

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

ANA CECILIA DE ALMEIDA VALADARES

**Perfil genético e proteômico de portadores de doença valvar reumática
mitral e aórtica sintomáticos**

São Paulo

2024



ANA CECILIA DE ALMEIDA VALADARES

**Perfil genético e proteômico de portadores de doença valvar reumática
mitral e aórtica sintomáticos**

Versão Original

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Roney Orismar Sampaio

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins
Laurindo

São Paulo

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Valadares, Ana Cecília de Almeida

Perfil genético e proteômico de portadores de doença valvar reumática mitral e aórtica sintomáticos / Ana Cecília de Almeida Valadares; Roney Orismar Sampaio, orientador; Francisco Rafael Martins Laurindo, coorientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cardiologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1.Doença reumática 2.Patogênese 3.Genômica 4.Proteômica
5.Válvula I.Sampaio, Roney Orismar, orient. II.Laurindo, Francisco
Rafael Martins, coorient. III.Título

USP/FM/DBD-353/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Ao meu marido, que transformou cada desafio em risada e cada conquista em motivo para comemorar, e pelo amor que sempre alimentou a minha busca pelos desafios e pelo sucesso.

Aos meus pais, por todo amor e apoio incondicional desde sempre.

Às minhas irmãs, por serem meu porto seguro e minhas maiores incentivadoras.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus cuja força foi fundamental durante toda esta jornada.

À minha família, pelo apoio incondicional, pela paciência e pelo amor, sem os quais esta conquista não seria possível.

Agradeço profundamente ao meu marido, que me apoiou de todas as formas possíveis. Sua paciência, compreensão e ajuda incondicional foram fundamentais para que eu pudesse concluir esta jornada.

Ao Victor Debbas do Laboratório de Investigação Médica (LIM64), pela grande ajuda e pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho.

À Tiphany Bessa e ao Leonardo, pelas discussões ricas e pelos *insights* valiosos que contribuíram significativamente para o aprimoramento desta pesquisa.

À Percilia Vitória, pela significativa contribuição nas discussões e na realização de experimentos, essencial para o progresso deste estudo.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão à Dra. Vera Aiello, do Departamento de Patologia do INCOR-FMUSP, por sua inestimável contribuição à realização dos experimentos descritos nesta tese. A sua orientação e as dicas valiosas foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Agradeço profundamente pela generosidade e dedicação que você demonstrou ao longo deste processo.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à Professora Aline Maria Araujo Martins e a todos os membros da Universidade de Brasília (UnB), que foram fundamentais para a realização deste trabalho. A orientação da professora e o apoio de toda a equipe foram essenciais para o desenvolvimento e a conclusão desta tese. Agradeço imensamente pela colaboração, pelo incentivo e pela dedicação ao longo de todo o processo.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao Dr. Carlos Manoel e à equipe de Cirurgia Valvar do INCOR, bem como, ao Professor Flávio Tarasoutchi e à equipe da Unidade Clínica de Cardiopatia Valvar do INCOR, pela importante participação e contribuição para este estudo. O apoio e a colaboração de todos foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Agradeço imensamente pelo comprometimento e pela expertise que foram essenciais para a realização dessa pesquisa.

À Dra. Jussara e ao Dr. Valdemir do Laboratório Fleury, pela colaboração e pelo apoio prestados, que foram de grande importância para o sucesso deste trabalho.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao Dr. César Higa Nomura- INCOR pelo apoio e pela orientação ao longo da realização deste trabalho. Agradeço, sinceramente, pela dedicação e pelo comprometimento.

Agradeço à equipe do Serviço de Verificação de Óbitos da USP pela grande ajuda prestada, que possibilitou a coleta de dados essencial para esta pesquisa. Agradeço, também, a toda a equipe de Transplante de Coração por me inserir na dinâmica do serviço durante a realização da tese, o que foi crucial para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, especialmente, aos meus orientadores, Dr. Roney Sampaio e Dr. Francisco Laurindo, por sempre acreditarem no meu potencial e me guiarem pelo caminho da ciência. Seu apoio, sua orientação e sua confiança foram essenciais para a realização desta tese.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa. Este trabalho é resultado do esforço coletivo e da colaboração de muitas pessoas.

Muito obrigada a todos!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP*; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Maria Claudia Pestana; Maria Cristina Cavarette Dziabas; Eliana Maria Garcia; Maria Fatima dos Santos, Maria Marta Nascimento; Suely Campos Cardoso. 3a ed. ed. amp. mod. São Paulo: SIBI/USP. 2016. (Caderno de estudos).

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

RESUMO

Valadares ACA. Perfil genético e proteômico de portadores de doença valvar reumática mitral e aórtica sintomáticos [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2024.

A doença reumática (DR) resulta de uma resposta imunológica anormal à faringite estreptocócica. Embora os eventos imunoinflamatórios que ligam a infecção estreptocócica ao dano valvar sejam bem estudados, os processos que impulsionam a progressão para a cardiopatia reumática crônica (CRC) em estágio avançado são menos compreendidos. Vários mecanismos patológicos foram propostos, mas nenhum explica completamente por que a válvula mitral é preferencialmente afetada. A fim de investigar mais profundamente o mecanismo da doença valvar na CRC, realizamos uma análise genética e proteômica nas válvulas mitral e aórtica de pacientes sintomáticos, que foram submetidos a tratamento cirúrgico convencional. Métodos: Um total de 40 válvulas cardíacas foram analisadas por várias modalidades, incluindo proteômica global baseada em espectrometria de massas e genômica. Um total de 14 válvulas cardíacas (VC) foram usadas no estudo genômico, 26 VC em proteômica e 6 VC em proteômica setorial de depósitos amiloides em valva microdissecção por laser. Folhetos mitral e aórtico do mesmo paciente foram obtidos de cirurgias de dupla substituição de válvulas para estenose grave ou lesões valvares múltiplas. Resultados: Análise global de expressão gênica em pacientes com indicação cirúrgica mostrou que valvas reumáticas mitrais exibiram, em comparação com valvas aórticas, maior expressão de genes ligados a processos redox, calcificação, inflamação e, em particular, resposta imune. Nosso estudo translacional gerou um mapa proteômico da CRC ao analisar válvulas mitral (MV) e aórtica (AOV) dos mesmos pacientes, e compará-las com válvulas correspondentes de pacientes-controle não doentes que passaram por transplantes cardíacos. Diferenças significativas nas assinaturas proteômicas entre MV e AOV estavam presentes, principalmente, nas válvulas-controle. No cenário da CRC, essas diferenças diminuem, sugerindo que a CRC avançada converge para vias comuns da doença. A análise das redes de interação proteína-proteína encontrou que a assinatura reumática da doença avançada inclui a regulação negativa de proteínas relacionadas à função mitocondrial, comprometimento dos mecanismos de proteostase e metabolismo lipídico alterado. Conclusão: A CRC tem uma patofisiologia complexa. O estudo do padrão genético da doença mitral reumática evidenciou não só padrões de imunoinflamação, fibrose, calcificação além de oxirredução maior nas valvas reumáticas assim como sugere padrões diferentes quanto à valva acometida mitral ou aórtica. A análise proteômica revelou diminuição de expressão de proteínas relacionadas à função mitocondrial, comprometimento dos mecanismos de proteostase e metabolismo lipídico alterado. Uma estratégia combinada de proteômica e biologia de sistemas identifica o primeiro perfil de CRC, que indica distúrbios ainda ativos em processos metabólicos, redox e de proteostase, apesar da doença avançada e da cicatrização/calcificação.

Palavras-chave: Doença reumática. Patogênese. Genômica. Proteômica. Válvula.

ABSTRACT

Valadares ACA. Proteomic and genetic profile in symptomatic rheumatic mitral and aortic valves individuals [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2024.

Rheumatic disease (RD) results from an abnormal immune response to streptococcal pharyngitis. Although the immunoinflammatory events linking streptococcal infection to valvular damage are well studied, the processes driving the progression to advanced-stage chronic rheumatic heart disease (CRHD) are less understood. Several pathological mechanisms have been proposed, but none fully explain why the mitral valve is preferentially affected. To further investigate the mechanism of valvular disease in CRHD, we performed genetic and proteomic analyses on the mitral and aortic valves of symptomatic patients who underwent conventional surgical treatment. **Methods:** A total of 40 heart valves were analyzed using various modalities, including mass spectrometry-based global proteomics and genomics. A total of 14 heart valves (HV) were used in the genomic study, 26 HV in proteomics, and 6 HV in sectional proteomics of amyloid deposits in microdissected valves by laser. Mitral and aortic leaflets from the same patient were obtained from double valve replacement surgeries for severe stenosis or multiple valvular lesions. **Results:** Global gene expression analysis in patients indicated for surgery revealed that rheumatic mitral valves exhibited, compared to aortic valves, higher expression of genes associated with redox processes, calcification, inflammation, and, in particular, immune response. Our translational study generated a proteomic map of rheumatic valve disease (RVD) by analyzing mitral (MV) and aortic (AOV) valves from the same patients and comparing them with corresponding valves from non-diseased control patients who underwent heart transplantation. Significant differences in proteomic signatures between MV and AOV were mainly present in the control valves. In the context of RVD, these differences diminish, suggesting that advanced RVD converges on common disease pathways. Protein-protein interaction network analysis found that the rheumatic signature of advanced disease includes negative regulation of proteins related to mitochondrial function, impairment of proteostasis mechanisms, and altered lipid metabolism. **Conclusion:** RVD has a complex pathophysiology. The study of the genetic pattern of rheumatic mitral disease highlighted not only patterns of immune inflammation, fibrosis, and calcification, but also increased oxidative-reduction processes in rheumatic valves, suggesting different patterns depending on whether the mitral or aortic valve is affected. Proteomic analysis revealed decreased expression of proteins related to mitochondrial function, compromised proteostasis mechanisms, and altered lipid metabolism. A combined strategy of proteomics and systems biology identifies the first RVD profile, indicating ongoing disturbances in metabolic, redox, and proteostatic processes despite advanced disease and scarring/calcification.

