificadas por ESI-qToF, tendo como parâmetros as relações massa/carga dos peptídeos, com posterior fragmentação dos íons mais intensos (Tabela 1 suplementar). Nessa tabela, as proteínas identificadas estão agrupadas por função biológica. Identificamos 63 proteínas distintas, algumas das quais presentes em mais de um “spot”, sugerindo a presença de isoformas, modificações pós-traducionais (MPTs) ou

clivagens da proteína. Dos “spots” identificados, 47 contém proteínas de matriz extracelular, 39 de citoplasma, 12 de membrana, 8 nucleares e três são proteínas mitocondriais. Destes, foi possível identificar 30 proteínas de citoplasma, 23 de matriz extracelular, 7 proteínas nucleares e três mitocondriais, segundo análise pelo IPA® (Ingenuity Pathway Analysis).

4.5. Análise da expressão diferencial das proteínas por DIGE

As diferenças na expressão proteica entre os grupos foram avaliadas nos géis bidimensionais. A combinação entre os “spots” similares nos diferentes géis foi feita de maneira automatizada com base na imagem do *pool* de cada gel (marcação com Cy2) e conferida manualmente. Os “spots” presentes em pelo menos 85% dos géis foram considerados para análise. Esta análise identificou 24 “spots” diferencialmente expressos entre os grupos, correspondendo a 28 proteínas identificadas, quando comparados dois a dois, pelo teste *t* de Student (significância estatística para $p < 0,05$). Os resultados obtidos a partir desta análise são mostrados a seguir.

4.5.1. Agrupamento das variações de expressão

A análise da variação dos “spots” foi agrupada por Diagrama de Venn, conforme a Figura 10, utilizando-se os 24 “spots” diferenciais (28 proteínas identificadas), com significância estatística ($p < 0,05$; *t-Student*). Os grupos com doença valvar (DRC-INS, DRC-EST e DMX) foram comparados ao grupo CTL. As proteínas com aumento de expressão estão identificadas por uma seta para cima e pela cor vermelha, a diminuição por uma seta no sentido contrário e

pela cor preta. Pode-se observar que não há proteína que tenha apresentado diferença de expressão nas três doenças valvares estudadas.

A Figura 10a mostra os “spots” diferenciais com as respectivas identificações proteicas, segundo a nomenclatura Swissprot. A Figura 10b mostra o número de “spots” diferencialmente expressos nos grupos, para maior clareza quanto ao compartilhamento de alterações significativas. Uma vez que as proteínas identificadas podem apresentar-se em mais de um “spot”, bem como cada “spot” pode conter mais de uma proteína, a Figura 10c apresenta a relação de proteínas diferencialmente expressas. As proteínas vimentina e proteína ácida de fibra glial (GFAP) (“spot” número 1697) apresentam-se diferencialmente expressas tanto no grupo DRC-INS quanto no DRC-EST, bem como a proteína vitronectina, que apresenta-se aumentada em “spots” diferentes nestes grupos. Observe-se que a proteína prolargina aparece no grupo DRC-EST tanto aumentada quanto diminuída, por ter sido identificada em mais de um “spot”. Não há proteína diferencialmente expressa tanto por indivíduos DRC-INS e DMX. Foi identificado um “spot” correspondendo à citoqueratina (número 1159), que consta da identificação geral das proteínas (Tabela 1 suplementar), mas que pode ser produto de contaminação, uma vez que só foi descrito em epiderme em fase terminal de diferenciação. Já considerando-se os grupos DRC-EST e DMX, duas proteínas: biglican e apolipoproteína A1, são diferencialmente expressas. Para o “spot” 1439 a presença majoritária foi das proteínas biglican e septina-2, uma vez que suas abundâncias são semelhantes, segundo o parâmetro emPAI do Mascot. Considerando todas as proteínas diferencialmente expressas entre os grupos que estão sendo mostradas na Figura 10, a maioria delas apresenta expressão alterada em um único quadro e podem representar alterações específicas de cada valvulopatia.

a)

b)

c)

Figura 10: Diagrama de Venn para os spots diferenciais. a) O Diagrama mostra os 24 spots diferenciais nos grupos (INS, EST e DMX) em relação ao grupo CTL, com as respectivas identificações protéicas. (↑): aumento na expressão; (↓): diminuição na expressão. Os spots 813 e 1765 não puderam ser identificados; b) Análise de acordo com o número de “spots”; c) Análise pelas proteínas identificadas em cada grupo. Teste estatístico: $p < 0,05$ (teste *t-Student*)

Análise do grupo DRC, compreendendo DRC-INS juntamente com DRC-EST, mostrou as alterações significativas ($p < 0,05$; teste *t de Student*) representadas na Tabela 8. Destas, 5 proteínas foram caracterizadas com expressão aumentada no grupo DRC (vimentina, GFAP, lumican, fibromodulina e vitronectina), e três proteínas diminuídas, colágeno do tipo-VI, prolargina e cadeia pesada de IgG-2.

Tabela 8: Alterações de expressão proteica observadas no grupo DRC *versus* o grupo CTL

Aumentadas	Diminuídas
Vimentina (~40 kDa)*	Colágeno VI
GFAP**	Prolargina
Lumican	Cadeia pesada de IgG-2
Fibromodulina	
Vitronectina	

* Vimentina: pode ser uma isoforma ou produto de degradação

**GFAP: Proteína Ácida de Fibra Glial

4.5.2. *Análise de agrupamento hierárquico*

O método de análise por “Agrupamento Hierárquico” (*Hierarchical Clustering*) busca padrões de expressão diferencial das proteínas independentemente do grupo a que pertencem. Devido a sua importância na resposta inflamatória e imune, além dos 25 “spots” diferencialmente expressos, foram inseridos nesta análise 3 “spots” que não apresentam diferenças de expressão significativas entre os grupos. São estes os “spots” de números 1357 – proteína C3 do complemento (DMX x DRC-INS: $p=0,05$); 1354 – Enolase A (DMX x DRC-INS: $p=0,05$); 1525 – Anexina A2 [CTL x (DRC-EST + DMX): $p=0,05$]. Estes foram inseridos porque contém proteínas importantes na resposta imune (proteína C3 do complemento e Enolase A) e uma proteína estrutural e anti-apoptótica importante (Anexina A2).

Estes resultados mostraram que cada grupo (DRC-INS, DRC-EST, DMX e CTL) apresentou um perfil diferencial distinto de expressão proteica visível

pela distribuição do aumento/diminuição da expressão de proteínas (Figura 11). O dendrograma na porção superior da Figura 11 mostrou uma primeira divisão que separa os indivíduos com DRC daqueles que não apresentam DRC (CTL e DMX). O perfil de expressão proteica também separou as amostras dos grupos DRC-INS e DRC-EST.

As proteínas estão relacionadas por similaridades nos padrões de variação de sua expressão. Pode-se observar, por exemplo, que as proteínas peroxirredoxina (“spot” 1758) e transgelina (“spot” 1790) possuem padrões de variação de expressão muito semelhantes, assim como enolase A (“spot” 1354) e a proteína C3 do complemento (“spot” 1357), biglican (“spot” 1456) e anexina A1 (“spot” 1820), bem como o “spot” número 1439 que corresponde a biglican e septina-2 com uma isoforma da vimentina (“spot” 1793). Os demais padrões de variação não se encontram tão firmemente ligados, como mostra a Figura 11.

Nesta Figura 11, no extremo direito, foram inseridas as identificações das proteínas. Os “spots” de número 813 e 1765 não foram identificados.

A análise em conjunto dos resultados de PCA e agrupamento (Figuras 10 e 11) permitiram inferir que os dois grupos de DRC, que se apresentam vizinhos nos gráficos obtidos, mesmo com lesões valvares diferentes apresentaram alterações de expressão proteica similares, e as alterações mais diversas destes são do grupo com degeneração mixomatosa, com um padrão bem diverso. O grupo de indivíduos sem valvulopatias (CTL) apresentou padrão de expressão homogêneo e diferencial intermediário entre as duas valvulopatias.

Figura 11: Agrupamento hierárquico, de acordo com a expressão proteica diferencial. Em vermelho: aumento de expressão proteica relativa; **em verde:** diminuição; **em branco:** spots não detectados. Coluna: indivíduos; Linha: proteína. As chaves na borda superior agrupam os indivíduos por similaridades de expressão e as chaves no canto esquerdo representam as proteínas, agrupadas também por similaridades de expressão. ☆denota os “spots” que não tiveram expressão diferencial nos grupos, as diferenças foram apenas individuais. O agrupamento foi feito por correlação de Pearson, com ligação completa entre as variáveis para os “spots” e para os indivíduos.

4.5.3. *Análise de componente principal (PCA)*

A análise de PCA, que avalia padrões de dispersão dentro de cada amostra, mostrou que dentro de cada grupo os padrões de expressão proteica foram semelhantes entre as amostras. Desta forma, o método de análise permitiu o agrupamento de populações semelhantes para cada grupo de estudo, conforme representado na Figura 12. Para esta análise foram incluídos somente os 24 “spots” diferencialmente expressos em relação ao grupo controle. Esta análise também mostrou grandes diferenças entre os grupos DRC-INS e DRC-EST, já em uma separação por 2 componentes. Já as amostras DMX e CTL também se apresentaram mais segregadas, conquanto mais homogêneas no conjunto das expressões proteicas. A separação por PCA tomando-se 5 componentes é capaz de distinguir estes 4 grupos.

Figura 12: Representação da distribuição por PCA segundo o grupo. Em amarelo: grupo CTL; em vermelho: o grupo DMX; em verde: o grupo DRC-INS; e em cinza: o grupo DRC-EST. Análise em 5 componentes principais, que avaliam a dispersão dos padrões de expressão proteica. Cada ponto representa um indivíduo do grupo. Os círculos pontilhados foram inseridos manualmente para facilitar a visualização dos agrupamentos.

4.5.4. Funções Biológicas Alteradas

A Tabela 9 mostra os “spots” diferenciais, com as identificações respectivas nos grupos estudados. O valor de delta refere-se ao aumento (valor positivo) ou diminuição (valor negativo) segundo o resultado do programa utilizado (Decyder). O valor de **p** foi obtido a partir do teste estatístico **t** de Student para os pares de grupos. Os processos biológicos apresentadas são provenientes de análise pelo GeneOntology, através do site PANTHER (www.pantherdb.org). As análises foram feitas a partir dos dados de expressão diferencial de “spots”, e não de proteínas, para que se possa melhor avaliar as alterações quantitativas estatisticamente significantes. Foram incluídos os

valores de “p”, calculado por t-Student, e de delta, calculado a partir da comparação da expressão no grupo em estudo em relação ao grupo CTL, conforme descrito em Materiais e Métodos (análise estatística).

Na DRC-INS (Tabela 9a), as alterações biológicas mais prevalentes foram de organização celular e resposta imune. Na DRC-EST (Tabela 9b), foram de proteínas envolvidas com metabolismo celular e na resposta imune também. Dentre as alterações observadas na DMX (Tabela 9c), a mais importante foi em relação a proteínas com papel no metabolismo celular, e outras, como endocitose, apoptose, estresse celular. As alterações biológicas compartilhadas (Tabela 9d) foram poucas e refletem alterações no metabolismo e organização celular. As funções e processos biológicos aqui descritos refletem os achados da base de dados consultada. Uma vez que estudos moleculares em valva mitral são muito escassos, não temos fundamentação experimental, até o momento, para avaliar se estas alterações são as mais importantes para as doenças estudadas.

Tabela 9: Identificação das proteínas**a)** “spots” com expressão diferencial exclusivamente na DRC-INS

Proteína	Delta	P	Nº UNIPROT	Código de Acesso	Localização Celular	Processo Biológico
Proteína ácida de fibra glial	1,38	0,014	P14136	GFAP_HUMAN	Citoplasma	Organização celular
Vimentina	1,38	0,014	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Organização celular
Vitronectina	1,38	0,014	P04004	VTNC_HUMAN	Matriz extracelular	Organização de matriz
Transgelina	2,00	0,033	Q01995	TAGL_HUMAN	Citoplasma	Contração muscular
Fragmento de citoqueratina	-2,08	0,017	P04264	K2C1_HUMAN	Citoplasma	Citoesqueleto
Prot. oligomérica de matriz de cartilagem	-1,83	0,036	P49747	COMP_HUMAN	Matriz extracelular	Organização de matriz
Colágeno do tipo VI	-1,82	0,045	P12109	CO6A1_HUMAN	Matriz extracelular	Organização de matriz

b) “spots” com expressão diferencial exclusivamente na DRC-EST

Proteína	Delta	<i>p</i>	Nº UNIPROT	Código de Acesso	Localização Celular	Processo Biológico
Fibromodulina*	1,82	0,001	Q06828	FMOD_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo
Lumican*	1,82	0,001	P51884	LUMI_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo
Albumina	2,01	0,034	Q56G89	Q56G89_HUMAN	Secretada	Transporte de proteínas
Alfa-1-antiquimiotripsina	2,01	0,034	P01011	AACT_HUMAN	Secretada	Resposta inflamatória
Fibromodulina*	2,01	0,034	Q06828	FMOD_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo
Lumican*	2,01	0,034	P51884	LUMI_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo
Vitronectina	2,01	0,034	P04004	VTNC_HUMAN	Matriz extracelular	Resp. imune: inibe complemento
Arf-GAP com domínio SH3 proteína 2	2,39	0,002	O43150	ASAP2_HUMAN	Membrana celular	Metabolismo
Similar a alfa-2-HS-glicoproteína	2,57	0,036	B7Z8Q2	B7Z8Q2_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo
Prolargina*	2,57	0,036	P51888	PRELP_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo
Proteína relacionada a haptoglobina	-4,05	0,01	P00739	HPTR_HUMAN	Secretada	Metabolismo
Prolargina*	-2,31	0,02	P51888	PRELP_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo
Prot. ligadora de fosfatidiletanolamina	-2,26	0,05	P30086	PEBP1_HUMAN	Citoplasma	Transdução de sinal
Superóxido dismutase (Cu-Zn)	-1,71	0,04	P00441	SODC_HUMAN	Citoplasma	Estresse oxidativo

*Proteínas identificadas em mais de um "spot"

c) “spots” com expressão diferencial exclusivamente na DMX

Proteína	Delta	p	Nº UNIPROT	Código de Acesso	Localização Celular	Processo Biológico
Biglican*	-1,57	0,048	P21810	PSG1_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo
Septina-2	-1,57	0,048	Q15019	SEPT2_HUMAN	Citoplasma	Divisão celular
Epsina-1	-1,73	0,026	Q9Y6I3	EPN1_HUMAN	Citoplasma e membrana	Endocitose
Lumican	-1,73	0,026	P51884	LUMI_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo
Vimentina	-1,73	0,026	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Organização celular
Transgelina	-2,09	0,034	Q01995	TAGL_HUMAN	Citoplasma	Metabolismo
Superóxido dismutase (Mn)	-2,26	0,003	P04179	SODM_HUMAN	Citoplasma	Estresse oxidativo
Anexina-A1	-2,38	0,009	P04083	ANXA1_HUMAN	Citoplasma e membrana	Anti-apoptose / anti-inflamatória
Biglican*	-2,52	0,036	P21810	PSG1_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo

*Proteínas identificadas em mais de um "spot"

d) “spots” com expressão diferencial compartilhada por mais de um grupo

	Proteína	Delta	P	Nº UNIPROT	Código de Acesso	Localização Celular	Processo Biológico
↑DRC-EST e DMX	Apolipoproteína A1	2,86	0,025	P02647	APOA1_HUMAN	Secretada	Metabolismo
↓DRC-EST e DMX	Biglican	-1,88	0,007	P21810	PGS1_HUMAN	Matriz extracelular	Metabolismo
↑ DRC-INS e DRC-EST	Proteína ácida de fibra glial	2,38	0,004	P14136	GFAP_HUMAN	Citoplasma	Organização celular
	Vimentina	2,38	0,004	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Organização celular

4.6. Validação dos Resultados de expressão diferencial

Algumas proteínas identificadas nos experimentos de 2D-DIGE, importantes para manutenção da integridade valvar, como visto anteriormente através de análises *in silico*, foram validadas por *Western Blotting* em membrana de nitrocelulose e reação com anticorpos específicos. Os grupos de validação continham: 6 indivíduos sem valvulopatia, 5 indivíduos com degeneração mixomatosa, 6 indivíduos com insuficiência mitral reumática e 6 indivíduos com estenose mitral reumática. As proteínas foram selecionadas com base na sua expressão diferencial entre os grupos, na sua importância para a estrutura da matriz extracelular e na possível relevância para a DRC. A imagem composta a partir das membranas de “blotting”, reveladas por ECL é apresentada na Figura 13.

Figura 13: Imagem representativa das membranas de *Western Blotting*.

CTL: grupo controle; DMX: grupo com degeneração mixomatosa; DRC-INS: grupo doença reumática cardíaca com insuficiência; DRC-EST: grupo doença reumática cardíaca com estenose; CO6A1: cadeia A1 do colágeno tipo VI; VTNC: vitronectina; LUMI: lumican; ACT: actina.

4.6.1. *Vimentina*

Foi observado nos experimentos de 2D-DIGE um spot com massa aparente de cerca de 40 kDa diferencialmente expresso, no qual foi identificada a proteína Vimentina. Para avaliar a relação deste “spot” com a proteína íntegra, que possui 54 kDa, nós realizamos testes de Western contra vimentina e comparamos as bandas correspondentes a duas formas mais leves desta proteína (Banda-1: 54 kDa; Banda-2: 45 kDa; Banda-3: 42 kDa). A proteína íntegra também foi visualizada nos experimentos de 2D-DIGE, entretanto não teve expressão diferencial entre os grupos. A banda-1 corresponde à proteína íntegra, e as demais a formas de degradação ou isoformas da proteína. Os resultados destas análises estão na Figura 14. Esta análise permite inferir que a banda correspondente ao “spot” 1697, diferencialmente expressa, seja a Banda-3, com 42 kDa.