Keywords: Rheumatic disease. Pathogenesis. Genomics. Proteomics. Valve.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Resumo gráfico dos protocolos empregados	23
Figura 2 -	Quantificação da calcificação Protocolo I	26
Figura 3 -	Valvas reumáticas - Protocolo I.....	49
Figura 4 -	Protocolo I: Análise genética de AOV E MV.....	50
Figura 5 -	Protocolo I: Análise genética RAOV vs AOV e RMV vs MV	51
Figura 6 -	Protocolo I: Análise genética de valvas reumáticas obtidas do mesmo paciente	52
Figura 7 -	Protocolo II: Análise multivariada entre os grupos estudados.....	56
Figura 8 -	Protocolo II: proteínas mais variantes entre AOV, MV, ARV e MRV	56
Figura 9 -	Protocolo II: AOV vs MV.....	58
Figura 10 -	Protocolo II: AOV vs MV.....	58
Figura 11 -	Protocolo II: RMV vs RAOV	59
Figura 12 -	Representação gráfica de proteínas em comum entre os cenários controle e doença do protocolo II	60
Figura 13 -	Protocolo II: Doença vs controle.....	61
Figura 14 -	Protocolo II: RAOV vs AOV	61
Figura 15 -	Protocolo II: Proteínas relacionadas ao processo glicolítico	62
Figura 16 -	Protocolo II: RMV vs MV	63
Figura 17 -	Assinatura proteica na doença reumática.....	65
Figura 18 -	Protocolo III: Distúrbio da proteostase valvar e depósito amiloide em valva reumática.....	66
Figura 19 -	Protocolo III- depósito amiloide	67
Figura 20 -	Sumário de resultados	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Protocolo de coloração.....	26
Tabela 2 -	Passos da extração de material genético	28
Tabela 3 -	Genes relacionados a fibrose	29
Tabela 4 -	Genes relacionados a doenças valvares	30
Tabela 5 -	Genes relacionados a calcificação	31
Tabela 6 -	Genes relacionados a imuno inflamação.....	32
Tabela 7 -	Genes relacionados a oxirredução	35
Tabela 8 -	Dados clínicos doença cardíaca reumática	47
Tabela 9 -	Quantificação da calcificação protocolo I.....	48
Tabela 10 -	Características clínicas Protocolo II.....	53
Tabela 11 -	Características ecocardiográficas Protocolo II.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC	<i>American College of Cardiology</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
AOV	Valva Aórtica Controle
AOV	Válvulas Aórtica
BVA	<i>Biological Variation Analysis</i>
cDNA	DNA Complementar
CRC	Cardiopatia Reumática Crônica
CRHD	<i>Chronic Rheumatic Heart Disease</i>
DDA	Aquisição Dependente de Dados
DP	Desvio Padrão
DR	Doença Reumática
FR	Febre Reumática
GAS	Estreptococo β -hemolítico do Grupo A
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo
HV	<i>Heart Valves</i>
IFN	γ Interferon Gama
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
LIM 64	Laboratório de Investigação Médica
M	Média
MV	Valva Mitral Controle
MV	Válvulas Mitral
RAOV	Valva Aórtica Reumática
RD	<i>Rheumatic Disease</i>
RMV	Valva Mitral Reumática
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SVO	Serviço de Verificação de Óbito

TFA	Ácido Trifluoroacético
TNF alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VC	Válvulas Cardíacas
Vs	<i>Versus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	HIPÓTESE	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
4.1	PROTOCOLO I: PROTOCOLO DE ESTUDO EM VALVAS NÃO PAREADAS	24
4.1.1	Grupo doença reumática cardíaca (Protocolo I)	24
4.1.2	Grupo-controle (Protocolo I)	24
4.1.3	Coleta das valvas	25
4.1.4	Análise histopatológica	25
4.1.5	Coloração HE	25
4.1.6	Quantificação de calcificação por Angiotomografia coronária e valvar	26
4.1.7	Extração de RNA de valvas cardíacas	27
4.1.8	Análise estatística	27
4.1.9	Extração de material genético	28
4.1.10	Genes estudados	28
4.1.10.1	Genes relacionados ao processo de fibrose	28
4.1.10.2	Genes envolvidos nas doenças valvares	30
4.1.10.3	Genes associados ao processo de calcificação	30
4.1.10.4	Genes relacionados aos processos imunoinflamatórios	31
4.1.10.5	Genes relacionados aos processos de estresse do retículo e oxirredução.....	34
4.1.11	Análise estatística	37
4.1.11.1	Dados clínicos e/ou obtidos em prontuário	37
4.1.11.2	Avaliação genética – Protocolo I.....	38
4.2	PROTOCOLO II: PROTOCOLO DE ESTUDO EM VALVAS PAREADAS	38
4.2.1	Coleta de valvas	39
4.2.1.1	Coleta de Tecido Humano (Protocolo II)	39
4.2.1.2	Grupo-controle (Protocolo II)	40
4.2.1.3	Método de análise de proteínas globais (proteômica) por espectrometria de massas (Protocolo II).....	40

4.2.1.4	Análise proteômica <i>untargeted</i>	40
4.2.1.5	Protocolo para análise por LC MS/MS	41
4.2.1.6	Tratamento e integração de dados	41
4.2.2	Análise estatística	42
4.2.3	Identificação de proteínas.....	43
4.3	PROTOCOLO III: MICRODISSECÇÃO A LASER E PROCESSAMENTO BIOQUÍMICO DOS TECIDOS.....	43
4.3.1	Análise proteômica.....	44
5	RESULTADOS.....	47
5.1	PROTOCOLO I – ESTUDO COM VALVAS NÃO PAREADAS.....	47
5.1.1	Avaliação clínica e ecocardiográfica.....	47
5.1.2	Análise de calcificação por meio de angiotomografia computadorizada valvar	48
5.1.3	Histopatologia	48
5.1.4	Análise genética do Grupo-controle (MV e AOV) - Protocolo I.....	50
5.1.5	Análise genética RAOV e RMV (Protocolo I).....	50
5.2	PROTOCOLO II – ESTUDO COM VALVAS PAREADAS	52
5.2.1	Avaliação clínica e ecocardiográfica.....	53
5.2.2	Extração proteica das valvas mitrais e aórticas reumáticas e valvas controles	55
5.2.3	Perfil proteômico global de MV e AOV do mesmo indivíduo de controles normais e pacientes com CRC.....	55
5.2.4	Padrão diferencial de expressão proteica entre válvulas aórticas vs. mitrais controle e válvulas aórticas vs. mitrais reumáticas	57
5.2.5	Assinaturas proteômicas da doença valvar reumática avançada	60
5.2.6	Alteração da proteostase em válvulas reumáticas: estudo proteômico de depósitos fibrilares	66
6	DISCUSSÃO	70
6.1	PADRÕES MOLECULARES NA DOENÇA.....	71
6.2	DIFERENÇAS ENTRE PADRÕES PROTEICOS DE VALVAS AÓRTICA E MITRAL NORMAIS	71
6.3	ASSINATURA PROTEÔMICA DA DOENÇA REUMÁTICA	72
6.4	DISTÚRPIO DA PROTEOSTASE NA DRC E DEPÓSITO AMILOIDE.....	73
6.5	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	74
6.6	PERSPECTIVAS	74
7	CONCLUSÕES	76

REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	85
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	85
ANEXO B – PAPER – ARTIGO SUBMETIDO.....	91

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A febre reumática (FR) resulta de uma resposta autoimune à infecção pelo estreptococo β -hemolítico do grupo A (GAS). Caracteriza-se por uma complicação tardia, não supurativa, de uma infecção estreptocócica não tratada, que ocorre em pessoas geneticamente predispostas¹⁻³.

A FR e sua seqüela crônica, a cardiopatia reumática (CRC), são responsáveis por importante morbimortalidade em crianças e adultos jovens, e têm alto impacto socioeconômico. A incidência de Febre Reumática aguda, em alguns países em desenvolvimento, é superior a 50 por 100.000 crianças. A prevalência mundial de CRC é de, pelo menos, 15,6 milhões de casos, e esta doença é responsável por cerca de 233.000 mortes/ano⁴. Apesar da redução do número de casos em países desenvolvidos, continua sendo de alta prevalência em países em desenvolvimento¹⁻⁵, constituindo a principal causa de cardiopatia adquirida na infância e, também, a mais passível de prevenção. Dados do Ministério da Saúde estimam uma prevalência de FR ao redor de 3% entre crianças e adolescentes suscetíveis, sendo responsável por 40% das cirurgias cardíacas no país⁶.

A patogênese da doença reumática ainda permanece não totalmente compreendida. Vários genes têm sido descritos, a maioria envolvida com respostas imunoinflamatórias. A existência de processo autoimune na FR foi postulada após a observação de que as lesões no coração estavam associadas a anticorpos que reconheciam o tecido cardíaco. A origem da doença parece estar associada a uma reação cruzada de anticorpos produzidos originalmente contra produtos e estruturas dos estreptococos que, porém, passam a reconhecer, também, as células do hospedeiro, processo chamado mimetismo molecular^{7,8}. Sabe-se que ambas as respostas imunes mediadas por linfócitos B e T estão envolvidos no processo inflamatório da FR. Além disso, também, há produção de citocinas inflamatórias que exacerbam a reação autoimune, sendo responsáveis pela progressão e manutenção da lesão valvar crônica⁹.

O processo inflamatório cardíaco está associado a uma reação cruzada entre a proteína M do *Streptococcus pyogenes* e as proteínas miosina, queratina e outras proteínas do tecido cardíaco humano. Outros tipos de proteína M têm sido descritos como causadores de FR^{10,11}. Predisposição genética é necessária, havendo associação com o HLA-DR4, DR-2, D7 em nosso meio, e uma possível associação com o anticorpo D8/17, dirigido contra antígenos de células B¹².

O processo inflamatório desencadeado em reação ao *Streptococcus pyogenes* induz uma inflamação no miocárdio e no endotélio da valva cardíaca que é facilitada pela infiltração de células T. A única seqüela em longo prazo é a cardiopatia valvar reumática. No início, ocorrem lesões como a fragmentação das fibras colágenas, edema da substância intercelular, infiltração celular e degeneração fibroide¹³. No coração, as lesões iniciais surgem nas valvas cardíacas sob a forma aparente de pequenas verrugas ao longo da linha de fechamento, podendo, posteriormente, as valvas tornarem-se espessadas e deformadas, com as cordoalhas encurtadas, resultando em estenose ou insuficiência valvar. A valva mitral é mais frequentemente, envolvida, vindo a seguir a aórtica, a tricúspide e, raramente, a pulmonar¹⁴.

Pode ocorrer degeneração difusa, com lesões inflamatórias perivasculares, formando os nódulos de Aschoff, que são formados por área central fibroide circundada por linfócitos, plasmócitos e grandes células basofílicas¹⁵.

Além dos mecanismos descritos, a produção de citocinas influencia de forma decisiva a resposta imune nos pacientes com FR. O número aumentado de linfócitos CD4⁺ no sangue periférico de pacientes com DRC estão ligados a aumento de IL-1, TNF alfa e IL-2 no soro. A análise do perfil de citocinas no tecido cardíaco de pacientes com doença reumática cardíaca grave mostrou predomínio de células mononucleares secretoras de TNF α e IFN γ (padrão Th1)¹⁶.

Embora a pesquisa clínica e bacteriológica tenha evoluído significativamente, na área da Biologia Molecular, muitas dúvidas ainda carecem de explicação, principalmente quanto às bases fundamentais do mecanismo imunológico na patogênese da doença cardíaca reumática, processo esse que, até o momento, não foi completamente elucidado. Torna-se necessária a busca por marcadores que permitam auxiliar no diagnóstico e prognóstico da doença valvar reumática, especialmente quando em fase inicial. O estudo do perfil metabólico tem sido utilizado para identificação de biomarcadores em diversas doenças^{17,18}. A caracterização dos tipos e das diferentes proporções dos metabólitos são indicadas para essa pesquisa inicial de biomarcadores. Avanços na pesquisa “ômica” na última década, particularmente genômica e proteômica, nos permitiram determinar as mudanças dentro do genoma e do proteoma que ocorrem durante o desenvolvimento de várias valvopatias não reumáticas¹⁹ e sugeriram vários *insights* na fisiopatologia da doença reumática cardíaca²⁰.

Assim sendo, com a finalidade de compreender mais profundamente as vias patogênicas da doença reumática, nossa proposta é definir possíveis padrões genômicos e proteicos relacionados, a fim de contribuir com o estudo da patogênese da doença cardíaca reumática.

2 HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

O perfil genético e proteico na cardiopatia reumática crônica (CRC) tem um comportamento diverso nas valvas aórtica e mitral, o que resulta em diferente evolução quanto ao dano valvar.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil genético e proteômico em portadores de doença valvar mitral e aórtica de etiologia reumática.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar quantitativamente a expressão do mRNA de um painel de genes indicadores de vias ligadas à homeostase e sinalização redox, estresse do RE e inflamação em tecido valvar humano;
2. Correlacionar a expressão gênica de proteínas selecionadas e sua expressão tecidual à intensidade de calcificação, fibrose e inflamação;
3. Analisar as variáveis obtidas nos objetivos (1) e (2) com relação à valva acometida (mitral e aórtica);
4. Estudar o perfil proteômico e fornecer informação quanto à diferenciação do parênquima valvar normal, e da valvar reumática mitral e aórtica;
5. Estudar frações das válvulas reumáticas relacionadas ao depósito de proteína amiloide por meio de proteômica direcionada e fornecer informações sobre os possíveis mecanismos envolvidos nesse depósito e sua participação na patogênese da doença reumática;
6. Confrontar os dados obtidos no objetivo 4 com os obtidos no objetivo 5 e 6, e capturar efeitos complementares e interações sinérgicas entre as ômicas integrando dados obtidos de diferentes níveis para entender sua interação e combinada influência sobre o processo da doença valvar reumática.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os participantes do estudo ou seus responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos participantes do estudo (vide Anexo A).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Coração (InCor), Projeto CAAE no 69241117.0.0000.0068, SDC 4492 16 158 (manuscrito original para publicação - Anexo B).

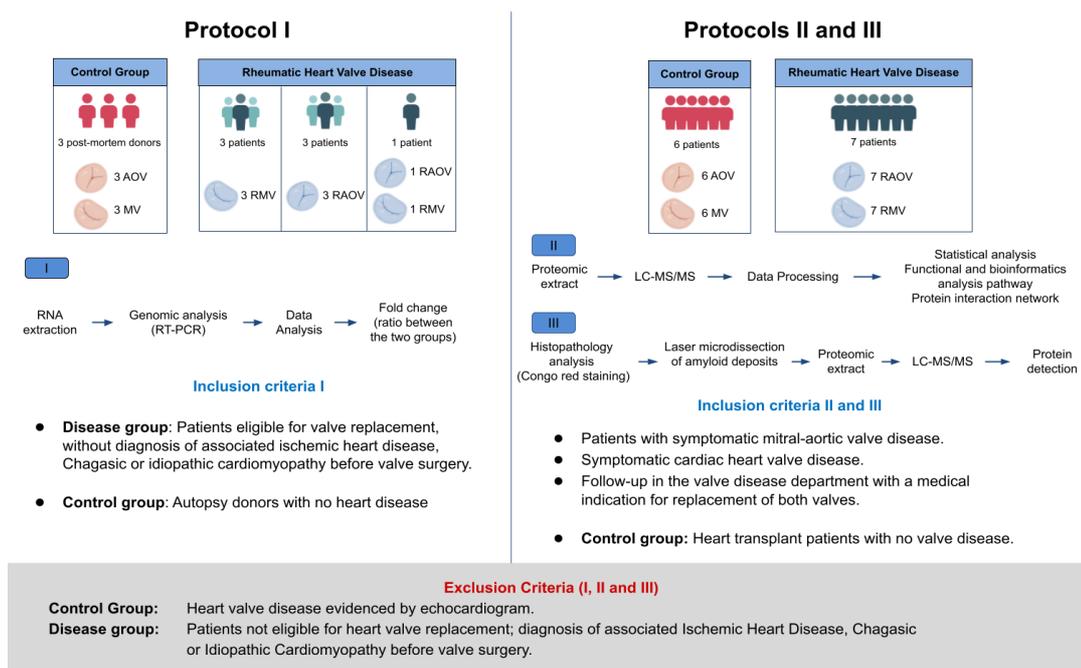
Esse estudo é do tipo caso-controle, no qual a comparação se faz entre um grupo de doentes (cardiopatia valvar reumática mitral e aórtica) e um grupo de indivíduos sem as doenças estudadas.

As análises experimentais foram realizadas no laboratório do Professor Francisco Laurindo (LIM 64) do Instituto do Coração, Grupo Fleury e Laboratório Espectrometria de Massa da Universidade de Brasília.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para um melhor entendimento do delineamento experimental, encontram-se na Figura 1 fluxogramas com as etapas do presente estudo.

Figura 1 - Resumo gráfico dos protocolos empregados



Fonte: Produção da autora (2024)

Legenda: Resumo gráfico dos protocolos empregados. Protocolo I (análise genômica), Protocolo II (análise proteômica) e Protocolo III (análise proteômica de depósito amiloide), e critérios de inclusão/exclusão.

4.1 PROTOCOLO I: PROTOCOLO DE ESTUDO EM VALVAS NÃO PAREADAS

Inicialmente, foi conduzido um estudo genético com pacientes com Valvopatia Reumática avançada que necessitavam de cirurgia. Na fase inicial e com a finalidade de análise exploratória, a amostra não se restringiu apenas a pacientes submetidos à dupla troca valvar (aórtica e mitral), incluindo, também, aqueles que foram submetidos à troca de uma única válvula.

4.1.1 Grupo doença reumática cardíaca (Protocolo I)

Foram incluídos para esta etapa do estudo pacientes com valvopatia mitral, aórtica ou mitral-aórtica acompanhados no ambulatório de Valvopatia do Instituto do Coração-HCFMUSP (Incor).

Os pacientes elegíveis para o estudo obtiveram, previamente, diagnóstico de cardiopatia valvar reumática estágio D (AHA-ACC), ou seja, todos sintomáticos e com indicação de troca valvar mitral, aórtica ou ambas.

Foram excluídos pacientes não elegíveis para troca valvar ou com diagnóstico de cardiopatia isquêmica associada, cardiomiopatia chagásica ou idiopática assim como cirurgia valvar prévia.

4.1.2 Grupo-controle (Protocolo I)

Foram coletadas valvas aórtica e mitral de doadores cadáveres obtidas do Serviço de Verificação de Óbito – HCFMUSP (SVO).

A fim de uniformizar o grupo-controle com o objetivo de garantir a obtenção de valvas cardíacas saudáveis, os doadores elegíveis constituíram-se de homens ou mulheres de até 40 anos, sem doenças cardiovasculares prévias conhecidas, cujo óbito ocorreu por acidentes ou traumas.

Crítérios de exclusão: doadores com mais de 40 anos, diagnóstico prévio de cardiopatia isquêmica, estrutural ou doença valvar, causa mortis primária ou secundária relacionada a evento cardiológico.