Figura 14: Avaliação da expressão diferencial das diferentes bandas identificadas como Vimentina. a) Imagem das membranas após revelação, mostrando as diversas bandas de Vimentina presentes em cada amostra. **b)** Relação entre a banda de 45 kDa (Banda 2) e a de 54 kDa (Banda 1): Há aumento significativo na insuficiência reumática em relação ao grupo controle ou à DMX. **c)** Relação entre a banda de 42 kDa (Banda 3) e a de 54 kDa: há aumento significativo na insuficiência e na estenose reumáticas em relação ao controle ou à DMX. Análise estatística por t-Student

A avaliação dos íons peptídicos tripsínicos identificados por espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS) mostrou que os fragmentos peptídicos estão na região N-terminal da proteína (Figura 15). O “spot” diferencialmente expresso foi encontrado na região de cerca de 40 kDa e pI de cerca de 4,5. A proteína íntegra (VIME_HUMAN) possui massa de 53,7 kDa e pI 5,05, segundo a base de dados do UNIPROT (www.uniprot.org). Portanto,

sugere-se que haja uma quebra da proteína, mediada por enzima, ou defeito de produção, ou ainda que esta seja uma isoforma de menor massa molecular.

```

1 MSTRSVSSSS YRRMFGGPGT ASRPSSRSY VTTSTRYSL GSALRPSTSR
51 SLYASSPGGV YATRSSAVRL RSSVPGVRL QDSVDFSLAD AINTEFKNTR
101 TNEKVELOEL NDRFANYIDK VRFLEQONKI LLAELEQLK QGKSLGDLY
151 EEMRELRRQ VDQLTNDKAR VEVERDNLAE DIMRLREKLQ EEMLRREEAE
201 NTLQSFQRDV DNASLARLDL ERKVESLQEE IAFLKKLHEE EIQLQAQIQ
251 EQHVQIDVDV SKPDLTAALR DVRQQYESVA AKNLQEAEEW YKSKFADLSE
301 AANRNNDALR QAKQESTEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL ERQMREMEEN
351 FAVEAANYQD TIGRLQDEIQ NMKEEMARHL REYQDLLNVK MALDIEIATY
401 RKLLEGEESR ISLPLPNFSS LNLRETNLDS LPLVDTHSKR TLLIKTVETR
451 DGQVINETSQ HHDDLE

```

Figura 15: Representação do MASCOT para os peptídeos identificados no spot 1697, referentes a vimentina (VIME_HUMAN). A sequência corresponde aos aminoácidos que compõem a proteína. As caixas destacam as sequências cujos peptídeos (em vermelho) foram identificados por LC-ESI-MS/MS

4.6.2. Colágeno do tipo-VI

A análise dos experimentos de 2D-DIGE evidenciou um “spot” correspondendo ao colágeno do tipo VI com expressão diminuída nos indivíduos com insuficiência reumática, em cerca de 97 kDa. Os experimentos de Western Blotting mostraram duas bandas para esta proteína (Figura 16): uma mais pesada, com cerca de 100 kDa (Banda-1), e outra um pouco mais leve, com cerca de 95 kDa (Banda-2). A banda mais pesada apresentou-se diferencialmente diminuída no grupo DRC-INS. A banda mais leve não foi diferencialmente expressa. A Figura 16d mostra que a expressão total de colágeno do tipo VI está diminuída nos indivíduos com DRC.

Figura 16: Comparação da expressão de Colágeno do tipo-VI nos grupos estudados. a) Imagem das membranas marcadas para colágeno do tipo-VI (CO6A1_HUMAN); Análise densitométrica das bandas representadas: **b)** Banda 1 (com cerca de 100 kDa); **c)** Banda 2 (com cerca de 95 kDa); **d)** Grupo CTL x grupo DRC (INS e EST). Análise estatística por t-Student ($p < 0,05$: significativo)

4.6.3. Vitronectina

O proteoglicano de matriz vitronectina também foi detectado como diferencialmente expresso nos géis bidimensionais. Para confirmar sua expressão diferencial, foi realizado o experimento de Western Blotting representado na Figura 17. Nota-se que DMX e DRC-EST mostram um aumento significativo da expressão de vitronectina quando comparados ao grupo CTL, entretanto, n grupo DRC-INS não há alteração significativa na expressão de vitronectina.

Figura 17: Comparação da expressão de Vitronectina nos grupos estudados. a) Observa-se aumento da expressão de Vitronectina na DMX e na DRC-EST, comparado ao grupo CTL. b) Entre os grupos CTL e DRC, observamos aumento significativo na expressão de vitronectina. Análise estatística por t-Student ($p < 0,05$: significativo)

4.6.4. Lumican

O proteoglicano Lumican também apresentou um “spot” com expressão diferencial aumentada nos experimentos de DIGE. Os resultados da Western Blotting são apresentados na Figura 18. Ao contrário do resultado do DIGE,

esta proteína encontrou-se diminuída na DMX e na DRC-EST. Provavelmente isso ocorre porque a taxa de glicosilação de Lumican é alta, gerando pelo menos 5 *spots* diferentes nos géis de 2-DE, e o anticorpo detecta a proteína *core*, ou seja, não distingue as formas de glicosilação existentes nesta situação.

Figura 18: Expressão de Lumican nos grupos estudados. a) Os grupos DMX e DRC-EST apresentam diminuição de Lumican; b) Entre os grupos CTL e DRC, observamos diminuição significativa de lumican. Análise estatística por t-Student ($p < 0,05$: significativo)

4.7. Imunohistoquímica

Para identificar a localização e intensidade de marcação de algumas das proteínas diferencialmente expressas, foram realizadas reações de imunoperoxidase em cortes histológicos de fragmentos de valva mitral dos indivíduos dos grupos de estudo. Os resultados são mostrados a seguir.

4.7.1. *Vimentina*

O padrão de localização foi feito em comparação com o tecido valvar de indivíduo sem valvulopatia, no qual observamos marcação positiva uniformemente distribuída por todo o tecido (Figura 19a). Nos indivíduos do grupo DMX (Figura 19b), observamos a desestruturação da matriz valvar, com presença de grandes lacunas onde não há marcação de vimentina. A Figura 19c, representativa do grupo DRC-INS, apresenta marcação menos uniforme. Em pacientes com DRC-EST (Figura 19d), observamos com mais intensidade a falta de uniformidade da marcação.

Figura 19: Localização de vimentina em tecido valvar cardíaco. Técnica de imunoperoxidase, aumento 400x. Em marrom: marcação positiva para vimentina; em azul, núcleos celulares. a) Grupo controle (CTL); b) Grupo degeneração mixomatosa; c) Grupo doença reumática cardíaca com insuficiência; d) Grupo doença reumática cardíaca com estenose

4.7.2. *Colágeno tipo-VI*

O grupo controle mostra estrutura positividade difusa e homogênea para colágeno (Figura 20a). No grupo degeneração mixomatosa, observamos marcação de colágeno difusa, mas com áreas de intensidade variável (Figura 20b). Já no grupo com DRC-INS (Figura 20c) há marcação difusa e de intensidade variável desta proteína, exceto em parede vascular. Na Figura 20d, representativa de DRC-INS, e nas Figuras 20e e 20f, representativas do grupo DRC-EST, há também marcação positiva e difusa para esta proteína.

Figura 20: Localização de colágeno tipo-VI em tecido valvar cardíaco. Técnica de imunoperoxidase, aumento de 400x. Em marrom: marcação positiva para colágeno do tipo-VI; em azul, núcleos celulares. a) Grupo controle (CTL); b) Grupo degeneração mixomatosa; c,d) Grupo doença reumática cardíaca com insuficiência; e,f) Grupo doença reumática cardíaca com estenose; em c) positividade difusa, exceto em parede vascular; d,e,f) positividade difusa

4.7.3. *Lumican*

Para o proteoglicano lumican, cujo padrão de marcação no grupo CTL é apresentado na Figura 21a, se observa marcação fraca e focal no tecido valvar. A Figura 21b apresenta a marcação observada no grupo DMX, mais difusa e intensa. Nos grupos DRC-INS (Figura 21c) e DRC-EST (Figura 21d), observa-se marcação mais difusa e de intensidade variável.

Figura 21: Localização de lumican em tecido valvar cardíaco. Técnica de imunoperoxidase, aumento de 400x. Em marrom: marcação positiva para o lumican; em azul, marcação dos núcleos celulares. a) Grupo controle (CTL); b) Grupo degeneração mixomatosa; c) Grupo doença reumática cardíaca com insuficiência; d) Grupo doença reumática cardíaca com estenose

4.8. *Colocalização de colágeno do tipo-VI e lumican*

Os experimentos de microscopia confocal evidenciaram um padrão bastante distinto de distribuição das proteínas colágeno tipo-VI e lumican entre

os grupos CTL e DRC. O colágeno tipo-VI (em vermelho), e o lumican (verde). Em azul (DAPI), os núcleos celulares. No grupo CTL, a colocalização entre as duas proteínas é pouca (Figura 22a), com o colágeno localizado na região mais interna das fibras, circundado pelo lumican. Na DMX, a distribuição das duas proteínas é basicamente igual ao grupo CTL (Figura 22b). Na DRC, o colágeno tipo-VI está restrito basicamente às regiões de fibrose, onde se colocaliza com o lumican (em alaranjado na Figura 22c).

Figura 22: Colocalização de colágeno tipo-VI e lumican. Em vermelho: colágeno tipo-VI, em verde: lumican, em azul, DAPI. a) Grupo controle (CTL); b) Imagem representativa do grupo DMX, com marcação difusa de colágeno, semelhante ao grupo CTL; c,d) Imagens representativas dos grupos DRC-INS e DRC-EST, nos quais o colágeno colocaliza-se com lumican nas regiões de fibrose.

4.9. ***Alterações das vias funcionais nas doenças valvares***

As alterações metabólicas/funcionais decorrentes da expressão proteica diferencial nas doenças estudadas foram determinadas com o auxílio do *software Ingenuity Pathway Analysis*® (IPA), bem como a localização celular das proteínas. Sumariamente, o IPA cria uma rede de interações entre as moléculas (proteínas, cofatores, genes, mRNA, microRNAs) em estudo, a partir de um banco de dados regularmente atualizado, conectando-as entre si e com moléculas-chave de vias funcionais implicadas, mesmo que essas não tenham sido alvo do estudo. As conexões resultantes são analisadas de acordo com as vias funcionais em que se enquadram. As representações das redes de interação observadas são mostradas nas Figuras 23 a-d, segundo o compartimento celular: núcleo, citoplasma, membrana citoplasmática e espaço extracelular. Todas as proteínas constantes da Análise de Venn (Figura 10) foram inseridas nesta análise, para que fosse possível analisar todas as possibilidades de redes de interações. Desta forma, foi inserido um total de 28 proteínas identificadas, e as expressões diferenciais em cada grupo foram avaliadas. A rede de interações é automaticamente ajustada para contemplar 35 moléculas em cada análise, para maior significância biológica dos resultados, segundo as informações do próprio programa. As redes mostradas usam não somente as proteínas diferencialmente expressas, alvo das buscas, mas também mostra outras proteínas envolvidas na rede de interações construída pelo programa, que podem ter sido identificadas nas amostras estudadas por DIGE, ou não. As moléculas envolvidas, mas não identificadas no nosso estudo, aparecem em fundo branco nas figuras. Para a avaliação das

diferenças de expressão, são usados os mesmos valores fornecidos pelo Decyder™, com o qual avaliamos as diferenças de expressão nos géis bidimensionais. Esses valores são inseridos no formato de tabela de expressão diferencial, sempre comparados ao grupo CTL, e o resultado da análise é uma rede de interações. O objetivo desta análise é melhor avaliar as redes de interação entre as proteínas para verificar quais proteínas podem ocupar papéis importantes nas alterações metabólicas e estruturais celulares nas doenças avaliadas.

A Figura 23a permite observar que o maior número de moléculas presentes em interações diferenciais do grupo DRC (incluindo DRC-INS e DRC-EST) está localizado no espaço extracelular, com 16 proteínas, das quais quatro foram identificadas nos experimentos de DIGE (apolipoproteína A1, lumican, colágeno do tipo VI e prolargina), no citoplasma foram identificadas vimentina e citoqueratina-1, no núcleo foi identificado o fator indutor de desenvolvimento e diferenciação-2 (ASAP2) e em local não definido, a citoqueratina, que, inclusive, não participa de interações importantes na via estudada, como pode ser observado na Figura 23a. Este grupo apresenta um total de 7 proteínas diferencialmente expressas envolvidas na rede de interações que são sugestivas de ativação da apresentação de antígeno, resposta imune humoral e resposta inflamatória (apolipoproteína A1, fator de desenvolvimento e diferenciação-2, colágeno do tipo VI, citoqueratina-1, lumican, prolargina e vimentina), segundo análise pelo IPA, com *score* de 21, que significa que a chance de a rede formada ser ao acaso é de 1×10^{-21} . Os principais “nós” desta rede correspondem às moléculas: vimentina, com 14 interações; TNF-alfa, com 13 interações; e alfa-catenina, com 10 interações.

A Figura 23b mostra a rede de interações alteradas no grupo de pacientes com DRC-INS, exclusivamente. Observa-se que o maior número de moléculas presentes em interações diferenciais está dividido entre o citoplasma e o espaço extracelular, com 11 proteínas em cada. Das proteínas identificadas por DIGE, três estavam presentes no espaço extracelular e cinco no citoplasma. Neste grupo foram observadas alterações de 7 proteínas diferencialmente expressas envolvidas na rede de interações que levam a alterações funcionais relacionadas a desenvolvimento e organização celular, que são colágeno do tipo VI, proteína oligomérica de matriz, proteína ácida de fibra glial, citoqueratina 1, transgelina, vimentina e vitronectina. O *score* para estas alterações é de 23. O TGF-beta parece ser fundamental para esta rede de interações, devido à sua interação direta e positiva sobre as duas proteínas diminuídas na matriz, proteína oligomérica de matriz (COMP) e colágeno do tipo VI. Os principais “nós” desta análise corresponderam às moléculas: vimentina, com 18 interações; TGF-beta, com 16; e transgelina, com 9 interações.

Já na estenose mitral reumática (Figura 23c) as principais alterações foram sugestivas de metabolismo de lipídeos, bioquímica de pequenas moléculas e movimentação celular, com *score* de 44 e as seguintes proteínas identificadas pelo DIGE: alfa-glicoproteína ácida, albumina, apolipoproteína A1, biglican, fibromodulina, proteína ácida de fibra glial, proteína relacionada a haptoglobina, cadeia pesada 1 e 2 de IgG, lumican, proteína ligadora de fosfatidiletanolamina, serpina-3, superóxido dismutase (Cu/Zn), vimentina e vitronectina. O compartimento com maior número de proteínas envolvidas foi o espaço extracelular, com 15 proteínas, das quais 10 foram identificadas no

DIGE. Além destas, mais 8 proteínas foram identificadas na rede de interações, sendo 4 de membrana e 4 citoplasmáticas. É importante observar que o NF- κ B (intranuclear) e a p38-MAPK (intracitoplasmática) interagem com a maioria das proteínas dos diversos compartimentos. Esta rede de interações sugere que os nós principais sejam: NF- κ B, com 19 interações; ERK, com 16 interações; MAPK, com 14 interações; e TGF-beta, com 11 interações.

Na degeneração mixomatosa, as alterações de expressão mais significativas ocorreram nas vias envolvendo morte celular, metabolismo de lipídeos e bioquímica de pequenas moléculas, com *score* de 26, e 9 proteínas identificadas por DIGE envolvidas: anexina A1, apolipoproteína A1, biglican, citoqueratina-1, lumican, septina-2, superóxido dismutase (Mn), transgelina e vimentina, e *score* de 46. O compartimento com maior número de proteínas com expressão alterada foi o citoplasma, com 14 no total, das quais cinco foram diretamente identificadas, conforme a Figura 23d, três proteínas localizadas no espaço extracelular e uma na membrana. Da mesma maneira que na DRC, a rede sugere que os “nós” mais significativos sejam: ERK e NF- κ B, com 14 interações cada, alfa-catenina, com 12 interações, MAPK, com 10; e MMP-13, com 7 interações.

Figura 23a: Representação gráfica da rede de interações entre as proteínas diferenciais na DRC (INS e EST). Verde: proteínas com expressão diminuída; **Vermelho:** aumentada. Retângulo à direita: proteínas com localização desconhecida, ou não específica. **Setas contínuas:** interações diretas; **tracejadas:** indiretas; **verde:** supressão; **vermelho:** indução

Figura 23b: Representação gráfica da rede de interações entre as proteínas diferenciais na DRC-INS. Verde: proteínas com expressão diminuída; **Vermelho:** aumentada. Retângulo à direita: proteínas com localização desconhecida, ou não específica. **Setas contínuas:** interações diretas; **tracejadas:** indiretas; **verde:** supressão; **vermelho:** indução

Figura 23c: Representação gráfica da rede de interações entre as proteínas diferenciais na DRC-EST. Verde: proteínas com expressão diminuída; **Vermelho:** aumentada. Retângulo à direita: proteínas com localização desconhecida, ou não específica. **Setas contínuas:** interações diretas; **tracejadas:** indiretas; **verde:** supressão; **vermelho:** indução

Figura 23d: Representação gráfica da rede de interações entre as proteínas diferenciais na DMX. Verde: proteínas com expressão diminuída; **Vermelho:** aumentada. Retângulo à direita: proteínas com localização desconhecida, ou não específica. **Setas contínuas:** interações diretas; **tracejadas:** indiretas; **verde:** supressão; **vermelho:** indução

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho compara o perfil de expressão proteica do tecido valvar em lesões decorrentes da doença reumática cardíaca (DRC), e da degeneração mixomatosa (DMX), ambos em fase avançada. Os resultados são inéditos e indicativos de que a expressão diferencial de algumas proteínas pode estar relacionada à desestruturação da matriz, representada pelas alterações quantitativas de colágeno do tipo-VI, lumican, vitronectina, biglican, fibromodulina e proteína oligomérica de matriz de cartilagem (COMP), principalmente. Nossa análise por 2-DE possibilitou a identificação de 451 *spots* comuns nos géis analíticos, sendo que destes, 24 “spots” foram diferencialmente expressos no tecido valvar, conforme já mencionamos, em função do quadro clínico, correspondendo a 28 proteínas. Além destas, identificamos outras proteínas adicionais, que permitiram complementar o painel proteico presente nos diferentes grupos.

O processo autoimune na DRC envolve alterações de várias outras proteínas, como a vimentina, que apresentou aumento de expressão de uma isoforma de 40 kDa, possivelmente produto de degradação ou clivagem, uma vez que a proteína íntegra possui 54 kDa. Também houve diminuição da expressão de colágeno do tipo-VI, principalmente no processo que leva à insuficiência valvar (DRC-INS). Interessantemente, na estenose mitral (DRC-EST) e na degeneração mixomatosa (DMX) houve aumento de expressão de vitronectina, provavelmente envolvida no processo de rigidez valvar ⁽¹⁴⁹⁾. O lumican encontrou-se diminuído na DMX e na DRC-EST apesar

de possuir alguma isoforma, representada por um “spot” diferencial, aumentada somente no grupo DRC(INS+EST), quando comparada ao grupo CTL. As análises computacionais em busca de vias que conectem as proteínas identificadas com expressão diferencial em cada valvulopatia sugeriram diversas alterações na estrutura da matriz extracelular, na membrana das células, em processos citoplasmáticos e mesmo em fatores de transcrição nucleares, específicos para cada valvulopatia. Um número relativamente pequeno de alterações quantitativas foi compartilhado entre as proteínas identificadas, provavelmente correspondentes a processos lesivos comuns.