4.1.3 Coleta das valvas

A coleta das valvas do grupo doença reumática cardíaca do experimento 1 (DRC-Exp1) foi realizada em bloco cirúrgico no Instituto do coração.

Sete pacientes foram selecionados para compor o grupo-controle do Protocolo I.

Foram coletadas 3 valvas mitrais e 3 valvas aórticas de pacientes submetidos à troca valvar única e um único paciente submetido à troca valvar mitral-aórtica.

Após a retirada cirúrgica da valva, procedeu-se à preparação do tecido para o protocolo em laboratório (LIM 64).

As valvas foram seccionadas em três partes equivalentes destinadas a análises diferenciais.

O fragmento destinado à análise genômica e extração de material genético foi colocado em criotubo contendo 4 ml de RNAlater e acondicionado na temperatura de menos oitenta graus Celsius até a extração. Os demais fragmentos foram acondicionados em tubos contendo formol para posterior análise.

Para o grupo-controle (MV e AOV), quatro valvas (duas aórticas e duas mitrais) foram coletadas de doadores cadáveres no SVO-HCFMUSP.

Após a coleta, as valvas foram levadas ao laboratório e processadas da mesma maneira que as RMV e RAOV do Protocolo I.

4.1.4 Análise histopatológica

Os fragmentos destinados à análise histopatológica foram, inicialmente, descalcificados com EDTA a fim de, após removidos os cristais de cálcio, se analisarem os constituintes orgânicos do tecido. Após a descalcificação, foram confeccionadas lâminas do tecido e corados com hematoxilina eosina para análise microscópica de fibrose e imunoinflamação. Todas as valvas foram avaliadas pela mesma patologista para evitar viés de observador.

4.1.5 Coloração HE

As biópsias foram 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 conforme protocolo na Tabela 1.

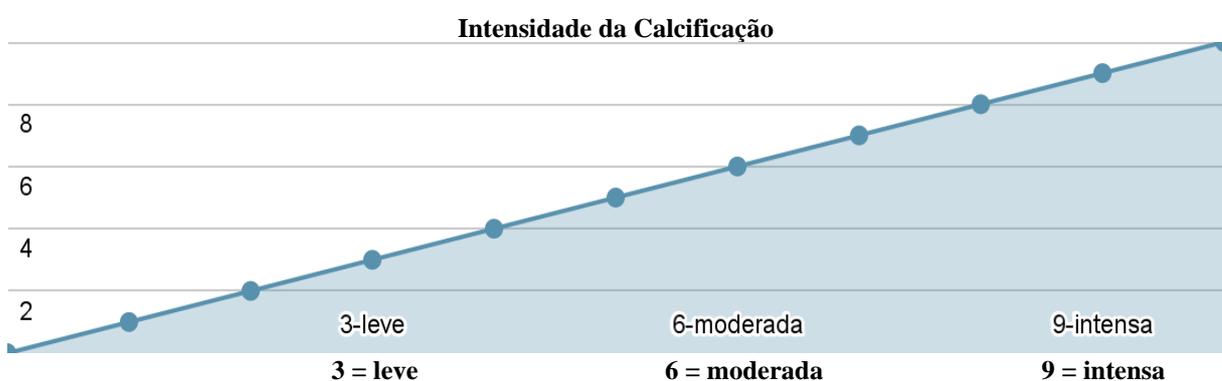
Tabela 1 - Protocolo de coloração

Solução	Tempo (minutos)
Álcool 96°GL	5
Álcool 70°GL	2
<i>Lavar em água</i>	
Hematoxilina	1,5
<i>Lavar em água</i>	
Eosina	2
<i>Lavar em água</i>	
Álcool 96°GL	1
Álcool 100°GL	3
Xilol	1

4.1.6 Quantificação de calcificação por Angiotomografia coronária e valvar

Fragmentos valvares equivalentes foram submetidos para aquisição de imagem em angiotomografia de 320 canais. As imagens das valvas analisadas por avaliador radiologista único e pontuação atribuída de forma subjetiva de acordo com a intensidade e distribuição de calcificação no tecido estudado conforme Figura 2.

Figura 2 - Quantificação da calcificação Protocolo I



Fonte: Produção da autora (2024)

Legenda: Representação gráfica da quantificação da calcificação valvar por meio da obtenção de imagem de tomografia

4.1.7 Extração de RNA de valvas cardíacas

A fim de verificar a taxa da expressão gênica de proteínas específicas relacionadas a processo de fibrose e calcificação, processos imunoinflamatórios e ligados às vias redox e de resposta ao estresse reticular nas valvas cardíacas, foram feitos miniarrays de RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*). A extração de RNA foi realizada utilizando-se o Aurum total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit ("BioRad Laboratories"), seguindo protocolo descrito na patente de processo (processo de isolamento de material genético a partir de tecidos de difícil processamento bioquímico e detalhado na Tabela 2).

O RNA foi quantificado e o cDNA transcrito por meio do Kit High Capacity (*Life Technologies*). Aproximadamente, 50 ng de cDNA foi colocado em microtubos juntamente com Taqman (*Applied Biosystems*) e primers específicos. O resultado foi calculado pelo delta-delta ct após 40 ciclos no equipamento 7500 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*), de acordo com protocolo do fabricante e normalizado pelo GAPDH [22]. Os resultados estão expressos como *fold-change* ($2^{\Delta\Delta Ct}$).

4.1.8 Análise estatística

Para testar as diferenças significativas na expressão e modulação dos genes entre os grupos experimentais propostos, a análise univariada de variância *One-way* ANOVA foi utilizada, com valor de $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$ no módulo *Biological Variation Analysis* (BVA) do software. Um limiar (*threshold*) para a razão de modulação da expressão gênica (*fold*) foi também estabelecido neste módulo: $\pm 1,3$ vezes, ou seja, variação de + 30% (*upregulated*) ou - 30% (*downregulated*) na expressão para cada spot comparado. *One-way* ANOVA foi escolhido, pois é o mais adequado para avaliar quão distantes os componentes analisados estão quando comparados à variabilidade de observações individuais. Após este tratamento, para os spots que se apresentaram dentro dos limites estabelecidos acima, uma comparação pareada (*pairwise*) foi realizada entre os grupos experimentais utilizando-se o teste de comparações múltiplas de Tukey's. Sendo o teste *One-way* ANOVA significativo, o teste Tukey, que é teste baseado na diferença mínima significativa (DMS), é utilizado para avaliar toda e qualquer diferença entre duas médias de diferentes cenários biológicos. O software utilizado para análise estatística foi o GraphPad Prism 7.0 (*GraphPa Software Inc.*, CA; USA).

4.1.9 Extração de material genético

O processo de extração de material genético em valvas calcificadas foi realizado segundo patente BR102016011463-2, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Passos da extração de material genético

1. 120mg de tecido valvar aórtico em RNA-Later	2. Centrifugar a 12.000kg por 30 segundos
3. Seguir com 3 homogeneizações independentes	4. Adicionar em cada fração 1ml de Trizol
5. Homogeneizar por 30 segundos	6. Centrifugar a 10.000g por 10 minutos a 4°C
7. Adicionar ao sobrenadante 200µl de clorofórmio	8. Centrifugar a 10.000 g por 20 minutos a 4°C
9. Adicionar 600µl de Etanol 70°GL	10. Filtrar todas as frações de toda amostra, pipetando 700µl por vez no filtro
11. Centrifugar a 12.000kg por 60 segundos	12. Adicionar 700µl da solução "low stringency"
13. Fracionar em 3x 40mg	14. Adicionar 700µl "high stringency wash"
15. Centrifugar a 1.200g por 2 minutos	16. Eluir com 50µl de substância de eluição
17. Aguardar 1 minuto	18. Centrifugar
19. Processo de eluição deve ser repetido mais 2x	20. Adicionar solução de DNase
21. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos	22. Adicionar 300µl de etanol
23. Repetir passos 10-19	

4.1.10 Genes estudados

4.1.10.1 Genes relacionados ao processo de fibrose

Foram escolhidos com base em dados obtidos da literatura^{23,24} os genes implicados no processo de fibrose em doenças cardíacas e outros contextos patológicos (Tabela 3).

Tabela 3 - Genes relacionados a fibrose

GENE	FUNÇÃO	PROTEÍNA
PAK1	Membro da família das proteínas PAK regula a motilidade e morfologia celular. Estas proteínas são efetores intermediários fazendo o <i>link</i> entre as Rho GTPases e a reorganização do citoesqueleto e sinalização nuclear, além de servirem como alvos para a pequena ligação de proteínas Cdc42 e Rac GTP.	P21 (RAC1) quinase ativada 1
RHOA	Proteínas Rho promovem a reorganização do citoesqueleto de actina e regula a forma da célula, anexos e motilidade.	Rho (<i>RAS homolog family member A</i>)
ARHGDI1	Este gene codifica uma proteína que desempenha um papel-chave na regulação da sinalização por meio de GTPases Rho.	Rho GDI 1 (<i>Rho GDP dissociation inhibitor alpha</i>)
ARHGDI2	A proteína codificada por este gene está envolvida em diversos acontecimentos celulares, incluindo a sinalização celular, proliferação, organização do citoesqueleto e secreção.	Rho GDI 2 (<i>Rho GDP dissociation inhibitor beta</i>)
ARHGDI3	Essa proteína desempenha um papel central na modulação da ativação de GTPases inibindo a troca de GDP por GTP.	Rho GDI G (<i>Rho GDP dissociation inhibitor gamma</i>)
COL1A1	Este gene codifica as cadeias pró-alfa 1 de colágeno tipo I, cuja hélice tripla compreende duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2.	<i>Collagen type I alpha 1</i>
COL3A1	Este gene codifica para as cadeias alfa 1 do pró-colágeno de tipo III, um colágeno fibrilar que é encontrado nos tecidos conjuntivos extensíveis, tais como pele, pulmão, útero, intestino e o sistema vascular, frequentemente, em associação com o colágeno do tipo I.	<i>Collagen type III alpha 1 chain</i>
COL6A1	Os colágenos são uma superfamília de proteínas que desempenham um papel na manutenção da integridade dos vários tecidos. Colágenos são proteínas da matriz extracelular e possuem um domínio de hélice tripla como elemento estrutural comum. Colágeno VI é um dos componentes estruturais principais das microfibrilas.	<i>Collagen type VI alpha 1 chain</i>
MMP2	O gene é um membro da família de genes das metaloproteinases da matriz (MMP), que são enzimas dependentes de zinco capazes de clivar os componentes da matriz extracelular e as moléculas envolvidas na transdução de sinal.	Matrix metalloproteinase 2
MMP9	As proteínas da família da metaloproteinase de matriz (MMP) são envolvidas na quebra da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, tais como desenvolvimento embrionário, reprodução, e remodelação de tecidos, bem como em processos de doença, tais como artrite e metástases.	Matrix metalloproteinase 9
CD36	Esta proteína corresponde a um receptor das trombospondinas. As trombospondinas estão amplamente distribuídas e essa proteína pode ter função importante como uma molécula de adesão celular. Ela se liga ao colágeno, trombospondina, fosfolípídeos aniônicos e LDL oxidado.	<i>CD36 molecule</i>