Estudo anterior mostrou que algumas proteínas diferencialmente expressas, como a vimentina, podem ser alvo de resposta por linfócitos T infiltrantes de valvas em pacientes com DRC ⁽¹⁵⁰⁾. É possível inferir que outros mecanismos de mimetismo molecular, espalhamento de epitopos e degeneração do TCR parecem estar envolvidos na sua patogênese ⁽²⁴⁾. Tais mecanismos compreendem o reconhecimento compartilhado de proteínas da bactéria causadora da orofaringite e proteínas cardíacas por clones de linfócitos T, principalmente infiltrantes das valvas, onde os danos são mais graves e as lesões progressivas, conforme ocorrem os episódios de reagudização da doença. Já a degeneração mixomatosa é uma doença de curso degenerativo e de caráter não-inflamatório, na qual as alterações protéicas possivelmente estejam relacionadas com a patogênese da doença. Há poucos estudos que abordem sua patofisiologia a partir de fragmentos valvares humanos, sendo os modelos caninos os mais estudados. No presente trabalho, identificamos diversas proteínas intra e extracelulares com expressão alterada e que certamente estão envolvidas no processo autoimune da DRC,

bem como no metabolismo celular em decorrência de DRC e DMX e que certamente contribuem para uma melhor compreensão da patofisiologia destas doenças crônicas, altamente debilitantes, de alta mortalidade, de etiologias diversas.

A análise proteômica baseada em gel de SDS-PAGE para separação de proteínas em tecidos ricos em matriz extracelular, como é o caso da valva mitral, tem algumas dificuldades técnicas intrínsecas ao material, como baixo rendimento proteico e presença maciça de interferentes que tanto podem se ligar às proteínas quanto interferir na separação eletroforética e identificação espectrométrica. A padronização de um método que permitisse uma boa separação de proteínas por gel de SDS-PAGE com marcação por DIGE, por ser inédita neste tecido na época em que foram realizados os experimentos, demandou bastante tempo. A fim de se avaliar mais profundamente as proteínas envolvidas na progressão da doença foi utilizado material de valva mitral humana em fase de comprometimento avançado no presente estudo. Os resultados obtidos após a padronização mostraram géis reproduzíveis, com resolução que permitiu a análise proteômica subsequente, sendo bastante encorajadores. No presente trabalho, a eletroforese bidimensional tornou-se uma ferramenta importante por possibilitar a estimativa do envolvimento de modificações pós-traducionais na geração de neoautoantígenos na DRC, bem como a análise de fenômenos inesperados, como migração anômala de proteínas ⁽¹⁵¹⁾. Tal foi o caso do lumican, que apresentou um único “spot” diferencialmente aumentado na DRC-EST, e a confirmação por *Western Blotting* revelou diminuição quantidade total da proteína.

Padrões moleculares das doenças

A análise do tecido valvar de pacientes com DMX permitiu detalhar quais seriam as semelhanças e diferenças na expressão proteica desta doença de etiologia diversa, mas pouco estudadas, em relação à DRC. Os estudos de patogênese da degeneração mixomatosa são realizados principalmente em modelos animais e mostram alterações degenerativas e acúmulo de material fibroso nas valvas mitral e aórtica ^(94, 98, 152). Ao mostrar que as amostras de cada grupo clínico se agrupavam, e a ordem esperada de diferença (DMX mais próximo de CTL, DRC mais distante) indicou que os perfis de expressão proteica eram específicos para cada doença. Nossos resultados de agrupamento hierárquico (*Hyerarchical Clustering*) indicam mecanismos diversos de iniciação e/ou de manutenção das lesões valvares. A comparação das expressões proteicas valvares entre DRC e DMX resulta, em grande parte, em alterações opostas. Tal achado é inédito, e nos leva a crer que os mecanismos de lesão são diversos em cada doença. Outros tecidos afetados por doenças reumáticas, como articulações e cartilagens foram anteriormente estudados por abordagens proteômicas. Dadas as dificuldades técnicas de sua análise por eletroforese bidimensional, foram propostas como alternativas estratégias livres de gel, devido ao baixo rendimento proteico e à grande quantidade de matriz extracelular ⁽¹⁵³⁾. Entretanto, essas abordagens não permitem a avaliação da presença de Modificações Pós-Traducionais (MPTs, como glicosilação, citrulinização, fosforilação, oxidação, entre outras), que podem ser importantes para o estudo molecular das doenças. Muitas proteínas foram encontradas em mais de um “spot”, bem como cada “spot” podia conter mais de uma proteína.

Proteínas presentes em mais de um “spot”, com diferentes massas moleculares e / ou pontos isoelétricos, podem representar isoformas, MPTs, ou até mesmo artefatos da técnica.

Com a análise de 5 componentes principais (PCA) foi possível separar claramente os 4 grupos de estudo (DRC-EST, DRC-INS, CTL e DMX), conforme a Figura 10. Além disso, a análise de agrupamento hierarquizado (“Hierarchical Clustering”) mostrou um claro padrão dentro de cada grupo (Figura 11), indicando que cada expressão protéica diferencial é específica para cada quadro patológico. Foram inseridos, para esta análise, três *spots* que contém proteínas importantes para a patogenia de doenças autoimunes que, no entanto, tiveram expressão diferencial limítrofe entre os grupos, de acordo com a análise estatística realizada. Foi incluída a proteína C3 do complemento (CO3_HUMAN), que é uma proteína importante na resposta imune celular e humoral, descrito anteriormente como de fundamental importância no processo de lesão à valva ⁽⁵⁶⁾. A proteína enolase A (ENOA_HUMAN) foi inserida por estimular a ativação de plasminogênio na membrana de leucócitos ⁽¹⁵⁴⁾, aumentando fibrose e degradação de elementos de matriz, e por estar envolvida na cascata de ativação de células T ⁽¹⁵⁵⁾. A proteína anexina A2 (ANXA2_HUMAN) é da mesma família que a anexina A1, identificada como diferencialmente expressa em pacientes com DMX. Esta proteína tem função importante na manutenção da estrutura celular e na ativação de células endoteliais ⁽¹⁵⁶⁾. Em concordância com a PCA, os resultados desta análise permitiram uma distinção entre os indivíduos com e sem DRC. Permitiu ainda que observássemos diferenças entre o grupo controle e os indivíduos com

degeneração mixomatosa (DMX). Outro achado interessante foi o fato de indivíduos com DRC apresentarem perfil proteico diverso de acordo com a disfunção valvar, em estenose (DRC-EST) e insuficiência (DRC-INS).

Tomados em conjunto, estes resultados mostram que as diferenças de expressão proteica são importantes para classificar valvas mitrais acometidas pelas valvulopatias estudadas e têm potencial para atuar como biomarcadores destas doenças.

Proteínas especificamente envolvidas em cada doença

A partir do conjunto de proteínas identificadas, pudemos constatar que a maioria é de proteínas de matriz extracelular e secretadas. Tais resultados são concordantes com trabalhos anteriores, mostrando que o tecido valvar é majoritariamente composto por matriz de colágenos e proteoglicanos ⁽⁷⁸⁾. Foi interessante observar que foram encontradas muitas proteínas secretadas no material estudado, provavelmente devido a fenômenos de adsorção a moléculas de matriz. Sua presença já foi observada em estudos proteômicos anteriores em tecidos cartilagosos ^(140, 157) e mesmo em valvas cardíacas ⁽⁷⁸⁾. Esta adsorção provavelmente reflete diretamente a concentração plasmática das proteínas, uma vez que mecanismos de adsorção ocorrem em razão estequiométrica.

Exclusivamente na DRC-INS, em relação ao grupo CTL, duas proteínas estão diminuídas (colágeno do tipo VI e proteína oligomérica de matriz) e duas estão aumentadas (vimentina e transgelina). Já na DRC-EST, 7 proteínas

estão aumentadas (lumican, antiqumiotripsina, fibromodulina, prolargina, ASAP2 e dois “spots” com proteínas não identificadas) e 5 estão diminuídas (prolargina, cadeia pesada de IgG, proteína ligadora de fosfatidiletanolamina, superóxido dismutase (Cu/Zn), proteína relacionada a haptoglobina e peroxirredoxina), mostrando alterações proteicas específicas e distintas para cada disfunção valvar decorrente de DRC. Estudos que comparem molecularmente as alterações decorrentes desses dois tipos de lesão valvar reumática são inexistentes até onde sabemos, os que existem são principalmente de associação genética ou estudos clínicos^(50, 99). Estes resultados, que mostram proteínas diferencialmente expressas entre os grupos DRC-INS e DRC-EST, em relação a valvas sem doenças, indicam processos bastante distintos, sendo que na estenose há mais proteínas envolvidas.

Na DMX, 5 proteínas apresentam-se com expressão diminuída (septina-2, superóxido dismutase (Mn), transgelina, anexina A1 e vimentina). Estes resultados são indicativos de mecanismos diversos envolvidos no desencadeamento das lesões valvares, e na DMX são bastante diferentes da DRC.

Outra observação intrigante foi a presença de apenas um pequeno número de alterações protéicas valvares compartilhadas por mais de um grupo. Não observamos alterações proteicas compartilhadas pelos 3 grupos, ou por DRC-INS e DMX. Já nos grupos com DRC-EST e DMX, a apolipoproteína A1 estava aumentada, enquanto que biglican estava diminuída. Uma vez que nossos resultados foram obtidos em fragmentos de tecido valvar intensamente comprometido pelas doenças citadas, a presença de alterações específicas para a sua patogênese, muitas delas inéditas, foi muito interessante, porque a

fibrose e a calcificação são, a princípio, desenlaces finais comuns a muitas lesões, não só valvares.

Além disso, observamos que a proteína ácida de fibra glial (GFAP) e a vimentina, bem como a vitronectina, estavam aumentadas na DRC, tanto na insuficiência quanto na estenose valvar. Interessantemente, a vimentina (com massa de 54 kDa para a forma íntegra) apresentou massa molecular inferior, e corresponde possivelmente a uma forma degradada ou clivada, conforme os resultados apresentados, pois sua migração ocorreu na região de 40 kDa nos géis, e não foram identificados peptídeos de sua região C-terminal. A proteína íntegra também foi detectada nesses géis, bem como migração em pesos intermediários. A imunohistoquímica mostrou que a localização tecidual de vimentina é regularmente distribuída no tecido, ocorre um ligeiro aumento de marcação na região perivascular nas regiões de neoformação de vasos na DRC, como é de se esperar para esta proteína, bastante expressa em vasos sanguíneos ⁽¹⁵⁸⁾.

Nenhuma alteração de expressão proteica foi compartilhada entre os 3 grupos, para nenhuma proteína, conforme análise do Gráfico de Venn. No entanto, uma mesma proteína pode encontrar-se aumentada ou diminuída em função do “spot” em que foi encontrada, podendo indicar diferentes isoformas ou modificações pós-traducionais (MPTs), que podem estar diferencialmente envolvidas na patogênese das doenças.

Redes de interação

A análise computacional das redes de interação entre as proteínas nos diferentes compartimentos celulares permitiu observar que a maior diversidade

de proteínas diferencialmente expressas encontra-se no citoplasma, dada a complexidade dos processos metabólicos que ocorrem nesse compartimento. A análise dos processos biológicos e interações moleculares alteradas, através do Ingenuity Pathway Analysis ® (IPA), permitiu uma avaliação mais detalhada desses resultados. Nossos resultados de 2D-DIGE indicaram o aumento de expressão em um “spot” de lumican, no grupo DRC(INS+EST). Entretanto, os resultados de validação mostraram que a proteína como um todo está diminuída na DRC-EST e na DMX. Esta proteína pode levar a um aumento de MBL2 mediado pelo aumento de TNF-alfa ⁽¹⁵⁹⁾. Trabalhos anteriores mostraram que indivíduos com genótipos produtores de altas quantidades de MBL2 têm associação com prognóstico desfavorável na DRC ⁽¹⁶⁰⁾, com evolução para estenose, bem como o aumento de TNF-alfa no tecido valvar ⁽¹²⁾. É possível que esta diminuição de da expressão total do lumican nos grupos DRC-EST e DMX seja resultado da fase tardia em que foram obtidas as amostras, ou que haja algum componente genético que altere a produção desta proteína. Nesses indivíduos, mesmo o aumento de apolipoproteína-A1, que regularia negativamente MBL2, via diminuição do TNF-alfa ⁽¹⁶¹⁾, não deve ser suficiente para manter baixos níveis desta lectina, talvez devido ao genótipo de alta expressão desta molécula observado em muitos deles. Outra molécula que se liga diretamente a apolipoproteína-A1 é o domínio 4G de lectina do tipo C (CLEC4G), e está envolvida no reconhecimento de carboidratos no meio extracelular ⁽¹⁶²⁾. Adicionalmente, é descrita interação molecular entre prolargina e colágeno do tipo-I com ligação molecular entre as duas proteínas e formação de uma membrana basal ⁽¹⁶³⁾. Logo, a observação de diminuição de prolargina pode estar relacionada com a desorganização da matriz valvar. É importante

observar que colágeno do tipo-VI está diminuído, segundo os resultados do presente trabalho, nas valvas do grupo de indivíduos com DRC-INS. Foi descrito anteriormente que essa proteína está amplamente distribuída em valvas cardíacas e sua diminuição contribui para a desorganização valvar ⁽¹⁶⁴⁾. Nossos resultados também levam a sugerir o papel central da alfa-catenina na DRC(INS+EST), localizada como um importante “nó” nas interações, uma vez que esta se liga de maneira importante à vimentina no citoplasma. A alfa-catenina é uma proteína que funciona como ponte entre os receptores de adesão de caderina e o citoesqueleto, e atua na ligação célula-a-célula ⁽¹⁶⁵⁾. Logo, sua alteração quantitativa está envolvida com uma atividade alterada de recrutamento e adesão de endoteliócitos.

Não existem, atualmente dados que correlacionem alfa-catenina e desenvolvimento de DRC. Possivelmente os resultados aqui apresentados, que correlacionam a alfa-catenina com as lesões valvares características da DRC, iniciem um novo campo de estudo a respeito do mecanismo subjacente ao desenvolvimento de lesões na valva mitral na DRC, e dos processos que levam à insuficiência ou à estenose mitral, uma vez que esta é uma proteína bastante expressa em endoteliócitos e envolvida na sua adesão.

Interessantemente, observamos aumento da proteína ácida de fibra glial (GFAP) na DRC-INS, proteína bastante expressa em fibroblastos e que é regulada negativamente pelo TGF- β 1, que por sua vez está aumentado na estenose valvar, conforme descrito anteriormente ⁽¹⁶⁶⁾. O TGF- β 1 está localizado em uma região importante de nó na DRC-EST: é possível que uma diminuição do TGF- β 1 esteja ocorrendo, e, como consequência, o aumento de

GFAP. O grupo exclusivamente com insuficiência valvar (DRC-INS), apresenta diminuição de duas proteínas importantes para manutenção da estrutura valvar, o colágeno do tipo VI e a proteína oligomérica de matriz de cartilagem (COMP). Uma vez que estas proteínas não possuem interação direta ^(167, 168), podemos especular que a diminuição de TGF- β 1 pode estar envolvida com a expressão diminuída de COMP e colágeno do tipo-VI, e com a progressão do dano valvar. Até o momento, foram estudadas somente associações genótípicas desta citocina ^(12, 169) com o desenvolvimento de DRC. Estes resultados estão em acordo com estudos anteriores, que mostram correlação entre indivíduos com genótipos produtores de altas quantidades de TGF- β somente na DRC-EST ⁽¹⁶⁹⁾.

Já nos pacientes com DRC-EST, observamos expressão protéica diminuída da superóxido dismutase-Cu/Zn (SODC) e da proteína ligadora de fosfatidiletanolamina (PEBP1), provavelmente pela ativação da via NF- κ B, uma vez que tanto SOD-mit quanto a PEBP1 são negativamente reguladas por este fator de transcrição. É possível, também, haver aumento da ativação de TGF- β nesta situação, uma vez que LDL oxidado, vimentina e p38-MAPK são indutores de sua ativação. O TGF- β regula positivamente a expressão de biglican ⁽¹⁷⁰⁾, entretanto este proteoglicano tem expressão diminuída na EST. Mecanismos de degradação ou de perda de sustentação da matriz podem ser responsáveis por esta diminuição da expressão de biglican. É interessante também notar a diminuição de imunoglobulinas do tipo G (IgG) aderidas à valva nesta situação, quando comparado ao CTL. É provável que o dano valvar se mantenha nesta fase avançada da EST por mecanismos imunes pouco

dependentes de anticorpos, ou pelo aumento de *stress* celular, como se observa pela diminuição da SOD (Mn) ^(171, 172).

Em relação ao grupo DMX, as proteínas diminuídas nesta condição foram, septina-2, biglican, superóxido dismutase-Mn (SOD-Mn), transgelina, anexina A1 e vimentina. Foi descrito anteriormente aumento de proteases nesta doença, tanto por métodos proteômicos quanto transcriptômicos, em tecidos de modelos animais ^(3, 93, 173). Apesar de não ser possível uma correlação direta, nossos resultados de diminuição da expressão de proteínas estruturais pode indicar que a ação de proteases nesta doença seja diferente da DRC. O aumento observado de LDL neste tecido pode estar relacionado ao aumento do receptor relacionado ao LDL do tipo 5 (Lrp5), relatado em valvas acometidas por DMX ⁽⁸⁹⁾. Temos ainda a diminuição de SOD (Mn), indicando aumento do “stress” oxidativo na DMX. A diminuição de SOD (Mn) também pode ser responsável pelo aumento de expressão e ativação de metaloproteases, entre elas a MMP13 e de MMP2 ⁽¹⁷⁴⁾, que estão envolvidas na mixomatogênese ⁽¹⁷⁵⁾. A diminuição de septina A2 causa diminuição na capacidade de motilidade das células e de sua divisão ⁽¹⁷⁶⁾. Duas proteínas estruturais, a vimentina e a transgelina, estão diminuídas, e indicam menor manutenção estrutural do citoesqueleto e da matriz extracelular (devido à diminuição de lumican e de biglican), e da membrana plasmática dos fibroblastos (pela diminuição de Anexina-A1).

O aumento observado de expressão de Apolipoproteína-A1 na DRC-EST e na DMX já foi amplamente mostrado no contexto de doenças autoimunes, e, principalmente, por seu papel fundamental no risco cardiovascular ^(177, 178),

entretanto, ainda não havia sido descrito seu aumento na DMX. Seu aumento já foi observado por métodos proteômicos na estenose de aorta ⁽¹⁷⁹⁾, por análise em 2D-DIGE do tecido humano. Foram observados anticorpos anti-apolipoproteína-A1 em pacientes com lupus eritematoso sistêmico e com síndrome antifosfolípides ⁽¹⁸⁰⁾. Como é uma proteína de fase aguda, e envolvida na ligação com muitas proteínas plasmáticas, é possível que o aumento desta proteína esteja relacionado ou com a apresentação de antígenos exacerbada, quanto com o desequilíbrio no metabolismo de lipídios.

Os resultados aqui descritos pela primeira vez mostram alterações protéicas e metabólicas, pela análise da rede de interações das moléculas diferencialmente expressas, como alterações no metabolismo de lipídeos na DMX, morte celular e processos envolvendo bioquímica de pequenas moléculas. Um estudo recente bastante abrangente de expressão de proteínas em modelo de DMX em cães, por iTRAQ ⁽⁹⁴⁾, avaliou a expressão diferencial de muitas proteínas, com alterações de desenvolvimento celular e aumento de enzimas proteolíticas.

Outras alterações são exclusivas da doença reumática cardíaca com insuficiência valvar (DRC-INS), tais como desenvolvimento e morte celular, e o envolvimento da alfa-catenina. Na estenose valvar (DRC-EST), são metabolismo de lipídeos, bioquímica de pequenas moléculas e movimentação celular. Além disso, algumas alterações qualitativas de proteínas também podem estar correlacionadas com a autoimunidade, como a degradação da vimentina, que possivelmente leva a neoformação de vasos. Mecanismos envolvendo modificações pós-traducionais também podem produzir

autoanticorpos e causar aumento da degradação de proteínas em doenças autoimunes ⁽¹⁸¹⁾, ou alteração funcional da proteína. A presença de anticorpos reativos a algumas das proteínas identificadas é condizente com as alterações de expressão proteica na DRC, decorrente de mecanismos de autoimunidade. As alterações quantitativas foram também compatíveis com os dados da literatura, entre eles a resposta inflamatória e imune na DRC ^(182, 183).

Como o tecido estudado é rico em matriz extracelular, é possível que a expressão aberrante de substâncias desta matriz, ou de fragmentos destes, derivados de processos de remodelamento, possa ativar processos imunes e aumentar a sobrevivência de células ativadas, modulando quimiotaxia e diferenciação ⁽¹⁸⁴⁾. Ativação de metaloproteinases que clivam seletivamente matriz extracelular, gerando fragmentos bioativos, levando à ativação de mecanismos de apoptose e comprometimento da integridade tecidual também são sugeridos pelos nossos estudos de vias de interação e processos biológicos. Adicionalmente, citocinas inflamatórias podem alterar síntese e remodelamento de elementos da matriz. Desta forma, os elementos e proteínas extracelulares podem estar envolvidos na progressão da doença valvar, quer na DRC ou na DMX.

Modificações pós-traducionais que podem ter implicações nas doenças

O controle de modificações pós-traducionais em múltiplos sítios nas proteínas modula sua atividade ou degradação, bem como sua interação com outras proteínas ou com substâncias de matriz extracelular. Instrumentos modernos de espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática podem auxiliar a estudar estes fenômenos importantes para o entendimento do funcionamento de eucariotos ⁽¹⁸⁵⁾. O entendimento desses mecanismos,

através de estudos de proteômica, é muito importante para a melhor compreensão da formação de autoantígenos. Entretanto, a modificação predita para as proteínas extracelulares identificadas em nosso estudo é, basicamente, a glicosilação, que tecnicamente é bastante difícil de comprovar. A proteína em sua forma nativa (“core”) pode sofrer alterações de glicosilação com grande variabilidade de composição química dos açúcares e ter sua localização bastante alterada em géis 2-DE. Os métodos de detecção e identificação dessas modificações também são bastante difíceis, quer por espectrometria de massas, quer por ligação a anticorpos específicos.

Peptídeos citrulinados da filagrina, por exemplo, são reconhecidos em sequências específicas por soro de 76% dos pacientes com artrite reumatoide, com especificidade de 96%. Estes anticorpos purificados por afinidade foram reativos por imunofluorescência no teste do fator perinuclear e teste antiqueratina, sendo positivo para filagrina, somente ⁽¹⁸⁶⁾. Em pacientes com artrite reumatoide portadores do HLA-DR4, peptídeos de vimentina citrulinados são reconhecidos por células T ⁽¹⁸¹⁾. Não pudemos, entretanto, confirmar a presença de citrulinação tecido-específica na DRC, que pudesse estar envolvida com o aumento de sua degradação.

A citrulinação é um processo que também tem sido bastante relacionado com o desenvolvimento de doenças autoimunes, como esclerose múltipla, artrite reumatoide e mal de Alzheimer ⁽¹⁸⁷⁾. Ocorre fisiologicamente, marca diferenciação terminal epitelial, regulação da expressão genética, e apoptose. Várias proteínas podem ser citrulinadas pelas enzimas da família das PAD (peptidil arginina-deaminases) ⁽¹⁸⁸⁾, entre elas a vimentina, levando a formação de um neo-autoantígeno em indivíduos susceptíveis a artrite reumatoide ⁽¹⁸⁹⁾.

Métodos proteômicos específicos, além do uso de anticorpos, podem ser utilizados para detecção e quantificação desta modificação pós-traducional ⁽¹⁹⁰⁾. É possível que MPTs levem à formação de neo-autoantígenos, principalmente a partir das proteínas vimentina, colágeno do tipo VI, e lumican. Entretanto, nenhum estudo até o momento correlacionou MPTs, como a citrulinização, ou glicosilação, com o desenvolvimento de DRC, quer por predisposição genética a formar determinada MPT, ou por etapa do ciclo de diferenciação celular que acumule uma dessas alterações.

Adicionalmente, é conhecida a importância da glicosilação e da citrulinização do colágeno tipo II no seu reconhecimento por células T e B, e sua correlação com doenças autoimunes, além do mecanismo pelo qual as peptidil-arginina deamidases (PADs) transformam arginina em citrulina nas proteínas já formadas ⁽¹⁹¹⁾. A alfa-enolase citrulinada, já descrita como autoantígeno na artrite reumatoide, provoca citrulinização em células HL-60 pela ação de PAD. Nesse mesmo trabalho, por “Western Blotting”, foi avaliado o seu reconhecimento em pacientes com artrite reumatóide e controles, além de ter sido identificada uma banda de 47 kDa por imunotransferência em gel unidimensional seguida de identificação por espectrometria de massas ⁽¹⁹²⁾, compatível com alfa-enolase.

É necessária uma melhor compreensão da interação entre MPTs e os mecanismos autoimunes da DRC para determinar se: 1) citrulinização é um fenômeno associado à patogênese da doença, no qual o reconhecimento de uma forma modificada (p. ex. citrulinada) da vimentina levaria à sua degradação, 2) se a degradação da vimentina nesses indivíduos geneticamente suscetíveis

pode favorecer a apresentação de um autoantígeno, ou ainda 3) mecanismos de espalhamento de epítipo estejam envolvidos com determinadas formas de MPTs ⁽¹⁹³⁾. A partir desses conhecimentos, é possível que se possa desenvolver um método que detecte alterações em proteínas plasmáticas. Métodos que utilizem anticorpos contra proteínas ou peptídeos especificamente alterados na DRC, como ELISA de captura, técnicas de multiplexação, microarranjo de proteínas ou mesmo detecção por espectrometria de massas para metabólitos com concentração muito baixa ^(194, 195).

Implicações patogénicas das proteínas diferencialmente expressas

Em um estudo pioneiro foi mostrado que há um intenso infiltrado inflamatório no miocárdio e nas valvas acometidas por DRC, com presença de linfócitos, principalmente T CD4+, que reconhecem antígenos da proteína M estreptocócica e proteínas cardíacas simultaneamente por mimetismo biológico ⁽⁴⁷⁾. É possível, a partir dos conhecimentos já adquiridos sobre estas valvulopatias, e do presente estudo sobre expressão diferencial de proteínas em função do processo autoimune, hipotetizar algumas das proteínas-alvo das lesões em valvas mitrales acometidas por DRC, bem como propor mecanismos de patogênese da DMX, uma vez que são escassos os trabalhos que tratem das alterações bioquímicas a partir do estudo proteômico em valvas mitrales humanas.

Majoritariamente, foram encontradas como diferencialmente expressas proteínas de matriz extracelular e de citoesqueleto, como evidenciado por análise do Gene Ontology, utilizando a plataforma PANTHER. Estas alterações

provavelmente refletem a desorganização decorrente destas lesões. Também foram encontradas diferenças quantitativas em proteínas relacionadas a resposta imune, além de um número menor de proteínas de resposta a “stress” metabólico. Estes resultados confirmam o papel da resposta imune e da inflamação, mesmo em estágios avançados das doenças. O aumento hipotético de ativação de TNF-alfa e de alfa-catenina ocupam papel de importância nesta rede, e, como já dito, são decorrentes de ativação da resposta imune e da desestruturação do tecido, com perda de adesão célula a célula. Estas alterações são evidenciadas pelo aumento da expressão de vimentina, possivelmente devido à expressão de alfa-catenina, e do aumento da vitronectina que encontram-se *upstream* ao TNF-alfa (resultados do IPA), levando à sua ativação. Estas relações são inéditas na DRC e podem ser importantes para explicar os mecanismos autoimunes celulares envolvidos e extensamente descritos ^(54, 182).

Do ponto de vista funcional, pudemos inferir o papel de algumas das proteínas identificadas, por análise nos bancos de dados disponíveis na internet, através de programas como o Panther™ e do IPA™, a partir de dados do Gene Ontology. Assim, a proteína vitronectina, aumentada tanto na DRC-INS quanto na DRC-EST, porém em “spots” diferentes, está envolvida na diferenciação de miofibroblastos ⁽¹⁹⁶⁾ e inibe danos citolíticos observados como consequência da ativação da via do complemento ⁽¹⁹⁷⁾. Estes resultados são importantes porque foi observado que em valvas acometidas por DRC a maioria dos linfócitos T infiltrantes de lesões mitrales não são produtores de IL-4 ⁽²⁴⁾, e miofibroblastos são amplamente descritos no tecido valvar na DRC. Logo, o fato de que a vitronectina esteja aumentada no tecido valvar pode indicar uma etapa precoce

na doença, durante o qual as células residentes na valva sofrem diferenciação para miofibroblastos. Esta alteração quantitativa na vitronectina provavelmente se mantém até os estágios finais da doença, no qual foram obtidas as biópsias deste estudo, contribuindo para a manutenção do ambiente inflamatório e para a manutenção da desorganização da matriz. Infelizmente, este aumento na expressão é muito modesto, não permitindo resultados satisfatórios nos testes tanto de imunoperoxidase quanto de microscopia confocal, nos quais a presença de vitronectina nos tecidos afetados não pôde ser claramente demonstrada. O aumento de vitronectina observado, e hipoteticamente localizado na matriz extracelular, provavelmente contribui também para o acúmulo de fibrina ⁽¹⁹⁸⁾, aumentando a fibrose tecidual e a rigidez valvar observada nos pacientes acometidos por DRC-EST.

O colágeno do tipo-VI, diminuído principalmente na DRC-INS, está envolvido na manutenção da integridade da matriz, na resposta imune através da atração e ativação de macrófagos ⁽¹⁹⁹⁾, e na interação com o colágeno do tipo IV, para garantir manutenção da integridade da matriz extracelular em tecidos conjuntivos ⁽²⁰⁰⁾. A partir de uma sequência octapeptídica do colágeno do tipo-IV foi sintetizado um peptídeo que, uma vez administrado a camundongos, induz a produção de anticorpos com reatividade cruzada a antígenos de *Streptococcus pyogenes* ⁽⁶⁹⁾. Este peptídeo (PARF, peptídeo envolvido com febre reumática) tem sido utilizado como modelo animal para indução de febre reumática em camundongos ⁽²⁰¹⁾. No presente trabalho, não identificamos o colágeno do tipo IV nos fragmentos de tecido mitral analisados, provavelmente devido à sua grande massa molecular, de cerca de 160 kDa. O colágeno do tipo-VI, por outro lado, tem uma massa um pouco menor (cerca

de 105 kDa), e pôde ser analisado por eletroforese bidimensional. Em nossos experimentos, foi possível analisar proteínas com até, no máximo, 120 kDa. Conquanto fragmentos de proteínas muito grandes possam ser encontrados em experimentos de 2DE ⁽²⁰²⁾, nossos resultados não verificaram diferença significativa de fragmentos de colágeno do tipo-IV. É possível que a desestruturação, iniciada por autorreconhecimento de colágeno do tipo-IV, leve a perda de pontos de ancoragem do colágeno do tipo-VI, com consequente diminuição de sua expressão no tecido.

Resultados anteriores mostram que macrófagos também produzem e degradam colágeno do tipo-VI ⁽²⁰³⁾, e que o aumento de ligações cruzadas em matrizes artificiais, com o uso de moléculas *crosslinkers*, diminui a capacidade de macrófagos degradarem a matriz de colágeno ⁽²⁰⁴⁾. Portanto, como este colágeno diminuído na DRC pode ter sido degradado, mecanismos de perda de ligações cruzadas, como a diminuição de colágeno do tipo-IV, podem levar à desestruturação tecidual observada. Essa perda de estrutura pode ser um dos eventos iniciais da lesão valvar, com consequente fibrose e recrutamento de células inflamatórias, diferenciação de células intersticiais valvares em miofibroblastos ⁽³⁾ e remodelamento valvar.

Foi analisado anteriormente, em modelo canino de DMX, a expressão de algumas moléculas de matriz, como o colágeno do tipo-VI, em valvas tricúspides cardíacas, por técnicas de imunohistoquímica. Nas amostras normais, observou-se marcação praticamente homogênea em todo o tecido valvar. Já na DMX em estágio avançado, observou-se aumento do colágeno do tipo-VI nas camadas fibrosa e ventricular ⁽¹⁶⁴⁾. Nosso estudo não pôde avaliar a distribuição histológica

das proteínas nas camadas valvares, devido à heterogeneidade dos cortes obtidos, mas se analisarmos em conjunto os resultados desse trabalho anterior e do nosso, podemos propor que, como não há alteração quantitativa significativa na expressão total de colágeno do tipo-VI entre os grupos CTL e DMX, esse aumento focal de expressão seja balanceado por diminuição de sua expressão principalmente na camada esponjosa, que se torna menos resistente, e com o padrão lacunar característico da DMX.

Não foram descritos, até o momento, autoanticorpos dirigidos a nenhuma das 6 proteínas diferenciais que identificamos exclusivamente em pacientes com DRC (colágeno do tipo VI, proteína oligomérica de matriz, vitronectina, lumican, fibromodulina e prolargina). Entretanto, existe uma classe de proteínas estreptocócicas com grande semelhança a colágeno humano (*Scl-Streptococcal collagen-like proteins*) ^(205, 206) e os indivíduos com infecção estreptocócica prévia produzem anticorpos que reagem com estas proteínas bacterianas e se mantêm em altos títulos por longo tempo. Em relação à vimentina, proteína aumentada na DRC, já foi descrito seu reconhecimento por células T CD4+ que infiltram o tecido valvar de indivíduos com DRC ⁽¹⁵⁰⁾.

A validação da expressão diferencial de proteínas revelou que a isoforma diferencialmente expressa de vimentina é um produto de clivagem ou de degradação. Sua clivagem aumenta seu metabolismo, mediado pelas proteínas e fatores já discutidos. Segundo um trabalho recente ⁽²⁰⁷⁾, um produto solúvel de degradação de vimentina, por calpaína, com cerca de 40 kDa, pode iniciar processos de neoformação de vasos dependentes da translocação de MT-MMP1 para a membrana de endoteliócitos residentes em tecido conjuntivo.

Uma vez que identificamos um fragmento de vimentina do mesmo tamanho em valvas acometidas por DRC, podemos hipotetizar que este mecanismo pode levar a neoformação de vasos observada na DRC.

Nesta forma de vimentina com menor massa molecular não identificamos peptídeos da porção C-terminal, sugerindo que esta porção da proteína fosse faltante. Outras enzimas, além da calpaína, podem clivar a vimentina nesta porção. Conforme mencionado anteriormente, pode ocorrer ativação de serinoproteases através de mecanismos dependentes de MBL ⁽²⁰⁸⁾, que atuam sobre a vimentina, originando um padrão de clivagem semelhante a este, como consequência da ativação de mecanismos de imunidade inata. É possível que uma serinoprotease tenha atuado na porção inicial da proteína, ou enzimas que degradem com bastante eficiência a vimentina, como a calpaína ⁽²⁰⁹⁾ já mencionada, ou ainda uma cisteino protease, como uma caspase ⁽²¹⁰⁾, com promoção de apoptose das células intersticiais valvares (VICs) e consequente desorganização da matriz. A vimentina é uma proteína constituinte do citoesqueleto, cuja desorganização está ligada a processos apoptóticos, sendo altamente expressa em fibroblastos, e menos em linfócitos T e B. Possivelmente sua degradação é decorrente do dano valvar, uma vez que as biópsias utilizadas apresentavam elevado grau de comprometimento clínico. É interessante que, se confirmada sua degradação, será necessário verificar a possibilidade de criação de mimetismo molecular entre proteínas estreptocócicas e esta proteína, uma vez que já foi descrito que peptídeos de vimentina são reconhecidos por linfócitos T infiltrantes de lesões valvares na DRC ⁽¹⁵⁰⁾.

A proteína lumican é um proteoglicano de queratan sulfato, que se liga a laminina e a colágenos, e está amplamente presente na matriz extracelular de tecidos cartilagosos humanos em todas as idades. Foi sugerida pelos experimentos de 2-DE como diferencialmente aumentada na DRC, mostrou-se diminuída tanto na DMX quanto na DRC-EST. Esta diferença se deve ao fato de haverem muitas formas de lumican, isoformas e 4 sítios diferentes de N-glicosilação ⁽²¹¹⁾. Sua diminuição pode explicar a desestruturação de matriz observada na DRC, talvez decorrente da perda de colágeno. A perda de estrutura fibrilar do colágeno do tipo-VI na DRC-EST e DRC-INS, apresentada nos resultados de IHQ, pode levar à diminuição da expressão de lumican. As duas proteínas não possuem alto grau de colocalização. Possivelmente outros tipos de colágeno tenham maior grau de interação com o lumican, mas na DRC essa interação pode ser muito importante, dada a alta colocalização nos locais de fibrose na DRC.

Entretanto, o aumento de expressão específico de uma única isoforma/MPT (um único “spot” aumentado nos experimentos de 2D-DIGE) pode indicar processos específicos envolvidos na patogenia da DRC, possivelmente a formação de neo-autoantígenos. Não pudemos determinar se essa alteração é genética, fenotípica, ou epigenética. Adicionalmente, o lumican está envolvido na sinalização da superfamília do FasL, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Podemos supor que o elevado grau de acometimento dos fragmentos dos tecidos utilizados para o estudo já não depende desta sinalização para a secreção de tais citocinas pró-inflamatórias (212), ou que esta forma da proteína esteja especificamente envolvida na resposta imune. Foi também demonstrado, em modelo murino de colite, que o

lumican pode regular a inflamação causada pela doença ⁽²¹³⁾, possivelmente uma das formas de lumican que contribuem para a sua diminuição global na DRC-EST. Desta forma, a diminuição relativa deste proteoglicano pode estar envolvida na perda da capacidade imunorreguladora na DRC.