4.1.10.2 Genes envolvidos nas doenças valvares

Na Tabela 4 estão relacionados os Genes que estão ligados a processos variados de remodelamento da matriz, componentes do citoesqueleto e angiogênese, estando, possivelmente, implicados em processos patológicos envolvendo as valvas cardíacas.

Tabela 4 - Genes relacionados a doenças valvares

GENE	FUNÇÃO	PROTEÍNA
COMP	Este gene expressa a proteína conectora de colágeno e fibronectina, usualmente, reduzida na doença reumática.	COMP
ANXA1	Codifica proteína quelante do cálcio. Expressão reduzida na doença mixomatosa.	Anexina-A1
ANXA2	Codifica proteína relacionada à angiogênese e fusão de proteínas. Expressão reduzida na doença mixomatosa.	Anexina-A2
SEPT2	A proteína septina-2 possui atividade GTPase além de ser uma constituinte do citoesqueleto. A expressão está reduzida na doença mixomatosa.	Septina-2
TAGLN	Este gene tem expressão reduzida na doença mixomatosa.	Transgelin
LUM	Lumican regula a organização do colágeno e crescimento de fibrilas circunferenciais, a transparência da córnea, e migração de células epiteliais e reparação de tecidos. Esta proteína se apresentou super expressa em valvas de pacientes reumáticos quando comparados aos com outras patologias mitrais.	Lumican
APOA1	Este gene codifica a apolipoproteína A -I, que é o principal componente proteico das lipoproteínas de alta densidade (HDL) no plasma. Esta proteína se apresentou super expressa em valvas de pacientes reumáticos.	Apolipoproteína A
BGN	Essa proteína codificada apresenta atividade celular de receptor.	Biglycan

4.1.10.3 Genes associados ao processo de calcificação

Na tabela a seguir, estão os Genes associados ao desenvolvimento do fenótipo calcífico em diversas patologias, principalmente no processo de aterosclerose coronariana (Tabela 5).

Tabela 5 - Genes relacionados a calcificação

GENE	FUNÇÃO	PROTEÍNA
SMAD1 e SMAD 3	As proteínas SMAD são transdutores de sinal e moduladores transcricionais que medeiam a múltiplas vias de sinalização. Esta proteína medeia os sinais das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que estão envolvidos numa variedade de atividades biológicas, incluindo o crescimento celular, a apoptose, a morfogênese e o desenvolvimento de respostas imunitárias.	<i>SMAD family member 1</i> <i>SMAD family member 3</i>
TNFSF11	Este gene codifica um membro da família de citocinas do fator de necrose tumoral (TNF), que é um ligante para osteoprotegerina e funciona como um fator-chave para a diferenciação e ativação de osteoclastos. Esta proteína mostrou ser um fator de sobrevivência de células dendríticas e está envolvida na regulação da resposta imunitária dependente da célula T.	<i>Tumor necrosis factor superfamily member 11 (RANK L)</i>
RUNX2	Este gene é um membro da família de fatores de transcrição RUNX e codifica uma proteína nuclear com um domínio de ligação de ADN Runt. Esta proteína é essencial para a diferenciação dos osteoblastos e morfogênese óssea, e atua como um suporte para ácidos nucleicos e fatores reguladores envolvidos na expressão do gene do esqueleto.	<i>Runt related transcription factor 2</i>
MSX2	Este gene codifica um membro da família do gene homeobox. A proteína codificada é um repressor da transcrição cuja atividade normal pode estabelecer um equilíbrio entre a sobrevivência e a apoptose de células derivadas da crista neural necessária para adequada morfogênese craniofacial.	<i>Msh homeobox 2</i>
ALPL	Este gene codifica um membro da família de proteínas fosfatase alcalina.	<i>Alkaline phosphatase</i>

4.1.10.4 Genes relacionados aos processos imunoinflamatórios

A seguir, na Tabela 6, estão os Genes relacionados ao desencadeamento de processos imunológicos e inflamatórios, assim como respostas antiinflamatórias, ligados ao processo de autofagia, ativação das células imunológicas e imunorregulação.

Tabela 6 - Genes relacionados a imuno inflamação

GENE	FUNÇÃO	PROTEÍNA
CYBA	O citocromo b é composto por uma cadeia leve (alfa) e uma cadeia pesada (beta). Este gene codifica a subunidade alfa que tem sido proposto como um do componente principal do sistema de oxidase com função antimicrobiana dos fagócitos.	Citocromo b
NCF1	A proteína codificada por este gene é subunidade citosólica de NADPH oxidase de neutrófilos. Esta oxidase é uma enzima de múltiplos componentes que é ativada para produzir o ânion superóxido.	Fator 1 citosólico de neutrófilo (NCF1)
NCF2	Este gene codifica o fator 2 citosólico de neutrófilos (subunidade citosólica do complexo de multiproteínas NADPH-oxidase). Esta oxidase produz uma explosão de superóxido que é entregue ao lúmen do fagossoma do neutrófilo.	P67-PHOX
Nfkb	NF-kappa-B é um fator de transcrição pleiotrópico presente em quase todos os tipos de células e é o ponto de extremidade de uma série de eventos de transdução de sinal que são iniciados por uma vasta gama de estímulos relacionados com muitos processos biológicos, tais como inflamação, imunidade, diferenciação de células crescimento, tumorigênese e apoptose.	Nfkb
IL1A	A proteína codificada por este gene é um membro da família das citocinas interleucina-1. Esta citocina é uma citocina pleiotrópica, envolvida em várias respostas imunitárias, processos inflamatórios e hematopoiese.	IL1 a (Interleucina 1 alfa)
IL6	Este gene codifica uma citocina que funciona na inflamação e na maturação de células B. Além disso, a proteína codificada foi mostrada para ser um pirogênio endógeno capaz de induzir febre em pessoas com doenças autoimunes ou infecções.	IL6 (Interleucina 6)
IL17A	A proteína codificada por este gene é uma citocina pró-inflamatória produzida por células T ativadas. Esta citocina regula as atividades de proteínas quinases ativadas por mitógenos NF- kappa B.	IL17 (Interleucina 17)
ICAM1	Este gene codifica uma glicoproteína da superfície celular que é normalmente expresso em células endoteliais e células do sistema imune.	ICAM (molécula de adesão intercelular)
VCAM1	Esta proteína de membrana do tipo I medeia a adesão de leucócitos e células endoteliais e a transdução de sinal. Pode desempenhar um papel no desenvolvimento da aterosclerose e artrite reumatoide.	VCAM
TNFA	Este gene codifica uma citocina pró-inflamatória multifuncional que pertence à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). Esta citocina é secretada, principalmente, por macrófagos.	TNF alfa
CC15	As quimiocinas formam uma superfamília de proteínas envolvidas em processos inflamatórios e com função imunorreguladora.	CC15 (C-C motif chemokine ligand 5)
IL17 A	Interleucina 17A (IL17A) é uma citocina pró-inflamatória segregada por linfócitos T ativados.	Interleukin 17 receptor A

continua

continuação

Tabela 6 - Genes relacionados a imuno inflamação

GENE	FUNÇÃO	PROTEÍNA
TLR4	A proteína codificada por este gene é um membro da família de receptores de tipo Toll (TLR), que desempenha um papel fundamental no reconhecimento do patógeno e ativação da imunidade inata.	<i>Toll like receptor 4</i>
TLR9	Estudos indicam que este receptor medeia a resposta celular a dinucleotídeos CpG não metilados em DNA bacteriano para montar uma resposta imune inata.	<i>Toll like receptor 9</i>
CXCR3	A ligação de quimiocinas à proteína codificada por este gene induz respostas celulares que estão envolvidas no tráfego de leucócitos, ativação de integrina, alterações do citoesqueleto e migração quimiotática.	<i>C-X-C motif chemokine receptor 3</i>
IL10	A proteína codificada por este gene é uma citocina produzida, principalmente, por monócitos e, em menor grau, pelos linfócitos. Esta citocina tem efeitos pleiotrópicos na imunorregulação e inflamação.	Interleucina 10
IL 4	A proteína codificada por este gene é uma citocina pleiotrópica produzida por células T ativadas. Esta citocina é um ligante para o receptor de interleucina- 4.	Interleucina 4
TGFB1	Este gene codifica um membro da família do fator de crescimento transformante beta (TGFB) de citocinas, que são peptídeos multifuncionais que regulam a proliferação, diferenciação, adesão, migração e outras funções em muitos tipos de células.	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TGFB2	A proteína codificada é segregada e tem efeitos supressores de crescimento de células T dependente de interleucina-2.	<i>Transforming growth factor beta 2</i>
CSF1	A proteína codificada por este gene é uma citocina que controla a produção, a diferenciação e a função dos macrófagos.	<i>colony stimulating factor 1</i>
NFKB	O NFKB é um regulador de transcrição que é ativado por vários estímulos intra e extracelulares, tais como as citocinas, os radicais livres-oxidantes, irradiação ultravioleta e produtos bacterianos ou virais.	<i>Nuclear factor kappa B subunit 1</i>
FOXP3	A proteína codificada por este gene é um membro da família forkhead de reguladores transcricionais.	<i>Forkhead box P3</i>
GATA-3	É um importante regulador do desenvolvimento de células T e desempenha um papel crucial na biologia das células endoteliais.	<i>GATA binding protein 3</i>
TLR2	A proteína codificada por este gene é um membro da família de receptores de tipo Toll (TLR), que desempenha um papel fundamental no reconhecimento do patógeno e ativação da imunidade inata.	<i>Toll like receptor 2</i>
Hsp60	A proteína codificada por este gene é um membro da família de receptores de tipo Toll (TLR), que desempenha um papel fundamental no reconhecimento do patógeno e na ativação da imunidade inata.	<i>Heat shock protein family D (Hsp60) member 1</i>