Um trabalho recente, utilizando técnicas de microarranjo de mRNA em tecido miocárdico, mostra diminuição da expressão gênica de lumican e de vitronectina na DMX, em modelos caninos. Mostra também diminuição de colágeno por degradação nesse modelo ⁽²¹⁴⁾. Nossos resultados mostraram diminuição do lumican e aumento da vitronectina em tecido de valva mitral na DMX. A diminuição do lumican foi compatível com nossos resultados, bem como aumento de vitronectina. O colágeno não se mostrou alterado na DMX em nossos estudos, possivelmente devido à técnica empregada, que não se presta bem ao estudo de proteínas muito grandes, com exceção de colágenos de menor massa molecular, como é o caso do colágeno do tipo-VI, e a mecanismos de controle pós-transcricional, ou ainda, como já discutido, pela sua degradação por macrófagos.

De maneira geral, foi observada uma desestruturação de proteínas de matriz extracelular em valvas acometidas por DRC. Observamos nos experimentos de microscopia que essa desestruturação se traduz em alterações morfológicas valvares, que possivelmente sejam responsáveis pela perda de função. As células desse tecido mais intimamente relacionadas com a manutenção dessa função estrutural são as VICs (células intersticiais valvares). Adicionalmente, as VICs participam na inibição de angiogênese nos folhetos valvares, e possuem atividade imunorreguladora ⁽⁸⁾. Portanto, a atividade

destas células parece estar comprometida nas lesões de DRC em fase avançada. Ainda não sabemos se este comprometimento funcional das VICs seja um fator desencadeante ou um consequência do dano valvar. Provavelmente alterações fenotípicas, genéticas ou epigenéticas tecido-específicas estejam envolvidas.

Envolvimento de processos imunes na manutenção das lesões

Para maior clareza sobre o envolvimento de processos imunes na manutenção das lesões de DRC, discutiremos os resultados de expressão diferencial com foco nas proteínas envolvidas na resposta imune.

A análise computacional das proteínas diferencialmente expressas revelou que na DRC-INS as proteínas envolvidas com resposta imune foram: vitronectina, fragmento de citoqueratina e colágeno do tipo-VI. A vitronectina, cuja função imune é inibição do complemento, estava aumentada, segundo os resultados de 2D-DIGE. O que indica que ao menos uma isoforma desta proteína esteja aumentada. O fragmento de citoqueratina, diminuído, ativa complemento. O colágeno do tipo-VI, também diminuído na DRC-INS, ativa macrófagos. Portanto, ao que tudo indica, os processos de resposta imune inata no tecido valvar acometido por DRC-INS em fase final podem já estar exauridos, e as lesões devem se manter por mecanismos independentes de ativação do sistema imune.

Na DRC-EST, há aumento de alfa-1-antiquimiotripsina, envolvida na resposta inflamatória, sendo uma proteína de fase aguda. Como a detecção de proteínas plasmáticas pode estar relacionada a adsorção dessas proteínas

pela matriz tecidual, este aumento deve significar um aumento plasmático, resultado de resposta inflamatória. A vitronectina, que inibe complemento, também encontra-se aumentada neste grupo. É possível hipotetizar que os processos imunes na DRC-EST também não sejam muito importantes na fase final da lesão valvar, pois as alterações são antagônicas.

Na DMX, doença de caráter não-inflamatório, não observamos alteração na expressão de proteínas relacionadas a resposta imune, como esperado.

Dentre as alterações compartilhadas por mais de um grupo, não houve nenhum “spot” que representasse proteínas relacionadas de alguma forma com a resposta imune, apesar de dois “spots” diferentes serem identificados como vitronectina, com expressão diferencial compartilhada entre os grupos DRC-INS e DRC-EST, envolvida na inibição de complemento e no enrijecimento valvar.

Nosso trabalho mostrou alterações quantitativas principalmente de proteínas de matriz extracelular valvar, tipicamente secretadas pelas células intersticiais valvares (VICs), como colágenos e proteoglicanos, que também possuem papel imunorregulador ^(8, 215), entre outras proteínas de matriz extracelular ⁽⁵⁾. Apesar de alguns trabalhos recentes abordarem a importância das células endoteliais valvares (VECs) no desenvolvimento das lesões reumáticas ⁽²¹⁶⁾, nossos resultados levam à conclusão de que algumas proteínas quantitativa ou qualitativamente alteradas na DRC são relacionadas ao metabolismo das VICs, com consequente desestruturação da matriz e apoptose de células valvares. Portanto, o estudo dessas células nos pacientes nos diversos estágios da doença pode trazer informações indicativas de mecanismos para o desenvolvimento e manutenção das lesões.

6. CONCLUSÕES

O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho permitiu identificar alterações proteicas valvares em pacientes com Doença Reumática Cardíaca (DRC) e com Degeneração Mixomatosa (DMX) decorrentes do processo autoimune na DRC e degenerativos na DMX. Em todas as valvulopatias foi observado certo grau de desestruturação do tecido, mas suas características são peculiares a cada doença. Nossos resultados apoiam a hipótese de que o comprometimento valvar é diferencial na DRC-INS e na DRC-EST, possivelmente decorrentes do comprometimento das funções das células valvares intersticiais (VICs). Tais alterações podem ser fenotípicas, genéticas ou epigenéticas, entretanto específicas de cada valvulopatia.

Além de um melhor entendimento das alterações moleculares observadas nas valvas mitrais acometidas por DRC, este perfil de alterações específicas, inclusive as diferenças entre DRC-INS e DRC-EST, pode, por fim, levar a possibilidade da utilização dos resultados obtidos neste trabalho para melhor compreensão dos processos envolvidos na patogênese da DRC e para o seu diagnóstico, o que certamente trará inúmeros benefícios para os pacientes.

7. ANEXOS

7.1. Soluções utilizadas

Solução 1: Tampão de Lise

Reagentes	Conc. final	Quantidade
Uréia	7 M	10,5 g
Tiouréia	2 M	3,8 g
CHAPS	4% (m/v)	0,5 g
Tris-HCl 1M(pH 8,8) (sol. 4b)	150 mM	3,0 ml
Água tipo I	qsp	25 ml

Aliquotar esta solução em tubos Eppendorf com 1,0 ml de solução em cada e manter sob congelamento a -20 °C por até 3 meses.

Solução 2: Hidróxido de sódio a 50 mM

Reagentes	Conc. final	Quantidade
NaOH	50 mM	285 mg
Água tipo I	Qsp	100 ml

Preparar no momento do uso

Solução 3: Tampão não-denaturante para extração de proteínas

Reagentes	Conc. final	Quantidade
Tris base	100 mM	606 mg
NaCl	50 mM	147 mg
HCl para ajustar pH 7,4		
Água tipo I	qsp	50 ml

Solução 4: Gel SDS-PAGE a 12% para 1-DE

Reagentes	Para 2 géis	Para 4 géis
Monômeros (sol. 4a)	12 ml	24 ml
Tris-HCl 1,0 M (pH 8,8) (sol. 4b)	7,5 ml	15 ml
SDS a 10% (sol. 4c)	0,3 ml	0,6 ml
Água tipo I	9,9 ml	19,8 ml
Persulfato de amônio a 10% (sol. 4d)	0,3 ml	0,6 ml
TEMED a 10 %	0,03 ml	0,06 ml

Preparar no momento do uso

Solução 4a: Monômeros (acrilamida e metilbisacrilamida)

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Acrilamida	30% (m/v)	300 g
Metilbisacrilamida	0,8% (m/v)	8 g
Água tipo I	Qsp	1,0 l

Solução 4b: Tris-HCl 1,0 M (pH 8,8)

Reagentes	Conc. final	Quantidade
Tris-Base	1 M	121,1 g
HCl 5M	---	p/ pH 8,8
Água tipo I	Qsp	1.000 ml

Ajustar o pH da solução final com HCl e manter a 4 °C

Solução 4c: SDS a 10 %

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Dodecilssulfato de sódio (SDS)	10% (m/v)	5,0 g
Água tipo I	Qsp	50 ml

Solução 4d: Persulfato de amônio a 10 %

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Persulfato de amônio (APS)	10% (m/v)	1,0 g
Água tipo I	Qsp	10 ml

Solução 5: Gel para empilhamento (SDS-PAGE a 4%)

Reagentes	Para 2 géis	Para 4 géis
Acrilamida (sol. 4a)	0,67 ml	1,34 ml
Tris 1,5 M (pH 6,8) (sol. 5a)	0,5 ml	1,0 ml
SDS a 10% (sol. 4c)	0,04 ml	0,08 ml
Água tipo I	2,7 ml	5,4 ml
Persulfato de amônio a 10% (sol. 4d)	0,04 ml	0,08 ml
TEMED	0,004 ml	0,008 ml

Preparar no momento do uso

Solução 5a: Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8)

Reagentes	Conc. final	Quantidade
Tris-base	1,5 M	181,6 g
HCl 5 M	---	p/ pH 6,8
Água tipo I	Qsp	1.000 ml

Ajustar o pH da solução final com HCl e manter a 4 °C

Solução 6: Tampão de Amostra 5X concentrado (para 1-DE)

Reagentes	Concentração	Quantidade
Tris-HCl	250 mM	0,303 g
SDS	10% (m/v)	1,0 g
Glicerol	50% (v/v)	5,0 ml
Azul de bromofenol	0,10% (m/v)	0,01 g
β -mercaptoetanol	5,0% (m/v)	0,5 g
Água tipo I	qsp	10,0 ml

Aliquotar e manter a -20 °C por até 6 meses

Solução 7: Tampão de corrida segundo Laemmli (10X)

Reagentes	Concentração	Quantidade
Tris-base	250 mM	30,3 g
Glicina	1,92 M	144,1 g
SDS	1% (m/v)	10,0 g
Água tipo I	-	qsp 1,0 l

Manter a temperatura ambiente

Solução 8: Solução de fixação

Reagentes	Conc. final	Quantidade
Ácido acético	10% (v/v)	100 ml
Metanol	40% (v/v)	400 ml
Água tipo I	---	500 ml

Manter a temperatura ambiente.

Solução 9: Coomassie Brilliant Blue coloidal G-250

Reagentes	Quantidade
Solução estoque (9b)	500 ml
Metanol	125 ml

Manter a temperatura ambiente.

Solução 9a: Coomassie Brilliant Blue a 5%

Reagentes	Conc. final	Quantidade
Coomassie Blue G-250	5% (m/v)	0,5 g
Água tipo I	qsp	10 ml

Solução 9b: Solução estoque

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Sulfato de amônio	10% (m/v)	50,0 g
Ácido fosfórico a 85%	12% (v/v)	6,0 ml
Coomassie B Blue 5% (sol. 9a)	0,5% (v/v)	10 ml
Água tipo I	qsp	500 ml

Solução 10: Tampão de transferência

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Tampão Laemmli 10X (sol. 7)	1X	100 ml
Metanol	20% (v/v)	200 ml
Água tipo I	Qsp	1000 ml

Solução 11: Corante de Ponceau

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Ponceau-S	0,1% (m/v)	0,5 g
Ácido acético	1,0% (v/v)	5,0 ml
Água tipo I	Qsp	500 ml

Solução 12: Tampão de bloqueio

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
TBS 10 X (sol. 12a)	1 X	50 ml
Tween	0,1% (v/v)	500 µl
Leite em pó desnatado	5% (m/v)	2,5 g
Água tipo I	qsp	500 ml

O pH desta solução deve ser 7,5

Solução 12a: TBS a 10X

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Tris-HCl	200 mM	6,06 g
Cloreto de sódio	1,5 M	58,5 g
Água tipo I	Qsp	100 ml

Ajustar o pH para 7,5

Solução 12b: TBS-tween (0,1%)

Reagentes	Conc. final	Quantidade
Solução 12a	1X	100 ml
Tween	0,1% (v/v)	1,0 ml
Água tipo I	Qsp	1000 ml

Solução 13: Tampão de reidratação para fitas de 24 cm

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Tampão de amostra – DIGE 2X (sol. 11)	Qsp	450 µl
IPG-buffer (verificar o intervalo de pH)	1,0% (v/v)	4,0 µl
Amostra marcada (DIGE)	-	150 µg

Solução 14: Tampão de amostra - DIGE 2X

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Uréia	8 M	9,61 g
DTT	130 mM	400 mg
CHAPS	4% (m/v)	800 mg
Água tipo I	Qsp	20 ml

Aliquotar esta solução em tubos Eppendorf com 1,0 ml e manter sob congelamento a -20 °C.

Solução 15: Gel de SDS-PAGE a 10% para uso na Dalt-Six

Reagentes	Para 6 géis	Para 12 géis
Acrilamida (sol. 2a)	115 ml	300 ml
Tampão de resolução 4X (sol. 2b)	112,5 ml	225,0 ml
SDS a 10% (sol. 2c)	4,5 ml	9,0 ml
Água tipo I	180,35 ml	360,7 ml
Persulfato de amônio a 10% (sol. 2d)	2,5 ml	5,0 ml
TEMED a 10 % (sol. 15a)	1,5 ml	3,0 ml

Preparar no momento do uso

Solução 15a: TEMED a 10%

Reagentes	Para 6 géis	Para 12 géis
TEMED	0,15 ml	0,30 ml
Água tipo I	1,35 ml	2,70 ml

Solução 16: Tampão de equilíbrio

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Uréia	6 M	72,1 g
Tris-HCl 1M, pH 8,8 (sol 2b)	75 mM	10,0 ml
Glicerol 87% (v/v)	29,3% (v/v)	69,0 ml
SDS	2% (v/v)	4,0 g
Água tipo I	Qsp	200 ml

Solução 17: Ambic 1M

Reagentes	Quantidade
Bicarbonato de amônio	240 mg
Água tipo I	3,0 ml

Preparar no momento do uso

Solução 18: Solução de lavagem dos *spots*

Reagente	Conc. Final	Quantidade
Carbonato de amônio	50 mM	4,8 g
Água tipo I		500 ml
Acetonitrila	50 %	500 ml

Solução 19: Solução de desidratação

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Ambic 1M (sol. 21)	25 mM	0,5 ml
ACN	50% (v/v)	20,0 ml
Água tipo I	qsp	19,0 ml

Solução 20: Solução de redução

Reagentes	Conc. Final	Quantidade
Ambic 1M (sol. 21)	25 mM	0,05 ml
DTT	10 mM	3,1 mg
Água tipo I	qsp	2,0 ml

Solução 21: Solução de alquilação

Reagentes	Concentração	Quantidade
Ambic 1M (sol. 21)	25 mM	0,05 ml
IAA	55 mM	20,4 mg
Água tipo I	qsp	2,0 ml

Solução 22: Solução de tripsina

Frasco contém 250 µg da enzima liofilizada.

Adicionar 6,5 ml de solução NH_4HCO_3 20 mM (solução 24).

Alíquotar em tubos de 1,5 ml, sendo cada alíquota de 650 µl.

Congelar as alíquotas a -20°C .

OBS: Esta é a solução estoque numa concentração de 25 µg / 650 µl (0,038 µg/µl)

Para cada spot de aproximadamente 1 mm de diâmetro, utilizar 8 µl (0,3 µg de tripsina) da solução de tripsina (0,038 µg/µl) em NH_4HCO_3 20 mM.

Solução 23: ACN 50% e TFA 0,45%

Reagentes	Quantidade
ACN	5,0 ml
TFA	0,045 ml
Água tipo I	4,955 ml

Solução 24: TFA a 0,45%

Reagentes	Quantidade
TFA	0,02 ml
Água tipo I	4,98 ml

Solução 25: Ácido fórmico a 0,1%

Reagentes	Quantidade
Ácido fórmico	0,001 ml
Acetonitrila	5 ml
Água tipo I	5 ml

7.2. Teste de marcação para os fluoróforos

Considerando-se que algumas proteínas podem apresentar fluorescência quando excitadas em determinados comprimentos de onda, foi feito um teste de marcação com os fluoróforos que seriam utilizados nos experimentos de DIGE: Cy2, Cy3 e Cy5. Não observamos fluorescência inespecífica e a marcação é semelhante independentemente do fluoróforo. As excitações causaram emissão de fluorescência somente nos fluoróforos

específicos. Conforme Figura 1 suplementar, as raias 2 e 3 não emitem fluorescência (Figura 1-supl.a), o mesmo acontecendo para as raias 1 e 3 na (Figura 1-supl.b) e nas raias 1 e 2 (Figura 1-supl.c). Na sobreposição de todas as imagens (Figura 1-supl.d), a fluorescência apresenta a mesma intensidade, indicando que a marcação pode ser feita com qualquer dos 3 fluoróforos, independentemente. As marcações analisadas, em miocárdio (raias 1 a 6), são reproduzidas em valva mitral nas raias 7, 8 e 9.

Figura 1 suplementar: Marcação das proteínas extraídas de valva mitral humana (Cy2, Cy3 e Cy5). Raias de 1 a 6: miocárdio humano; raias de 7 a 9: valva mitral humana; **a)** Marcação com o fluoróforo Cy2; **b)** Marcação com o fluoróforo Cy3; **c)** Marcação com o fluoróforo Cy5; **d)** Sobreposição de todas marcações. Não há interferência do extrato sobre nenhuma das marcações.