continua

conclusão

Tabela 6 - Genes relacionados a imuno inflamação

GENE	FUNÇÃO	PROTEÍNA
IL-13	Este gene codifica uma citocina produzida principalmente por imunorregulação de células Th2 ativadas.	<i>Interleukin 13</i>
IL-5	Este gene codifica uma citocina que atua como um fator de diferenciação e crescimento das células B e eosinófilos. A citocina codificada desempenha um papel importante na regulação da formação de eosinófilos, maturação, sobrevivência e recrutamento. O aumento da produção desta citocina pode ser relacionado com a patogênese de doenças inflamatórias dependentes de eosinófilos.	<i>Interleukin 5</i>
CCL2 MCP-1	As quimiocinas são uma superfamília de proteínas envolvidas em processos inflamatórios e de imunorregulação.	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
ROR α e t-bet		<i>RORα e t-bet</i>
IL-12	A proteína codificada por esse gene é necessária à indução independente do IFN gama, sendo importante para a diferenciação da resposta Th1 e Th2.	<i>Interleukin 12^a</i>
IFN gama		IFN gama
IL-1B	Esta citocina é um importante mediador da resposta inflamatória e está envolvida numa variedade de atividades celulares, incluindo a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose.	<i>Interleukin 1 beta</i>
MIP-1B; CCL4	A proteína codificada é segregada e tem funções inflamatórias e quimiocinéticas.	<i>C-C motif chemokine ligand 4</i>

4.1.10.5 Genes relacionados aos processos de estresse do retículo e oxirredução

A seguir, na Tabela 7, estão os Genes que estão relacionados ao processo de apoptose, estabilização e dobramento de outras proteínas, estresse do retículo endoplasmático e respostas de oxirredução celular.

Tabela 7 - Genes relacionados a oxirredução

GENE	FUNÇÃO	PROTEÍNA
EIF2AK3	Tipo de proteína de membrana localizada no retículo endoplasmático a qual é induzida pelo estresse de RE.	PERK
ATF6	Este gene codifica um fator de transcrição que ativa genes-alvo para a resposta durante o estresse de retículo endoplasmático.	ATF6
ERN1	Esta proteína possui atividade de quinase e atividade de endorribonuclease, e é uma importante proteína com função de alterar a expressão gênica em resposta ao estresse de RE.	IRE1
AMFR	Ela catalisa a ubiquitinação e degradação de proteínas específicas associadas ao retículo endoplasmático.	GP78
HSP90B1	Este gene codifica um membro de uma família de trifosfato de adenosina (ATP) – chaperonas moleculares com papéis na estabilização e dobramento de outras proteínas.	GRP94
XBP1	Verificou-se que, após a acumulação de proteínas desdobradas no RE, o mRNA deste gene é processado para uma forma ativa por um mecanismo não convencional que é mediado pela enzima com função endonuclease Inositol-requiring protein 1 (IRE1). Tal mecanismo consiste na perda de 26 nt de mRNA (<i>splicing</i>), resultando na isoforma XBP1 (S), que é o fator de transcrição funcionalmente ativo.	XBP1
P4HB	Esta enzima é também um dissulfeto isomerase, contendo dois domínios de tioredoxina que catalisam a formação, a ruptura e rearranjo de ligações dissulfeto.	PDIA1
CHOP-10	Função gênica de codificação da proteína. A proteína está implicada na eritropoiese e a adipogênese é ativada pelo estresse de retículo endoplasmático. Promove a apoptose.	DDIT3
TXNRD1	Este gene codifica um membro da família das piridinas nucleotídeos oxidoredutases. Esta proteína reduz a tioredoxinas assim como outros substratos, e desempenha um papel no metabolismo de selênio e na proteção contra o estresse oxidativo.	TRX1
SOD1	A proteína codificada por este gene se liga a íons de cobre e de zinco, e é uma das duas isoenzimas responsáveis pela destruição dos radicais superóxidos livres no corpo.	SOD1
ERO1B	Codifica a isoforma 1 beta da oxidoredutase do retículo endoplasmático.	ERO1B
ERO1A	Codifica a isoforma 1 alfa da oxidoredutase do retículo endoplasmático.	ERO1A
PDIA4	Proteína membra 4 da família das dissulfetos isomerases	ERP72
PRDX4	A proteína codificada por este gene é uma enzima antioxidante localizada no citoplasma e pertence à família peroxiredoxina. O <i>status</i> reduzido dessa proteína é um índice de estresse de RE.	PRXD4
GPX7	Codificam proteínas que participam de vias de consumo de peróxido.	GPX6]7
GPX8	Codificam proteínas que participam de vias de consumo de peróxido.	GPX8
CALR	Calreticulina é uma proteína multifuncional que atua como uma importante armazenadora de Ca (2 +) no lúmen do retículo endoplasmático.	Calreticulina

continua

continuação

Tabela 7 - Genes relacionados a oxirredução

GENE	FUNÇÃO	PROTEÍNA
MAPK8	A proteína codificada por este gene é um membro da família MAP quinase. MAP quinases atua como um ponto de integração para múltiplos sinais bioquímicos e estão envolvidos em uma ampla variedade de processos celulares, tais como a proliferação, diferenciação, desenvolvimento e regulação de transcrição.	JNK
BCL2	Este gene codifica uma proteína integrante da membrana externa da mitocôndria que bloqueia a morte apoptótica de algumas células.	Bcl-2
ATF4	A proteína codificada por este gene pertence a uma família de proteínas de ligação ao DNA que inclui a família de fatores de transcrição AP-1 e CREBS.	ATF4
CYBB	Em modelos específicos, a proteína codificada por esse gene está implicada na resposta ao estresse oxidativo do RE.	NOX2
NOX4	Este gene codifica um membro da família de enzimas NOX que funciona como a subunidade catalítica do complexo de NADPH-oxidase. A proteína codificada está localizada em células não fagocíticas que atua como um sensor de oxigênio e catalisa a redução de oxigênio molecular para várias espécies de oxigênio reativas (ROS).	NOX4
CANX	Este gene codifica um membro da família das calnexinas as quais atuam como chaperonas moleculares. Pode, também, desempenhar um papel central no controle de qualidade do dobramento das proteínas por meio da retenção para posterior degradação dentro do ER de subunidades de proteínas incorretamente dobradas.	Calnexina
ERP44	A proteína codificada regula ativamente o transporte de íons de cálcio.	PDI10
ATG5	A proteína codificada está envolvida em vários processos celulares, incluindo a formação de vesículas autofágicas, controle de qualidade após dano oxidativo mitocondrial, apoptose, entre outros.	Atg5
ADAM17	Este gene codifica um membro do ADAM (uma desintegração e metaloprotease de domínio). Os membros desta família são proteínas ancoradas à membrana estruturalmente relacionados com desintegrinas de veneno de cobra e que têm sido implicadas numa variedade de processos biológicos envolvendo interações célula-célula e célula-matriz.	<i>ADAM metallopeptidase domain 1</i>
PDIA3	Este gene codifica uma proteína do retículo endoplasmático, que interage com a chaperonas de lectina e calreticulina calnexina para modular a dobragem das glicoproteínas sintetizadas de novo.	Grp58
HSPA5	A proteína codificada por este gene é um membro da família de 70 proteínas de choque térmico (HSP70). Ele está localizado no lúmen do RE, e está envolvido na dobragem e montagem de proteínas no RE.	<i>Grp78 ou heat shock protein family A (Hsp70) member 5</i>
TGM2	As transglutaminases são enzimas que catalisam a reticulação de proteínas por meio de ligações glutamyl-lisina isopeptídicas épsilon gama. Embora a estrutura primária de transglutaminases não seja conservada, todos eles têm a mesma sequência de aminoácidos nos seus sítios ativos e a sua atividade é dependente de cálcio. A proteína codificada por este gene atua como um monômero, é induzida por ácido retinoico, e parece estar envolvida em apoptose.	Transglutaminase 2

continua

conclusão

Tabela 7 - Genes relacionados a oxirredução

GENE	FUNÇÃO	PROTEÍNA
HSPA5	A proteína codificada por este gene é um membro da família de proteínas de choque térmico (HSP70). Ele está localizado no lúmen do RE e está envolvido no dobramento e na montagem de proteínas no RE. Uma vez que esta proteína interage com muitas proteínas de RE, pode desempenhar um papel-chave no transporte de proteínas de monitorização através da célula.	HSPA5
NOX3	Estas enzimas têm a capacidade de geração de superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) e de transporte de elétrons através da membrana plasmática.	<i>NADPH oxidase 3</i>
NOX1	Este gene codifica um membro da família de NADPH-oxidase de enzimas responsáveis pela transferência catalítica de um elétron de oxigênio para gerar superóxido ou peróxido de hidrogênio.	<i>NADPH oxidase 1</i>
NQO1	Este gene é um membro da família da NADPH-desidrogenase de NAD e codifica uma redutase citoplasmática. Esta proteína de ligação ao FAD forma homodímeros e reduz quinonas em hidroquinonas. Esta atividade enzimática da proteína impede a redução de um elétron de quinonas que resulta na produção de espécies radicais.	<i>NAD(P)H quinone dehydrogenase 1</i>
TXNRD2	Este gene codifica um membro da família de classe I piridina – oxidoredutase de nucleótidos dissulfureto. A proteína codificada é um flavoenzima contendo selenocisteína que mantém tiorredoxinas num estado reduzido, desempenhando, assim, um papel-chave na regulação do ambiente celular redox.	<i>Thioredoxin reductase 2</i>
TXNRD1	Este gene codifica um membro da família de oxidoredutases piridina nucleótidos. Esta proteína reduz tiorredoxinas assim como outros substratos, e desempenha um papel no metabolismo de selênio e a proteção contra o estresse oxidativo.	<i>Thioredoxin reductase 1</i>
HSPA1A	Este gene codifica uma proteína de choque térmico de 70 kDa. Em conjunto com outras proteínas de choque de calor, esta proteína estabiliza proteínas existentes contra agregação e medeia o enrolamento das proteínas recentemente traduzido no citosol e nas organelas.	<i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 1A</i>
HSP90	Este gene codifica um membro de uma família das chaperonas moleculares do metabolismo de trifosfato de adenosina (ATP), com funções de estabilização e dobragem de outras proteínas. A proteína codificada está localizada nos melanossomas e no retículo endoplasmático.	<i>Heat shock protein 90 ou GRP94</i>

4.1.11 Análise estatística

4.1.11.1 Dados clínicos e/ou obtidos em prontuário

Todos os dados coletados foram organizados em uma planilha do Excel, para posterior análise. A análise descritiva foi apresentada como frequência e proporção. O teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram usados para determinar a normalidade da distribuição dos

dados e auxiliar na escolha do teste estatístico. Para se testar a diferença de proporções, foi utilizado o teste Exato de Fischer. Na presença de normalidade, a comparação entre duas médias foi realizada por meio do teste T independente e, na ausência de normalidade, foi adotado o teste Mann-Whitney. O programa SPSS (Chicago, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) como estatisticamente significativo.

4.1.11.2 Avaliação genética – Protocolo I

Para testar as diferenças significativas na expressão e modulação dos genes entre os grupos experimentais propostos, a análise univariada de variância *One-way* ANOVA foi utilizada, com valor de $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$ no módulo *Biological Variation Analysis* (BVA) do *software*.

Um limiar (*threshold*) para a razão de modulação da expressão gênica (*fold*) foi também estabelecido neste módulo: $\pm 1,3$ vezes, ou seja, variação de +30% (*upregulated*) ou -30% (*downregulated*) na expressão para cada spot comparado. *One-way* ANOVA foi escolhido, pois é o mais adequado para avaliar quão distantes os componentes analisados estão quando comparados à variabilidade de observações individuais.

Após este tratamento, para os spots que se apresentaram dentro dos limites estabelecidos acima, uma comparação pareada (*pairwise*) foi realizada entre os grupos experimentais utilizando-se o teste de comparações múltiplas de Tukey's. Sendo o teste *One-way* ANOVA significativo, o teste Tukey, que é teste baseado na diferença mínima significativa (DMS), é utilizado para avaliar toda e qualquer diferença entre duas médias de diferentes cenários biológicos.

O *software* utilizado para análise estatística foi o GraphPad Prism 7.0 (*GraphPa Software Inc.*, CA; USA).

4.2 PROTOCOLO II: PROTOCOLO DE ESTUDO EM VALVAS PAREADAS

Nessa etapa, focamos nossa análise em uma população única de pacientes nos quais foi realizada a substituição simultânea das válvulas mitral e aórtica. Simultaneamente, investigamos válvulas mitral e aórtica de controle, obtidas dos mesmos corações, de pacientes submetidos a transplante cardíaco por causas independentes da doença valvar cardíaca. Dessa forma, pudemos comparar as válvulas mitral e aórtica, tanto dentro dos grupos de controle

quanto dos pacientes com doença valvar reumática avançada, além de comparar controle *versus* CRC. O fato de as válvulas cardíacas terem sido obtidas dos mesmos pacientes reduz, significativamente, a variabilidade entre pacientes e nos proporcionou uma visão mais aprofundada sobre alguns mecanismos patofisiológicos moleculares associados à CRC.

4.2.1 Coleta de valvas

4.2.1.1 Coleta de Tecido Humano (Protocolo II)

No total, 26 válvulas cardíacas (VC) foram utilizadas no estudo proteômico (Protocolo II e III). As valvas coletadas, após sua excisão no ato cirúrgico, em tubos de poliestireno com tampa de rosca (*cry.S, Greiner Bio-one*), preservadas em recipiente com gelo e encaminhadas para armazenamento após congelamento imediato com nitrogênio líquido a menos oitenta graus no LIM 64.

O laboratório mantém registros eletrônicos dos materiais recebidos, com identificação de sua origem, número de registro no HC, dados clínicos e laboratoriais.

Folhetos mitrais e aórticos foram obtidos em cirurgias de substituição de válvulas cardíacas devido à estenose grave ou lesão valvar múltipla (protocolo de aprovação do Comitê de Ética Institucional do Instituto do Coração-HC-FMUSP número: 69241117.0.0000.0068). Foi obtido consentimento informado por escrito.

A coleta de válvulas para o grupo de doença cardíaca reumática dos Protocolos II e III foi realizada no bloco cirúrgico do Instituto do Coração. Critérios de inclusão de doadores cirúrgicos: pacientes com doença valvar mitroaórtica combinada sintomática, doença valvar cardíaca sintomática, acompanhados em um departamento especializado em doenças valvares, com indicação médica para substituição de ambas as válvulas. Sete pacientes foram selecionados para compor o grupo. Três válvulas mitrais e três válvulas aórticas foram coletadas de pacientes transplantados cardíacos sem evidência de doença valvar, conforme demonstrado por ecocardiografia. Após a remoção cirúrgica da válvula, o tecido foi preparado para o protocolo laboratorial (Laboratório de Biologia Vascular/LIM 64). O tempo máximo entre a remoção intra cirúrgica da válvula e o congelamento foi de trinta minutos. As válvulas foram armazenadas e congeladas a -80°C até a extração proteômica.

4.2.1.2 Grupo-controle (Protocolo II)

Para compor o grupo de valvas controle (MV e AOV), foram escolhidos 6 pacientes em fila de transplante acompanhados há mais de 5 anos em ambulatório especializado pela equipe de transplante cardíaco do Incor.

Todos os pacientes tinham cardiomiopatia dilatada com anatomia cardíaca amplamente estudada por exames de imagem registrando normalidade das valvas cardíacas sob os aspectos funcionais e morfológicos.

4.2.1.3 Método de análise de proteínas globais (proteômica) por espectrometria de massas (Protocolo II)

O perfil proteômico de 14 válvulas de controle e 14 válvulas reumáticas foi avaliado de forma abrangente. Usando execuções de aquisição dependente de dados (DDA), um total de 1.202 proteínas foram identificadas e quantificadas a partir de mapas do Uniprot. Dentre essas, 393 proteínas foram consistentemente quantificadas em todas as amostras (controle e reumáticas) com FDR <0,01. Todas as execuções foram realizadas em duplicata, com uma correlação de 0,75 entre elas, indicando reprodutibilidade adequada.

4.2.1.4 Análise proteômica *untargeted*

A análise cromatográfica e de espectrometria de massas foi realizada como descrito em^{25,26}, com adaptações descritas resumidamente a seguir.

- **Extração de proteínas para análise por espectrometria de massas:**

Cada valva foi descongelada, as regiões com características morfológicas de músculo foram removidas e o tecido foi dividido em quatro alíquotas equivalentes. Uma das alíquotas foi cortada em fragmentos de, aproximadamente, 1x1mm, congelada em nitrogênio líquido e macerada em cadinho. O macerado foi pesado em balança de precisão em subalíquotas de 200µg, sendo uma delas destinada à proteômica e a outra reservada como *backup* técnico. Esta alíquota analítica foi submetida ao processo de lise celular por aquecimento (80°C/10min) e choque com partículas de sílica no sistema FastPrep, em tampão contendo ácido cacodílico 10%. Os extratos foram submetidos à substituição de tampão (por ureia 8mol/L, TEAB 0,02mol/L pH 8,5), redução (DTT 0,1mol/L), alquilação (iodoacetamida 0,05mol/L) e digestão

(tripsina 1:100 em TEAB 0,02mol/L, pH 7,9 por 9h). Os peptídeos obtidos foram dessalinizados em micro-colunas C-18 *home-made* e quantificados usando-se o sistema Qubit.

- **Fracionamento de proteínas por cromatografia líquida:**

Os peptídeos obtidos foram injetados em sistema cromatográfico (*Dionex Ultimate 3000 RSLCnano UPLC*, Thermo, USA), configurado com coluna de aprisionamento (*trap column*) de 3cm x 100 μ m contendo partículas de C18 5 μ m, 120Å (ReprosilPur, Dr. Maich GmbH), conectada em série à coluna analítica de 24cm x 75 μ m contendo partículas de C18 3 μ m, 120Å (ReprosilPur, Dr. Maich GmbH). As amostras foram injetadas de forma a se obter 1 μ g na coluna, submetidas a gradiente linear de eluição entre solventes A (ácido fórmico 0,1%, acetonitrila 2% em água) e B (ácido fórmico 0,1%, acetonitrila 80% em água) de 12,8% B a 42,3% B durante 155 min.