7.3. Identificação global das proteínas de valva mitral

Tabela suplementar 1: Identificação das proteínas de valva mitral

Proteína	Nº Spot	Nº UNIPROT	Código de Acesso	Localização celular	Função Molecular	Mascot score	Cobertura (%)	emPAI	MW/pi teórico	MW/pi observ.
Alfa-1 glicoproteína ácida	S10	P02763	A1AG1_HUMAN	Secretada	Fase aguda, ligação a proteínas	454			23,5 / 4,3	34 / 3,8
Alfa-1 antitripsina	S11	P01009	A1AT_HUMAN	Matriz extracelular	Proteína de fase aguda	887			46,9 / 5,4	68 / 4,8
Isocitrato desidrogenase-alfa(mitocondrial)	S11	P50213	IDH3A_HUMAN	Mitocôndria	Metabolismo de carboidratos	127			39,6 / 5,5	68 / 4,8
Lumican	S11	P51884	LUM_HUMAN	Matriz extracelular	Organização de fibras de colágeno	55			38,7 / 6,2	68 / 4,8
Vimentina	S11	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Filamentos de class-III, células não-epiteliais; altamente expressa em fibroblastos, um pouco em LyB e T	76			53,7 / 5,1	68 / 4,8
Clusterina	S13	P10909	CLUS_HUMAN	Citoplasma; membrana; núcleo; secretada	Apoptose; ativação da via do complemento; imunidade inata	59	3	0,06	53,0 / 5,9	32 / 4,4
Mimecan	S13	P20774	MIME_HUMAN	Matriz extracelular	Inibição da proliferação de músculo liso	79	2	0,08	40,9 / 8,1	32 / 4,4
Anexina A5	S14	P08758	ANXA5_HUMAN	Matriz extracelular	Antiapoptótico; regulação negativa da coagulação; transdução de sinal	745	53	2,15	36,0 / 4,9	28 / 4,3
Glicoproteína-4 assoc. a microfibrila	S14	P55083	MFAP4_HUMAN	Matriz extracelular	Adesão celular	37	7	0,11	29,0 / 5,4	28 / 4,3
SKP1 Isoform 2 of S-phase kinase-associated protein 1	S14	P63208	SKP1_HUMAN	Citoplasma e núcleo	Complexo ubiquitina ligase, controle do ciclo mitótico	58	3	0,19	18,2 / 4,3	28 / 4,3
Dermatopontina	S15	Q07507	DERM_HUMAN	Matriz extracelular	Adesão celular	695	40		24,6 / 4,7	25 / 3,9
Actina citoplasmática	WB10	P60709	ACTB_HUMAN	Citoplasma	Formação do citoesqueleto; dobramento de proteínas	168	19	0,19	42,0 / 5,3	32 / 5,2
Clusterina	WB10	P10909	CLUS_HUMAN	Citoplasma; membrana; núcleo; secretada	Apoptose; ativação da via do complemento; imunidade inata	109	16	0,23	53,0 / 5,9	32 / 5,2
Mimecan	WB10	P20774	MIME_HUMAN	Matriz extracelular	Inibição da proliferação de músculo liso	37	2	0,09	40,9 / 8,1	32 / 5,2

Proteína	Nº Spot	Nº UNIPROT	Código de Acesso	Localização celular	Função Molecular	Mascot score	Cobertura (%)	emPAI	MW/pi teórico	MW/pi observ.
Proteína semelhante a actina-B	WB10	Q562R1	ACTBL_HUMAN	Citoplasma	Formação do citoesqueleto	46	4	0,09	42,3 / 5,4	32 / 5,2
Soroamiloide	WB11	P02743	SAMP_HUMAN	Secretada	Pode atuar como lectina dependente de cálcio	1089	30		25,5 / 6,1	22 / 5,9
Miosina - cadeia leve	WB12	P12829	MYL4_HUMAN	Citossol, banda A	Proteína motora, contração do músculo cardíaco	36	6		21,7 / 4,97	22 / 5,4
Apolipoproteína A1	WB13	P02647	APOA1_HUMAN	Secretada	Participa no transporte de colesterol dos tecidos para o fígado	105	13		28,1 / 5,3	18 / 6,5
Glutathione S-transferase P	WB13	P09211	GSTP1_HUMAN	Citossol	Conjuga resíduos de eletrófilos hidrofóbicos. Anti-apoptótico	61	12		23,6 / 5,4	18 / 6,5
Região lambda-2 de IgG (Bence-Jones)	WB14	P0CG05	LAC2_HUMAN	Matriz extracelular	Ativação da via clássica do complemento; resposta imune inata	180	31		25,1 / 5,9	24 / 7,9
Anexina-A2	WB15	P07355	ANXA2_HUMAN	Matriz extracelular	Angiogênese; fusão de vesículas	822	43		40,7 / 8,5	33 / 8,3
Proteína não caracterizada DKFZp686N02209	WB16	Q7Z351	Q7Z351_HUMAN	(sem inf)	(sem inf)	132	14		53,5 / 8,7	54 / 9,0
Albumina sérica	WB17	Q56G89	Q56G89_HUMAN	Espaço extracelular	Transporte	859	27		73,9 / 6,3	75 / 5,5
Lumican	WB17	P51884	LUM_HUMAN	Matriz extracelular	Organização de fibras de colágeno	139	12		38,7 / 6,2	75 / 5,5
Tropomiosina-1	WB18	P09493	TPM1_HUMAN	Citoplasma	Contração de músculo cardíaco	61	10		32,7 / 4,7	30 / 4,8
Alfa-cristalina cadeia B	WB19	P02511	CRYAB_HUMAN	Citoplasma	Antiapoptótico; regulação negativa do transporte intracelular; dobramento de proteínas	66	12		20,1 / 6,8	17 / 8,0
Serotransferrina	WB2	P02787	TRFE_HUMAN	Matriz extracelular e membrana plasmática	Ligação a íons ferro, ativação e degranulação de plaquetas	446	20		79,3 / 6,8	77 / 7,5
Proteína de choque térmico beta-1	WB20	P04792	HSPB1_HUMAN	Citoplasma e núcleo	Resposta ao stress	58	13	0,32	22,8 / 6,0	23 / 5,7
Soroamiloide	WB20	P02743	SAMP_HUMAN	Secretada	Pode atuar como lectina dependente de cálcio	396	30	1,08	25,5 / 6,1	23 / 5,7
Vimentina	WB21	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Filamentos de class-III, células não-epiteliais; altamente expressa em fibroblastos, um pouco em LyB e T	528	23		53,7 / 5,1	52 / 4,5
Cadeia leve de IgG	WB22	P0CG05	LAC2_HUMAN	Matriz extracelular	Ativação da via clássica do complemento; resposta imune inata	553	31		25,1 / 5,9	23 / 8,7
Biglican	WB24	P21810	PGS1_HUMAN	Matriz extracelular	Pode estar envolvido na montagem do colágeno; dermatan e condroitin	58	2		42,0 / 7,2	19 / 6,5

Proteína	Nº Spot	Nº UNIPROT	Código de Acesso	Localização celular	Função Molecular	Mascot score	Cobertura (%)	emPAI	MW/pi teórico	MW/pi observ.
GAPDH	WB24	P04406	G3P_HUMAN	Membrana, citoplasma e núcleo	Apoptose; glicólise	342	35		36,2 / 8,6	19 / 6,5
Arf-GAP com domínio SH3 proteína 2	WB25	O43150	ASAP2_HUMAN	Membrana, citoplasma e Golgi	Modula fagocitose via Fcy2; modula recrutamento de paxilina e migração celular; liga zinco	47	1		111,7 / 6,2	135 / 9,9
Colágeno-1 α 1	WB26	P08123	CO1A2_HUMAN	Matriz extracelular	Organização de fibras de colágeno; migração de leucócitos, ativação de plaquetas	77	2		129,7 / 9,1	140 / 9,8
Albumina	WB4	P02768	ALBU_HUMAN	Secretada	Liga-se e transporta proteínas no plasma	1331	34		71,3 / 5,9	74 / 6,8
Hemopexina	WB4	P02790	HEMO_HUMAN	Secretada	Transporte plasmático	71	4		52,4 / 6,6	74 / 6,8
ZNF350	WB4	Q9GZX5	ZN350_HUMAN	Núcleo	Regulação da transcrição	42	1		61,3 / 8,9	74 / 6,8
Vimentina	WB5	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Filamentos de class-III, células não-epiteliais; altamente expressa em fibroblastos, um pouco em LyB e T	1004	51		53,7 / 5,05	44 / 5,2
Alfa-1 antitripsina	WB6	P01009	A1AT_HUMAN	Matriz extracelular	Proteína de fase aguda	468	25		46,9 / 5,4	60 / 4,8
Tubulina-1A	WB6	Q71U36	TBA1A_HUMAN	Citoplasma	Dobramento e polimerização de proteínas, divisão celular, transporte intracelular	275	17		50,8 / 4,9	60 / 4,8
Vimentina	WB6	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Filamentos de class-III, células não-epiteliais; altamente expressa em fibroblastos, um pouco em LyB e T	724	46		53,7 / 5,05	60 / 4,8
Albumina não-caracterizada	WB7	Q56G89	Q56G89_HUMAN	Espaço extracelular	Transporte	61	7		73,9 / 6,3	55 / 4,8
Tubulina não-caracterizada	WB7	B4DQN9	B4DQN9_HUMAN	Citoplasma	Movimento de microtúbulos; polimerização de proteínas	725	28		48,1 / 4,7	55 / 4,8
Tubulina-2A	WB7	Q13885	TBB2A_HUMAN	Citoplasma	Dobramento e polimerização de proteínas, divisão celular, transporte intracelular	363	20		50,3 / 4,8	55 / 4,8
Tubulina-2C	WB7	P68371	TBB2C_HUMAN	Citoplasma	Dobramento e polimerização de proteínas, divisão celular, transporte intracelular	600	27		50,3 / 4,8	55 / 4,8
Tubulina-3	WB7	Q13509	TBB3_HUMAN	Citoplasma	Dobramento e polimerização de proteínas, divisão celular, transporte intracelular	507	18		50,9 / 4,8	55 / 4,8

Proteína	Nº Spot	Nº UNIPROT	Código de Acesso	Localização celular	Função Molecular	Mascot score	Cobertura (%)	emPAI	MW/pi teórico	MW/pi observ.
Vimentina	WB7	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Filamentos de class-III, células não-epiteliais; altamente expressa em fibroblastos, um pouco em LyB e T	431	25		53,7 / 5,1	55 / 4,8
IGHV4-31;IGHG1 Putative uncharacterized protein DKFZp686N02209	WB8	P01859	IGHG2_HUMAN	Espaço extracelular	Resposta imune	735	21		52,8 / 8,8	48 / 7,6
Actina citoplasmática	WB9	P60709	ACTB_HUMAN	Citoplasma	Formação do citoesqueleto; dobramento de proteínas	1378	37	1,88	42,0 / 5,3	38 / 5,7
Actina de músculo liso aorta	WB9	P62736	ACTA_HUMAN	Citoplasma	Formação de citoesqueleto; ligação a ATP	1118	31	1,65	42,4 / 5,2	38 / 5,7
não identificado	813	na	na	na	na	na	na		na	78 / 5,7
Fibromodulina	912	Q06828	FMOD_HUMAN	Matriz extracelular	Possível papel na fibrilogênese do colágeno; ligação ao receptor de TGF-b	117	9	0,34	43,2 / 5,7	75 / 4,5
Lumican	912	P51884	LUM_HUMAN	Matriz extracelular	Organização de fibras de colágeno	410	32	0,78	38,4 / 6,2	75 / 4,5
Albumina	968	Q56G89	Q56G89_HUMAN	Secretada	Transporte	952	27	0,92	69,1 / 5,9	72 / 4,4
Alpha-1-antichymotrypsin	968	P01011	AACT_HUMAN	Secretada	Inibe conversão de angiotensina-1 para -2; proteína de fase aguda	353	17	0,46	47,7 / 5,3	72 / 4,4
Fibromodulina	968	Q06828	FMOD_HUMAN	Matriz extracelular	Possível papel na fibrinogênese do colágeno; ligação ao receptor de TGF-b	117	9	0,25	43,2 / 5,7	72 / 4,4
Lumican	968	P51884	LUM_HUMAN	Matriz extracelular	Organização de fibras de colágeno	410	33	1,46	38,4 / 6,2	72 / 4,4
Vitronectina	968	P04004	VTNC_HUMAN	Espaço extracelular	Interage com PGs e GAGs, molécula de adesão a substrato e espalhamento celular. Domínio SMB interage com SperinaA1	197	3	0,06	54,3 / 5,6	72 / 4,4
Fragm. KRT?	1159	P04264	K2C1_HUMAN	EPIDERME (Dif. Final)	Pode ativar quinases (PKC e SRC)	207	8		66 / 8,5	27 / 5,8
Ig gamma-2 chain C region	1208	P01859	IGHG2_HUMAN	Espaço extracelular	Resposta imune	121	12		35,9 / 7,7	63 / 7,4
Prolargina	1208	P51888	PRELP_HUMAN	Matriz extracelular	Pode ancorar a membrana basal ao tecido conjuntivo (colágenos I e II)	133	10		43,8 / 9,5	63 / 7,4
Proteína não caracterizada DKFZp686N02209	1208	Q7Z351	Q7Z351_HUMAN	(sem inf)	(sem inf)	72			53,5 / 8,7	63 / 7,4
AHSG cDNA FLJ55606, similar alfa-2-HS-licoproteína	1257	B7Z8Q2	B7Z8Q2_HUMAN	Espaço extracelular	Inibidor de endopeptidase	55	3		46,6 / 5,8	61 / 4,3

Proteína	Nº Spot	Nº UNIPROT	Código de Acesso	Localização celular	Função Molecular	Mascot score	Cobertura (%)	emPAI	MW/pi teórico	MW/pi observ.
Prolargina	1257	P51888	PRELP_HUMAN	Matriz extracelular	Pode ancorar a membrana basal ao tecido conjuntivo (colágenos I e II)	52	8		43,8 / 9,5	61 / 4,3
Epsina-1 (2)	1343	Q9Y6I3	EPN1_HUMAN	Citoplasma e membrana celular	Facilita formação de invaginações recobertas por clatrina; Regula endocitose mediada por receptor; regulador negativo da via EGFR	36	1		69,0 / 4,9	57 / 5,1
Lumican	1343	P51884	LUM_HUMAN	Matriz extracelular	Organização de fibras de colágeno	330	33		38,4 / 6,2	57 / 5,1
Vimentina	1343	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Filamentos de class-III, células não-epiteliais; altamente expressa em fibroblastos, um pouco em LyB e T	64	8		53,7 / 5,05	57 / 5,1
Alpha-enolase	1354	P06733	ENOA_HUMAN	citoplasma, membrana celular	Glicólise, controle do crescimento, tolerância a hipóxia, resposta alérgica	830	38		47,2 / 7,0	57 / 5,1
Beta-enolase	1354	P13929	ENOB_HUMAN	citoplasma	Glicólise, músculo estriado	325	10		46,9 / 7,6	57 / 5,1
Gamma-enolase	1354	P09104	ENOG_HUMAN	citoplasma, membrana celular	Glicólise, neuroprotetor	305	7		47,3 / 4,9	57 / 5,1
Complement C3 (fragment)	1357	P01024	CO3_HUMAN	secretado p/ plasma	Ativação da via do complemento	107	6		187,1 / 6,0	57 / 8,6
GFAP	1425	P14136	GFAP_HUMAN	Citoplasma	Constituinte do citoesqueleto	115	6		49,9 / 5,4	53 / 4,6
Vimentina	1425	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Filamentos de class-III, células não-epiteliais; altamente expressa em fibroblastos, um pouco em LyB e T	1379	47		53,7 / 5,05	53 / 4,6
Vitronectina	1425	P04004	VTNC_HUMAN	Espaço extracelular	Interage com PGs e GAGs, molécula de adesão a substrato e espalhamento celular. Domínio SMB interage com SperinaA1	197	5		54,3 / 5,6	53 / 4,6
Biglican	1435	P21810	PGS1_HUMAN	Matriz extracelular	Pode estar envolvido na montagem do colágeno; dermatan e condroitin	164	17		41,7 / 7,16	51 / 7,5
Biglican	1439	P21810	PGS1_HUMAN	Matriz extracelular	Pode estar envolvido na montagem do colágeno; dermatan e condroitin	115	11		41,7 / 7,16	51 / 7,3
Septina-2	1439	Q15019	SEPT2_HUMAN	Citoplasma	Forma filamentos do citoesqueleto de actina, participa formação de fusos na mitose	70	12		45,5 / 6,4	51 / 7,3
Biglican	1456	P21810	PSG1_HUMAN	Matriz extracelular	Pode estar envolvido na montagem do colágeno; dermatan e condroitin	175	17		41,7 / 7,16	50 / 8,0
Anexina-A2	1525	P07355	ANXA2_HUMAN	Matriz extracelular	Angiogênese; fusão de vesículas	245	30		40,7 / 8,5	36 / 8,7

Proteína	Nº Spot	Nº UNIPROT	Código de Acesso	Localização celular	Função Molecular	Mascot score	Cobertura (%)	emPAI	MW/pi teórico	MW/pi observ.
Arf-GAP com domínio SH3 proteína 2	1635	O43150	ASAP2_HUMAN	Membrana, citoplasma e Golgi	Modula fagocitose via Fcy2; modula recrutamento de paxilina e migração celular; liga zinco	54	1		111,6 / 6,2	37 / 6,2
GFAP	1697	P14136	GFAP_HUMAN	Citoplasma	Constituinte do citoesqueleto	65	4	0,07	49,9 / 5,4	34 / 4,5
Vimentina	1697	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Filamentos de class-III, células não-epiteliais; altamente expressa em fibroblastos, um pouco em LyB e T	266	14	0,43	53,7 / 5,05	34 / 4,5
Apolipoproteína A1	1719	P02647	APOA1_HUMAN	Secretada	Participa no transporte de colesterol dos tecidos para o fígado	539	42		28,1 / 5,3	31 / 5,1
Proteína ligadora de fosfatidiletanolamina	1748	P30086	PEBP1_HUMAN	Citoplasma	Inibe serino proteases (trombina, neuropsina, quimiotripsina); ativador de plasminogênio tecidual e elastase	182	27		21,0 / 7	29 / 10,0
Superóxido dismutase (Mn)	1755	P04179	SODM_HUMAN	Mitocôndria	Destroi radicais superóxido	54	6		24,7 / 8,4	29 / 9,3
Peroxirredoxina-1	1758	Q06830	PRDX1_HUMAN	Mitocôndria e núcleo	Anti-oxidante	79	15		22,3 / 8,3	24 / 9,5
não identificado	1765	na	na	na	na	na	na		na	27 / 9,8
Superóxido dismutase (Cu-Zn)	1779	P00441	SODC_HUMAN	Citoplasma	destroi radicais livres, envolvimento na contração cardíaca; envolvido com metabolismo de glutatona S-transferase	57	16		15,9 / 5,7	25 / 6,3
Prot. relacionada a haptoglobina	1787	P00739	HPTR_HUMAN	Secretada	Atividade de serino-endopeptidase	74	3		39,0 / 6,6	39 / 6,6
Transgelina	1789	Q01995	TAGL_HUMAN	Citoplasma	Crosslinking de actina/gelina; Intercâmbio de cálcio; aumento em fibroblastos em senescência replicativa	150	28		22,7 / 8,9	23 / 8,9
Transgelina	1790	Q01995	TAGL_HUMAN	Citoplasma	Crosslinking de actina/gelina; Intercâmbio de cálcio; aumento em fibroblastos em senescência replicativa	138	28		22,7 / 8,9	23 / 8,9
Vimentina	1793	P08670	VIME_HUMAN	Citoplasma	Filamentos de class-III, células não-epiteliais; altamente expressa em fibroblastos, um pouco em LyB e T	60	4		53,7 / 5,05	54 / 5,0
Anexina-A1	1820	P04083	ANXA1_HUMAN	Núcleo; citoplasma; cílios; membrana basolateral	Envolvida na exocitose; proteína ligadora de cácio/fosfolípides; regula atividade de fosfolipase A2; anti-apoptose; resposta inflamatória	149	13		38,7 / 6,6	39 / 6,6
Colágeno-6 α 1	1823	P12109	COL6A1_HUMAN	Matriz extracelular	Ligação celular	837	14		108,5 / 5,3	109 / 5,3
Prot. oligomérica de matriz cartilagem	1832	P49747	COMP_HUMAN	Matriz extracelular	Osteoartrite; suprime apoptose; liga-se a colágenos e fibronectina	114	13		82,9 / 4,4	83 / 4,4

8. REFERÊNCIAS

1. Hinton RB, Yutzey KE. Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:29-46.
2. Orton EC, Lacerda CM, MacLea HB. Signaling pathways in mitral valve degeneration. *J Vet Cardiol*. 2012;14(1):7-17.
3. Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, Schoen FJ. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation*. 2001;104(21):2525-32.
4. Sacks MS, David Merryman W, Schmidt DE. On the biomechanics of heart valve function. *J Biomech*. 2009;42(12):1804-24.
5. Dreger SA, Thomas P, Sachlos E, Chester AH, Czernuszka JT, Taylor PM, et al. Potential for synthesis and degradation of extracellular matrix proteins by valve interstitial cells seeded onto collagen scaffolds. *Tissue Eng*. 2006;12(9):2533-40.
6. Stephens EH, Chu CK, Grande-Allen KJ. Valve proteoglycan content and glycosaminoglycan fine structure are unique to microstructure, mechanical load and age: Relevance to an age-specific tissue-engineered heart valve. *Acta Biomater*. 2008;4(5):1148-60.
7. Matsumoto Y, Adams V, Walther C, Kleinecke C, Brugger P, Linke A, et al. Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair. *Eur Heart J*. 2009;30(3):346-55.
8. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol*. 2007;171(5):1407-18.

9. Guilherme L, Faé K, Oshiro SE, Kalil J. Molecular pathogenesis of rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Expert Rev Mol Med*. 2005;7(28):1-15.
10. Nicholls, Stainsy, Cecil RI. Bacteriological Studies on Rheumatic Fever and Infectious Arthritis. *Trans Am Climatol Clin Assoc*. 1930;46:36-7.
11. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(3):470-511.
12. Guilherme L, Köhler KF, Postol E, Kalil J. Genes, autoimmunity and pathogenesis of rheumatic heart disease. *Ann Pediatr Cardiol*. 2011;4(1):13-21.
13. Narula J, Chopra P, Talwar KK, Reddy KS, Vasan RS, Tandon R, et al. Does endomyocardial biopsy aid in the diagnosis of rheumatic carditis? *Circulation*. 1993;88(5):2198-205.
14. Boudoulas H. Etiology of valvular heart disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2003;1(4):523-32.
15. Kirvan CA, Cox CJ, Swedo SE, Cunningham MW. Tubulin is a neuronal target of autoantibodies in Sydenham's chorea. *J Immunol*. 2007;178(11):7412-21.
16. Ebaid M, Atik E, Ikari NM, Afiune JY. *Cardiologia em Pediatria: temas fundamentais*. Ebaid M, Atik E, Ikari NM, Afiune JY, editors. São Paulo: Ed. Roca; 2000. 531 p.
17. Fraser WJ, Haffejee Z, Jankelow D, Wadee A, Cooper K. Rheumatic Aschoff nodules revisited. II: Cytokine expression corroborates recently proposed sequential stages. *Histopathology*. 1997;31(5):460-4.
18. Veasy LG, Hill HR. Immunologic and clinical correlations in rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16(4):400-7.

19. Marcus RH, Sareli P, Pocock WA, Barlow JB. The spectrum of severe rheumatic mitral valve disease in a developing country. Correlations among clinical presentation, surgical pathologic findings, and hemodynamic sequelae. *Ann Intern Med.* 1994;120(3):177-83.
20. Steer AC, Carapetis JR. Prevention and treatment of rheumatic heart disease in the developing world. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(11):689-98.
21. Majeed HA, Yousof AM, Shaltout A, Khuffash FA. Acute rheumatic fever below the age of five years: a prospective study of the clinical profile. *Ann Trop Paediatr.* 1984;4(1):37-40.
22. Denny FW. A 45-year perspective on the streptococcus and rheumatic fever: the Edward H. Kass Lecture in infectious disease history. *Clin Infect Dis.* 1994;19(6):1110-22.
23. L G, KF K, J K. Rheumatic Heart Disease: Genes, Inflammation and Autoimmunity. *Rheumatol Curr Res.* 2012;S4(001):1-5.
24. Guilherme L, Faé KC, Oshiro SE, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Kalil J. Rheumatic fever: how *S. pyogenes*-primed peripheral T cells trigger heart valve lesions. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:132-40.
25. Ekelund K, Skinhøj P, Madsen J, Konradsen HB. Invasive group A, B, C and G streptococcal infections in Denmark 1999-2002: epidemiological and clinical aspects. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(7):569-76.
26. Hytönen J, Haataja S, Gerlach D, Podbielski A, Finne J. The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with strepadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Mol Microbiol.* 2001;39(2):512-9.
27. Collin M, Olsén A. Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infect Immun.* 2001;69(11):7187-9.

28. Collin M, Svensson MD, Sjöholm AG, Jensenius JC, Sjöbring U, Olsén A. EndoS and SpeB from *Streptococcus pyogenes* inhibit immunoglobulin-mediated opsonophagocytosis. *Infect Immun*. 2002;70(12):6646-51.
29. Bisno AL, Rubin FA, Cleary PP, Dale JB, Diseases NloAal. Prospects for a group A streptococcal vaccine: rationale, feasibility, and obstacles--report of a National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop. *Clin Infect Dis*. 2005;41(8):1150-6.
30. Komaroff AL, Pass TM, Aronson MD, Ervin CT, Cretin S, Winickoff RN, et al. The prediction of streptococcal pharyngitis in adults. *J Gen Intern Med*. 1986;1(1):1-7.
31. Pandey M, Sekuloski S, Batzloff MR. Novel strategies for controlling *Streptococcus pyogenes* infection and associated diseases: from potential peptide vaccines to antibody immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(5):391-9.
32. Carapetis J. A review of WHO activities. In: Organization WH, editor. The burden of, and the evidence for strategies to control group A streptococcal diseases. Geneva2004. p. 1-49.
33. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(11):685-94.
34. Terreri MT, Ferraz MB, Goldenberg J, Len C, Hilário MO. Resource utilization and cost of rheumatic fever. *J Rheumatol*. 2001;28(6):1394-7.
35. Saúde Md. Coordenação de doenças crônico degenerativas. Incidência da febre reumática no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.
36. LP C, DS D, RMR P. Características demográficas, clínicas, laboratoriais e radiológicas da febre reumática no Brasil: revisão sistemática. *Rev Bras Reumatol*. 2009;49(1):606-16.

37. Richmond P, Harris L. Rheumatic fever in the Kimberley region of Western Australia. *J Trop Pediatr*. 1998;44(3):148-52.
38. Neutze JM. Rheumatic fever and rheumatic heart disease in the western Pacific region. *N Z Med J*. 1988;101(847 Pt 2):404-6.
39. Chun LT, Reddy DV, Yamamoto LG. Rheumatic fever in children and adolescents in Hawaii. *Pediatrics*. 1987;79(4):549-52.
40. Saxena A, Kumar RK, Gera RP, Radhakrishnan S, Mishra S, Ahmed Z, et al. Consensus guidelines on pediatric acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Indian Pediatr*. 2008;45(7):565-73.
41. Marijon E, Ou P, Celermajer DS, Ferreira B, Mocumbi AO, Jani D, et al. Prevalence of rheumatic heart disease detected by echocardiographic screening. *N Engl J Med*. 2007;357(5):470-6.
42. Carapetis JR. Pediatric rheumatic heart disease in the developing world: echocardiographic versus clinical screening. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(2):74-5.
43. Mataika R, Carapetis JR, Kado J, Steer AC. Acute rheumatic fever: an important differential diagnosis of septic arthritis. *J Trop Pediatr*. 2008;54(3):205-7.
44. Pastore S, De Cunto A, Benettoni A, Berton E, Taddio A, Lepore L. The resurgence of rheumatic fever in a developed country area: the role of echocardiography. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(2):396-400.
45. Amoils B, Morrison RC, Wadee AA, Marcus R, Ninin D, King P, et al. Aberrant expression of HLA-DR antigen on valvular fibroblasts from patients with active rheumatic carditis. *Clinical and Experimental Immunology*. 1986;66(1):88-94.

46. Rajapakse C, al Balla S, al-Dallan A, Halim K, Kamal H. Streptococcal antibody cross-reactivity with HLA-DR4+VE B-lymphocytes. Basis of the DR4 associated genetic predisposition to rheumatic fever and rheumatic heart disease? *Br J Rheumatol*. 1990;29(6):468-70.
47. Guilherme L, Weidebach W, Kiss MH, Snitcowsky R, Kalil J. Association of human leukocyte class II antigens with rheumatic fever or rheumatic heart disease in a Brazilian population. *Circulation*. 1991;83(6):1995-8.
48. Gerbase-DeLima M, Scala LC, Temin J, Santos DV, Otto PA. Rheumatic fever and the HLA complex. A cosegregation study. *Circulation*. 1994;89(1):138-41.
49. Guilherme L, Ramasawmy R, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: genetics and pathogenesis. *Scand J Immunol*. 2007;66(2-3):199-207.
50. Azevedo PM, Bauer R, Caparbo VeF, Silva CA, Bonfá E, Pereira RM. Interleukin-1 receptor antagonist gene (IL1RN) polymorphism possibly associated to severity of rheumatic carditis in a Brazilian cohort. *Cytokine*. 2010;49(1):109-13.
51. Guilherme L, Oshiro SE, Faé KC, Cunha-Neto E, Renesto G, Goldberg AC, et al. T-cell reactivity against streptococcal antigens in the periphery mirrors reactivity of heart-infiltrating T lymphocytes in rheumatic heart disease patients. *Infect Immun*. 2001;69(9):5345-51.
52. Binstadt BA, Hebert JL, Ortiz-Lopez A, Bronson R, Benoist C, Mathis D. The same systemic autoimmune disease provokes arthritis and endocarditis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(39):16758-63.
53. Chervonsky AV. Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nat Immunol*. 2010;11(1):28-35.

54. Faé KC, da Silva DD, Oshiro SE, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Douay C, et al. Mimicry in recognition of cardiac myosin peptides by heart-intralesional T cell clones from rheumatic heart disease. *J Immunol.* 2006;176(9):5662-70.
55. Luo YH, Chuang WJ, Wu JJ, Lin MT, Liu CC, Lin PY, et al. Molecular mimicry between streptococcal pyrogenic exotoxin B and endothelial cells. *Lab Invest.* 2010;90(10):1492-506.
56. Guilherme L, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease. *J Clin Immunol.* 2010;30(1):17-23.
57. Mounkes LC, Burke B, Stewart CL. The A-type lamins: nuclear structural proteins as a focus for muscular dystrophy and cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11(7):280-5.
58. Guilherme L, Kalil J, Cunningham M. Molecular mimicry in the autoimmune pathogenesis of rheumatic heart disease. *Autoimmunity.* 2006;39(1):31-9.
59. Vashishtha A, Fischetti VA. Surface-exposed conserved region of the streptococcal M protein induces antibodies cross-reactive with denatured forms of myosin. *J Immunol.* 1993;150(10):4693-701.
60. Towers RJ, Bolm M, Currie BJ, Chhatwal GS, Fagan PK. Autoantigens identified by screening a human heart cDNA library with acute rheumatic fever sera. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:83-91.
61. Bahr GM, Eales LJ, Nye KE, Majeed HA, Yousof AM, Behbehani K, et al. An association between Gc (vitamin D-binding protein) alleles and susceptibility to rheumatic fever. *Immunology.* 1989;67(1):126-8.
62. Gitler AD, Lu MM, Jiang YQ, Epstein JA, Gruber PJ. Molecular markers of cardiac endocardial cushion development. *Dev Dyn.* 2003;228(4):643-50.

63. Matsubara S, Ozawa M. Expression of alpha-catenin in alpha-catenin-deficient cells increases resistance to sphingosine-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2001;154(3):573-84.
64. Tontsch D, Pankuweit S, Maisch B. Autoantibodies in the sera of patients with rheumatic heart disease: characterization of myocardial antigens by two-dimensional immunoblotting and N-terminal sequence analysis. *Clin Exp Immunol.* 2000;121(2):270-4.
65. Brandt ER, Yarwood PJ, McMillan DJ, Vohra H, Currie B, Mammo L, et al. Antibody levels to the class I and II epitopes of the M protein and myosin are related to group A streptococcal exposure in endemic populations. *Int Immunol.* 2001;13(10):1335-43.
66. Jones KF, Whitehead SS, Cunningham MW, Fischetti VA. Reactivity of rheumatic fever and scarlet fever patients' sera with group A streptococcal M protein, cardiac myosin, and cardiac tropomyosin: a retrospective study. *Infect Immun.* 2000;68(12):7132-6.
67. Ayoub EM, Nelson B, Shulman ST, Barrett DJ, Campbell JD, Armstrong G, et al. Group A streptococcal antibodies in subjects with or without rheumatic fever in areas with high or low incidences of rheumatic fever. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(5):886-90.
68. Hinton RB, Lincoln J, Deutsch GH, Osinska H, Manning PB, Benson DW, et al. Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ Res.* 2006;98(11):1431-8.
69. Dinkla K, Nitsche-Schmitz DP, Barroso V, Reissmann S, Johansson HM, Frick IM, et al. Identification of a streptococcal octapeptide motif involved in acute rheumatic fever. *J Biol Chem.* 2007;282(26):18686-93.
70. Fox CS, Guo CY, Larson MG, Vasan RS, Parise H, O'Donnell CJ, et al. Relations of inflammation and novel risk factors to valvular calcification. *Am J Cardiol.* 2006;97(10):1502-5.

71. Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever. Jones Criteria, 1992 update. Special Writing Group of the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young of the American Heart Association. *JAMA*. 1992;268(15):2069-73.
72. Olivier C. Rheumatic fever--is it still a problem? *J Antimicrob Chemother*. 2000;45 Suppl:13-21.
73. Carapetis JR, McDonald M, Wilson NJ. Acute rheumatic fever. *Lancet*. 2005;366(9480):155-68.
74. Gerber MA, Baltimore RS, Eaton CB, Gewitz M, Rowley AH, Shulman ST, et al. Prevention of rheumatic fever and diagnosis and treatment of acute Streptococcal pharyngitis: a scientific statement from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, the Interdisciplinary Council on Functional Genomics and Translational Biology, and the Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*. 2009;119(11):1541-51.
75. Hernandez R, Bañuelos C, Alfonso F, Goicolea J, Fernández-Ortiz A, Escaned J, et al. Long-term clinical and echocardiographic follow-up after percutaneous mitral valvuloplasty with the Inoue balloon. *Circulation*. 1999;99(12):1580-6.
76. Iung B, Garbarz E, Michaud P, Helou S, Farah B, Berdah P, et al. Late results of percutaneous mitral commissurotomy in a series of 1024 patients. Analysis of late clinical deterioration: frequency, anatomic findings, and predictive factors. *Circulation*. 1999;99(25):3272-8.
77. Voss LM, Wilson NJ, Neutze JM, Whitlock RM, Ameratunga RV, Cairns LM, et al. Intravenous immunoglobulin in acute rheumatic fever: a randomized controlled trial. *Circulation*. 2001;103(3):401-6.

78. Angel PM, Nusinow D, Brown CB, Violette K, Barnett JV, Zhang B, et al. Networked-based characterization of extracellular matrix proteins from adult mouse pulmonary and aortic valves. *J Proteome Res.* 2011;10(2):812-23.
79. Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biassette H, Jarraya M, et al. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J.* 2005;26(13):1333-41.
80. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology.* 2006;118(1):10-24.
81. Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, Dunlop J, et al. Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT₂ receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol.* 2002;161(6):2209-18.
82. Veinot JP. Pathology of inflammatory native valvular heart disease. *Cardiovasc Pathol.* 2006;15(5):243-51.
83. Martins TB, Hoffman JL, Augustine NH, Phansalkar AR, Fischetti VA, Zabriskie JB, et al. Comprehensive analysis of antibody responses to streptococcal and tissue antigens in patients with acute rheumatic fever. *Int Immunol.* 2008;20(3):445-52.
84. He YH, Guo YM, Li ZA, Chen JA, Kontos MC, Paulsen WHJ, et al. Echocardiographic Determination of the Prevalence of Primary Myxomatous Degeneration of the Cardiac Valves. *Journal of the American Society of Echocardiography.* 2011;24(4):399-404.
85. Pellerin D, Brecker S, Veyrat C. Degenerative mitral valve disease with emphasis on mitral valve prolapse. *Heart.* 2002;88 Suppl 4:iv20-8.
86. Kittleson M, Kienle R. *Small Animal Cardiovascular Medicine.* St Louis: Mosby; 1998.

87. Grinberg M, Rossi E, Bellotti G, Jatene A, Pileggi F. Prolapso da válvula mitral: aspectos comparativos no homem e na mulher. *Arq Bras Cardiol.* 1987;49(4):199-204.
88. Weiner B, Alpert J. Mitral regurgitation: mitral valve prolapse. 2nd ed. Boston: Little, Brown and Company; 1987.
89. Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, et al. Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *Journal of the American College of Cardiology.* 2006;47(8):1707-12.
90. Freed LA, Levy D, Levine RA, Larson MG, Evans JC, Fuller DL, et al. Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse. *N Engl J Med.* 1999;341(1):1-7.
91. Pomerantzeff P, Brandão C, Monteiro A, Zeratti A, Stolf N. Plástica da válvula mitral: resultados tardios de doze anos de experiência e evolução das técnicas. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1994;9(1):22-8.
92. Pomerantzeff PM, Brandão CM, Rossi EG, Cardoso LF, Tarasoutchi F, Grinberg M, et al. Mitral valve repair. Quadrangular resection of the posterior leaflet in patients with myxomatous degeneration. *Arq Bras Cardiol.* 1999;73(3):277-80.
93. Disatian S. Myxomatous Degenerative Mitral Valve Disease: An Update. *Thai Journal of Veterinary Medicine.* 2010;40(2):151-7.
94. Lacerda CMR, Disatian S, Orton EC. Differential protein expression between normal, early-stage, and late-stage myxomatous mitral valves from dogs. *Proteomics Clinical Applications.* 2009;3(12):1422-9.
95. Yin Z, Jones GN, Towns WH, Zhang X, Abel ED, Binkley PF, et al. Heart-specific ablation of Prkar1a causes failure of heart development and myxomagenesis. *Circulation.* 2008;117(11):1414-22.

96. Devereux RB, Brown WT, Kramer-Fox R, Sachs I. Inheritance of mitral valve prolapse: effect of age and sex on gene expression. *Ann Intern Med.* 1982;97(6):826-32.
97. Pedersen HD, Kristensen BO, Lorentzen KA, Koch J, Jensen AL, Flagstad A. Mitral valve prolapse in 3-year-old healthy Cavalier King Charles Spaniels. An echocardiographic study. *Can J Vet Res.* 1995;59(4):294-8.
98. Nasuti JF, Zhang PJ, Feldman MD, Pasha T, Khurana JS, Gorman JH, et al. Fibrillin and other matrix proteins in mitral valve prolapse syndrome. *Annals of Thoracic Surgery.* 2004;77(2):532-6.
99. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J.* 2003;24(13):1231-43.
100. Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:311-23.
101. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1996;13:19-50.
102. Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol.* 2010;190(4):491-500.
103. Fessler MB, Malcolm KC, Duncan MW, Worthen GS. A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil by lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2002;277(35):31291-302.
104. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.* 1999;19(3):1720-30.

105. Mehra A, Lee KH, Hatzimanikatis V. Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: I. Theoretical considerations. *Biotechnol Bioeng.* 2003;84(7):822-33.
106. Lee PS, Shaw LB, Choe LH, Mehra A, Hatzimanikatis V, Lee KH. Insights into the relation between mrna and protein expression patterns: II. Experimental observations in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 2003;84(7):834-41.
107. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975;250(10):4007-21.
108. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 2000;21(6):1037-53.
109. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 2004;4(12):3665-85.
110. Lilley KS, Razzaq A, Dupree P. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Curr Opin Chem Biol.* 2002;6(1):46-50.
111. Li ZB, Flint PW, Boluyt MO. Evaluation of several two-dimensional gel electrophoresis techniques in cardiac proteomics. *Electrophoresis.* 2005;26(18):3572-85.
112. López JL. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;849(1-2):190-202.
113. Wildgruber R, Harder A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W, Fey SJ, et al. Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 2000;21(13):2610-6.

114. Olsson I, Larsson K, Palmgren R, Bjellqvist B. Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics*. 2002;2(11):1630-2.
115. Cortón M, Villuendas G, Botella JI, San Millán JL, Escobar-Morreale HF, Peral B. Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics*. 2004;4(2):438-41.
116. McGregor E, Dunn MJ. Proteomics of heart disease. *Hum Mol Genet*. 2003;12 Spec No 2:R135-44.
117. Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circ Res*. 2001;88(8):763-73.
118. Patton WF, Schulenberg B, Steinberg TH. Two-dimensional gel electrophoresis; better than a poke in the ICAT? *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(4):321-8.
119. Kubota K, Kosaka T, Ichikawa K. Combination of two-dimensional electrophoresis and shotgun peptide sequencing in comparative proteomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;815(1-2):3-9.
120. Prentice H, Webster KA. Genomic and proteomic profiles of heart disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14(7):282-8.
121. Evans CR, Jorgenson JW. Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules. *Anal Bioanal Chem*. 2004;378(8):1952-61.
122. Nedelkov D, Kiernan UA, Niederkofler EE, Tubbs KA, Nelson RW. Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(10):1811-8.

123. Granger CB, Van Eyk JE, Mockrin SC, Anderson NL, National Heart L, A.d Blood Institute Clinical Proteomics Working Group. National Heart, Lung, And Blood Institute Clinical Proteomics Working Group report. *Circulation*. 2004;109(14):1697-703.
124. Evans G, Wheeler CH, Corbett JM, Dunn MJ. Construction of HSC-2DPAGE: a two-dimensional gel electrophoresis database of heart proteins. *Electrophoresis*. 1997;18(3-4):471-9.
125. Pleissner KP, Sander S, Oswald H, Regitz-Zagrosek V, Fleck E. The construction of the World Wide Web-accessible myocardial two-dimensional gel electrophoresis protein database "HEART-2DPAGE": a practical approach. *Electrophoresis*. 1996;17(8):1386-92.
126. Li XP, Pleissner KP, Scheler C, Regitz-Zagrosek V, Salnikow J, Jungblut PR. A two-dimensional electrophoresis database of rat heart proteins. *Electrophoresis*. 1999;20(4-5):891-7.
127. Müller EC, Thiede B, Zimny-Arndt U, Scheler C, Prehm J, Müller-Werdan U, et al. High-performance human myocardial two-dimensional electrophoresis database: edition 1996. *Electrophoresis*. 1996;17(11):1700-12.
128. Appel RD, Bairoch A, Sanchez JC, Vargas JR, Golaz O, Pasquali C, et al. Federated two-dimensional electrophoresis database: a simple means of publishing two-dimensional electrophoresis data. *Electrophoresis*. 1996;17(3):540-6.
129. Griffin TJ, Aebersold R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. *J Biol Chem*. 2001;276(49):45497-500.
130. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(17):9390-5.

131. Huber LA, Pfaller K, Vietor I. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res*. 2003;92(9):962-8.
132. Plomion C, Lalanne C. Protein extraction from woody plants. *Methods Mol Biol*. 2007;355:37-41.
133. Lizotte E, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Anal Biochem*. 2005;345(1):47-54.
134. Hunter JC, Korzick DH. Protein kinase C distribution and translocation in rat myocardium: Methodological considerations. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(2):129-38.
135. Zhuang W, McKague B, Reeve D, Carey J. A comparative evaluation of accelerated solvent extraction and Polytron extraction for quantification of lipids and extractable organochlorine in fish. *Chemosphere*. 2004;54(4):467-80.
136. Verollet R. A major step towards efficient sample preparation with bead-beating. *Biotechniques*. 2008;44(6):832-3.
137. Wu H, Southam AD, Hines A, Viant MR. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal Biochem*. 2008;372(2):204-12.
138. Catterall JB, Rowan AD, Sarsfield S, Saklatvala J, Wait R, Cawston TE. Development of a novel 2D proteomics approach for the identification of proteins secreted by primary chondrocytes after stimulation by IL-1 and oncostatin M. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(9):1101-9.
139. Hermansson M, Sawaji Y, Bolton M, Alexander S, Wallace A, Begum S, et al. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem*. 2004;279(42):43514-21.

140. Vincourt JB, Lionneton F, Kratassiouk G, Guillemin F, Netter P, Mainard D, et al. Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(10):1984-95.
141. Guo D, Tan W, Wang F, Lv Z, Hu J, Lv T, et al. Proteomic analysis of human articular cartilage: identification of differentially expressed proteins in knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2008;75(4):439-44.
142. Bodzon-Kulakowska A, Bierczynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, et al. Methods for samples preparation in proteomic research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;849(1-2):1-31.
143. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*. 2005;382(3):669-78.
144. Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003;3(1):36-44.
145. Fodor IK, Nelson DO, Alegria-Hartman M, Robbins K, Langlois RG, Turteltaub KW, et al. Statistical challenges in the analysis of two-dimensional difference gel electrophoresis experiments using DeCyder. *Bioinformatics*. 2005;21(19):3733-40.
146. Gupta V, Tseng H, Lawrence BD, Grande-Allen KJ. Effect of cyclic mechanical strain on glycosaminoglycan and proteoglycan synthesis by heart valve cells. *Acta Biomater*. 2009;5(2):531-40.
147. Matt P, von Orelli A, Bernet F, Grussenmeyer T, Lefkovits I, Zerkowski HR. Proteomics of ascending aortic aneurysm with bicuspid or tricuspid aortic valve. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2007;15(3):185-90.

148. Lee RT, Lammerding J. Signaling pathways that influence extracellular remodeling. *J Card Fail.* 2002;8(6 Supl):S339-43.
149. Reilly JT, Nash JR. Vitronectin (serum spreading factor): its localisation in normal and fibrotic tissue. *J Clin Pathol.* 1988;41(12):1269-72.
150. Faé KC, Diefenbach da Silva D, Bilate AM, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Kiss MH, et al. PDIA3, HSPA5 and vimentin, proteins identified by 2-DE in the valvular tissue, are the target antigens of peripheral and heart infiltrating T cells from chronic rheumatic heart disease patients. *J Autoimmun.* 2008;31(2):136-41.
151. Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics.* 2002;2(1):3-10.
152. Akhtar S, Meek KM, James V. Ultrastructure abnormalities in proteoglycans, collagen fibrils, and elastic fibers in normal and myxomatous mitral valve chordae tendineae. *Cardiovascular Pathology.* 1999;8(4):191-201.
153. Tillemann K, Deforce D, Elewaut D. Rheumatology: a close encounter with proteomics. *Rheumatology (Oxford).* 2005;44(10):1217-26.
154. López-Alemaný R, Longstaff C, Hawley S, Mirshahi M, Fábregas P, Jardí M, et al. Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against alpha-Enolase. *Am J Hematol.* 2003;72(4):234-42.
155. Mayya V, Lundgren DH, Hwang SI, Rezaul K, Wu L, Eng JK, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci Signal.* 2009;2(84):ra46.
156. Wolberg AS, Roubey RA. Annexin A2: better left alone. *Blood.* 2005;105(5):1845-6.

157. Hermansson M, Sawaji Y, Bolton M, Alexander S, Wallace A, Begum S, et al. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(42):43514-21.
158. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhashtonay C, Vandekerckhove J, et al. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(1):298-302.
159. Wang M, Zhang Y, Chen Y, Zhang L, Lu X, Chen Z. Mannan-binding lectin regulates dendritic cell maturation and cytokine production induced by lipopolysaccharide. *BMC Immunol.* 2011;12:1.
160. 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(14):3827-31.
161. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Sarma JV, et al. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol.* 2004;164(3):849-59.
162. Huang YW, Meng XJ. Identification of a porcine DC-SIGN-related C-type lectin, porcine CLEC4G (LSECTin), and its order of intron removal during splicing: comparative genomic analyses of the cluster of genes CD23/CLEC4G/DC-SIGN among mammalian species. *Dev Comp Immunol.* 2009;33(6):747-60.
163. Bengtsson E, Mörgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegård D, Aspberg A. The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor. *J Biol Chem.* 2002;277(17):15061-8.

164. Aupperle H, März I, Thielebein J, Kiefer B, Dinges G, Schoon HA. Distribution of extracellular matrix components in normal and degenerated canine tricuspid valve leaflets. *J Comp Pathol*. 2009;141(1):41-51.
165. Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B, et al. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol*. 1995;129(1):203-17.
166. Kim L, Kim dK, Yang WI, Shin DH, Jung IM, Park HK, et al. Overexpression of transforming growth factor-beta 1 in the valvular fibrosis of chronic rheumatic heart disease. *J Korean Med Sci*. 2008;23(1):41-8.
167. Bender AL, da Silveira IG, von Mühlen CA, Staub HL. High specificity but low sensitivity of the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) test in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(4):569-70.
168. Gheita TA, Hussein H. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in systemic sclerosis (SSc): role in disease severity and subclinical rheumatoid arthritis overlap. *Joint Bone Spine*. 2012;79(1):51-6.
169. Chou HT, Chen CH, Tsai CH, Tsai FJ. Association between transforming growth factor-beta1 gene C-509T and T869C polymorphisms and rheumatic heart disease. *Am Heart J*. 2004;148(1):181-6.
170. Bereczki E, Sántha M. The role of biglycan in the heart. *Connect Tissue Res*. 2008;49(3):129-32.
171. Barone E, Cenini G, Sultana R, Di Domenico F, Fiorini A, Perluigi M, et al. Lack of p53 Decreases Basal Oxidative Stress Levels in the Brain Through Upregulation of Thioredoxin-1, Biliverdin Reductase-A, Manganese Superoxide Dismutase, and Nuclear Factor Kappa-B. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(12):1407-20.

172. Dhar SK, Xu Y, St Clair DK. Nuclear factor kappaB- and specificity protein 1-dependent p53-mediated bi-directional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene. *J Biol Chem.* 2010;285(13):9835-46.
173. Lacerda CM, Disatian S, Orton EC. Differential protein expression between normal, early-stage, and late-stage myxomatous mitral valves from dogs. *Proteomics Clin Appl.* 2009;3(12):1422-9.
174. Zhou RH, Vendrov AE, Tchivilev I, Niu XL, Molnar KC, Rojas M, et al. Mitochondrial oxidative stress in aortic stiffening with age: the role of smooth muscle cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(3):745-55.
175. Mahimkar R, Nguyen A, Mann M, Yeh CC, Zhu BQ, Karliner JS, et al. Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression induces myxomatous valve degeneration: a potential model of mitral valve prolapse disease. *Cardiovascular Pathology.* 2009;18(5):253-61.
176. Cao L, Yu W, Wu Y, Yu L. The evolution, complex structures and function of septin proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(20):3309-23.
177. Onat A, Direskeneli H. Excess cardiovascular risk in inflammatory rheumatic diseases: pathophysiology and targeted therapy. *Curr Pharm Des.* 2012;18(11):1465-77.
178. Stakisaitis D, Maksvytis A, Salcius K, Benetis R. Blood serum apolipoproteins B and A-I in females suffering from rheumatic heart valve disease. *Medicina (Kaunas).* 2004;40(1):33-7.
179. Martín-Rojas T, Gil-Dones F, Lopez-Almodovar LF, Padial LR, Vivanco F, Barderas MG. Proteomic profile of human aortic stenosis: insights into the degenerative process. *J Proteome Res.* 2012;11(3):1537-50.

180. Vuilleumier N, Reber G, James R, Burger D, de Moerloose P, Dayer JM, et al. Presence of autoantibodies to apolipoprotein A-1 in patients with acute coronary syndrome further links autoimmunity to cardiovascular disease. *J Autoimmun.* 2004;23(4):353-60.
181. Feitsma AL, van der Voort EI, Franken KL, el Bannoudi H, Elferink BG, Drijfhout JW, et al. Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):117-25.
182. Guilherme L, Köhler KF, Kalil J. Rheumatic heart disease: mediation by complex immune events. *Adv Clin Chem.* 2011;53:31-50.
183. Linde A, Mosier D, Blecha F, Melgarejo T. Innate immunity and inflammation--New frontiers in comparative cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res.* 2007;73(1):26-36.
184. Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(10):712-23.
185. Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(6):391-403.
186. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998;101(1):273-81.
187. György B, Tóth E, Tarcsa E, Falus A, Buzás EI. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1662-77.
188. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmström V, Feldmann M, et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010;233(1):34-54.

189. Bang H, Egerer K, Gauliard A, Lüthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(8):2503-11.
190. De Ceuleneer M, Van Steendam K, Dhaenens M, Deforce D. In vivo relevance of citrullinated proteins and the challenges in their detection. *Proteomics.* 2012.
191. Uysal H, Nandakumar KS, Kessel C, Haag S, Carlsen S, Burkhardt H, et al. Antibodies to citrullinated proteins: molecular interactions and arthritogenicity. *Immunol Rev.* 2010;233(1):9-33.
192. Kinloch A, Tatzer V, Wait R, Peston D, Lundberg K, Donatien P, et al. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(6):R1421-9.
193. Deraos G, Chatzantoni K, Matsoukas MT, Tselios T, Deraos S, Katsara M, et al. Citrullination of linear and cyclic altered peptide ligands from myelin basic protein (MBP(87-99)) epitope elicits a Th1 polarized response by T cells isolated from multiple sclerosis patients: implications in triggering disease. *J Med Chem.* 2008;51(24):7834-42.
194. Ndao M, Spithill TW, Caffrey R, Li H, Podust VN, Perichon R, et al. Identification of novel diagnostic serum biomarkers for Chagas' disease in asymptomatic subjects by mass spectrometric profiling. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1139-49.
195. Ishihara T, Fukuda I, Morita A, Takinami Y, Okamoto H, Nishimura S, et al. Development of quantitative plasma N-glycoproteomics using label-free 2-D LC-MALDI MS and its applicability for biomarker discovery in hepatocellular carcinoma. *J Proteomics.* 2011;74(10):2159-68.
196. Lygoe KA, Wall I, Stephens P, Lewis MP. Role of vitronectin and fibronectin receptors in oral mucosal and dermal myofibroblast differentiation. *Biol Cell.* 2007;99(11):601-14.

197. Sheehan M, Morris CA, Pussell BA, Charlesworth JA. Complement inhibition by human vitronectin involves non-heparin binding domains. *Clin Exp Immunol*. 1995;101(1):136-41.
198. Mesnard L, Rafat C, Vandermeersch S, Hertig A, Cathelin D, Xu-Dubois YC, et al. Vitronectin dictates intraglomerular fibrinolysis in immune-mediated glomerulonephritis. *FASEB J*. 2011;25(10):3543-53.
199. Newman SL, Tucci MA. Regulation of human monocyte/macrophage function by extracellular matrix. Adherence of monocytes to collagen matrices enhances phagocytosis of opsonized bacteria by activation of complement receptors and enhancement of Fc receptor function. *J Clin Invest*. 1990;86(3):703-14.
200. Kuo HJ, Maslen CL, Keene DR, Glanville RW. Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26522-9.
201. Dinkla K, Talay SR, Mörgelin M, Graham RM, Rohde M, Nitsche-Schmitz DP, et al. Crucial role of the CB3-region of collagen IV in PARF-induced acute rheumatic fever. *PLoS One*. 2009;4(3):e4666.
202. Teixeira PC, Santos RH, Fiorelli AI, Bilate AM, Benvenuti LA, Stolf NA, et al. Selective decrease of components of the creatine kinase system and ATP synthase complex in chronic Chagas disease cardiomyopathy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1205.
203. Schnoor M, Cullen P, Lorkowski J, Stolle K, Robenek H, Troyer D, et al. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol*. 2008;180(8):5707-19.
204. Yahyouche A, Zhidao X, Czernuszka JT, Clover AJ. Macrophage-mediated degradation of crosslinked collagen scaffolds. *Acta Biomater*. 2011;7(1):278-86.

205. Hoe NP, Lukomska E, Musser JM, Lukomski S. Characterization of the immune response to collagen-like proteins Scl1 and Scl2 of serotype M1 and M28 group A Streptococcus. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;277(2):142-9.
206. Lukomski S, Nakashima K, Abdi I, Cipriano VJ, Shelvin BJ, Graviss EA, et al. Identification and characterization of a second extracellular collagen-like protein made by group A Streptococcus: control of production at the level of translation. *Infect Immun.* 2001;69(3):1729-38.
207. Kwak HI, Kang H, Dave JM, Mendoza EA, Su SC, Maxwell SA, et al. Calpain-mediated vimentin cleavage occurs upstream of MT1-MMP membrane translocation to facilitate endothelial sprout initiation. *Angiogenesis.* 2012;15(2):287-303.
208. Sørensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol.* 2005;27(3):299-319.
209. Yoshida H, Murachi T, Tsukahara I. Degradation of actin and vimentin by calpain II, a Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, in bovine lens. *FEBS Lett.* 1984;170(2):259-62.
210. Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green KJ, Cryns VL. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001;8(5):443-50.
211. Chakravarti S, Stallings RL, SundarRaj N, Cornuet PK, Hassell JR. Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22. *Genomics.* 1995;27(3):481-8.
212. Frey H, Schroeder N, Manon-Jensen T, Iozzo RV, Schaefer L. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J.* 2013.

213. Lohr K, Sardana H, Lee S, Wu F, Huso DL, Hamad AR, et al. Extracellular matrix protein lumican regulates inflammation in a mouse model of colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(1):143-51.
214. Zheng J, Chen Y, Pat B, Dell'italia LA, Tillson M, Dillon AR, et al. Microarray identifies extensive downregulation of noncollagen extracellular matrix and profibrotic growth factor genes in chronic isolated mitral regurgitation in the dog. *Circulation*. 2009;119(15):2086-95.
215. Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(2):113-8.
216. Tandon R, Sharma M, Chandrashekhar Y, Kotb M, Yacoub MH, Narula J. Revisiting the pathogenesis of rheumatic fever and carditis. *Nat Rev Cardiol*. 2013.