4.2.1.5 Protocolo para análise por LC MS/MS

As frações separadas no sistema cromatográfico foram eluídas diretamente na fonte de ionização de um espectrômetro de massas Orbitrap Elite (Thermo, USA), configurado para operar em modo DDA (*Data Dependent Acquisition*), sendo que os espectros de íons precursores (MS1) foram adquiridos no analisador Orbitrap, com resolução de 120000 e faixa de m/z entre 300 e 1650. Os 15 íons mais intensos, acima do limite de intensidade de 3000, foram conduzidos à câmara de fragmentação por HCD e os respectivos fragmentos foram analisados também no analisador Orbitrap, gerando espectros de MS2 com resolução de 15000^{27,28}. A reanálise de íons já fragmentados foi inibida por exclusão dinâmica²⁹, favorecendo a identificação de peptídeos menos abundantes.

4.2.1.6 Tratamento e integração de dados

- **Processamento de dados proteômicos:**

Os espectros obtidos foram, inicialmente, analisados de forma qualitativa, permitindo a identificação do conjunto total de proteínas detectáveis nas amostras. A seguir, foi realizada, também, a análise quantitativa, de forma a se identificar quais proteínas apresentaram abundância relativa significativamente diferente entre as condições experimentais. Os métodos utilizados, de forma geral, seguem a estratégia descrita em Siasus et al. e Vringer & Tait^{30,31}, com adaptações detalhadas a seguir.

- **Procedimento para análise qualitativa do experimento:**

O conjunto completo de espectros foi analisado utilizando-se o *software* Peaks versão 7.0 (BSI, USA), para busca nos bancos de dados obtidos do repositório Uniprot em maio de 2021, filtrados para a espécie *Homo sapiens*, tax. ID 9606, submetidos à remoção de sequências redundantes³² utilizando-se o *software* FASTA tools (<http://lbqp.unb.br/LBQPtools/>) e, ainda, filtrado para a opção de um gene por proteína compatível com o proteoma de referência do banco. A busca foi realizada com base em sequenciamento de novo e em PSM, com tolerância para a massa do precursor de 10ppm, e dos fragmentos de 0,05Da, tolerância de até 2 clivagens perdidas, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. Além disso, foram ativados os módulos de busca por modificações do banco Unimod com base em padrões de fragmentação, bem como busca de mutações pontuais³³.

4.2.2 Análise estatística

Os espectros foram analisados com auxílio do programa *Progenesis QI for Proteomics* (Waters, USA)³⁴, com o qual foi realizado o alinhamento dos cromatogramas, a quantificação por área dos picos extraídos (XIC – *Extracted Ion Chromatogram*), normalização e análise estatística (ANOVA) dos eventos de MS1. Os eventos significativamente diferentes (p-valor < 0,05) tiveram seus espectros de MS2 submetidos à identificação utilizando-se o programa Peaks, com os mesmos parâmetros descritos no tópico anterior. Após a inferência de proteínas, a quantificação foi refinada considerando a média dos peptídeos atribuídos a cada proteína e foi realizada a análise estatística em nível de proteínas, sendo consideradas reguladas as proteínas que apresentaram ANOVA p-valor < 0,05. Nas análises univariadas, se consideraram de potencial importância clínica aquelas proteínas com ANOVA p<0,05 e *fold change* de 1,2 para as análises entre os grupos reumáticos e controle assim como um *fold change* de 1,1 para as comparações entre valvas controles entre si e valvas reumáticas entre si. Tais proteínas foram submetidas à análise multivariada de PCA e agrupamento em clusters de acordo com os perfis de abundância relativa. Após a quantificação e identificação utilizando os programas Progenesis e Peaks, todas as análises foram realizadas usando-se a identificação com um ou mais peptídeos e FDR ≤ 0,01.

Uma segunda etapa foi realizada utilizando-se a plataforma *MetaboAnalyst*³⁵, contendo os testes *post-hoc* para definição das condições em que cada proteína se encontra significativamente regulada. Foi também incrementada a análise multivariada de forma a se

obterem pela análise discriminante de mínimos quadrados parciais supervisionada esparsa (sPLS-DA) como forma de aprimorar, em relação à análise de PCA, a detecção de grupos de proteínas diferencialmente abundantes³⁶. Foram, também, gerados gráficos de correlações entre as proteínas, resultados que podem ser integrados aos agrupamentos por vias ou por interações descritos abaixo. Após as correções estatísticas, foi gerado novo mapa de correlação entre condições por perfis de abundância para as principais proteínas apontadas pela nova análise, limitada pelo número de proteínas que permitiu o agrupamento das condições experimentais.

4.2.3 Identificação de proteínas

Os identificadores Uniprot ID foram utilizados no site uniprot.org para obtenção de sequências e de anotações de cada proteína. A seguir, os mesmos identificadores foram utilizados nas plataformas G-Profiler e string-db.org para agrupamento de proteínas em função de termos GO, interações e participação em vias, com suas respectivas estatísticas de enriquecimento. A partir da relação de termos GO enriquecidos obtida na plataforma String, foi elaborado um novo nível de agrupamento semântico para tais termos, utilizando o sistema ReviGO. Dessa forma, é possível identificar vias funcionais relacionadas a essas proteínas.

4.3 PROTOCOLO III: MICRODISSECÇÃO A LASER E PROCESSAMENTO BIOQUÍMICO DOS TECIDOS

Os tecidos foram seccionados, montados em lâminas com membranas de polietileno naftalato, corados com Vermelho do Congo e microdissecados a laser em um microscópio Leica LMD6 (Wetzlar, Alemanha). Os fragmentos obtidos foram armazenados em água e, imediatamente, congelados a -80°C . No momento da extração das proteínas, os fragmentos microdissecados foram sedimentados por meio de centrifugação a $15.300 \times g$ a 4°C por 15 min. Após a remoção da água, foram adicionados 50 μL de tampão de descelularização (PBS com 0,5% de Triton X-100 e 20 mM NH_4OH), seguido por incubação no equipamento Thermomixer C (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 10 min a 37°C e agitação a 750rpm. A seguir, o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf Protein *lowbind* de 0,5mL (fração celular) e adicionados 10 μL do tampão de neutralização da fração celular (DTT 0,5M, TEAB 1 M). O pellet contendo os cortes foi, então, ressuspensão em 50 μL de tampão de lise da matriz (N-dodecil β -D-maltosídeo 0,05%, TEAB 0,5 M e DTT 0,25 M). Ambas as frações foram

incubadas por 10 min a 95°C sob agitação de 1400rpm. Em seguida, as frações contendo os cortes foram sonicadas no equipamento Bioruptor (Diagenode, Seraing, Bélgica) à potência média em 3 ciclos de 15s com 30s de intervalo. Um novo ciclo de incubação foi conduzido no equipamento Thermomixer (10 min, 95°C e agitação de 1400rpm). Seguiu-se a adição do tampão de desnaturação e alquilação (30µL para a fração celular e 50µL para a fração de matriz; ureia 8M, iodoacetamida 25mM em TEAB 50mM). Uma nova incubação foi realizada no equipamento Thermomixer a 21°C, sob agitação de 1400rpm e com proteção da luz por 30min. Foram, então, adicionados 20µL da suspensão de Seramag (20mg/mL) em tubos LowBind de 1,5mL. Os conteúdos dos tubos de 0,5mL foram transferidos para tubos de 1,5mL e homogeneizados por inversão. Adicionamos, a seguir, 400µL de acetona, seguido de homogeneização. Os tubos foram mantidos em freezer a -30°C overnight.

Na segunda etapa, conduzida no dia posterior, foi realizada uma nova centrifugação a $20800 \times g$, a 4°C por 10min. Os tubos foram colocados em uma rack magnética e o sobrenadante removido. Os tubos foram submetidos a dois ciclos de lavagem com 500µL de etanol 80%, sem ressuspensão dos pellets magnéticos. Após a última lavagem, foram adicionados 80µL de tampão de digestão (bicarbonato de amônio 50mM com 0,025% de N-dodecil β-D-maltosídeo). Foram, então, adicionados 2µL de rLysC 0,2µg/mL e seguiu-se a incubação por 2h a 37°C, sob agitação de 700rpm. Após adição de 5µL de tripsina 0,2 µg/mL, foi realizada uma nova incubação por 16h, a 37°C e sob agitação de 700 rpm.

Na terceira etapa, realizada no dia seguinte, os tubos foram acidificados com 5µL de TFA 10% e os sobrenadantes diretamente transferidos para placas Oasis µElution (Waters, Milford, Estados Unidos) pré-condicionadas com 200µL de acetonitrila e 200µL de TFA 0,1%. Os poços de SPE (*solid phase extraction*) foram lavados com 800µL de TFA 0,1%, seguidos de 200µL de H₂O milliQ, e eluídos em uma placa Protein LowBind com 30µL de acetonitrila 70%. Os eluatos foram secos em speed-vac e ressuspensos em 15µL de acetonitrila 15% e TFA 0,5% por meio de incubação no Thermomixer por 10min com agitação a 600rpm, e diluídos com a adição de 35µL de água.

4.3.1 Análise proteômica

Os extratos obtidos foram injetados no sistema de NanoUltimate acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo híbrido quadrupolo-orbitrap Exploris240 (*Thermo Fisher Scientific*, Bremen, Alemanha). O sistema de nanocromatografia conta com uma coluna de captura Acclaim PepMap100 C18 5µm, 100Å 300µm x 3mm (*Thermo Fisher*

Scientific, San Jose, Estados Unidos) e uma coluna analítica de fase reversa Aurora Elite TS C18 1,7 μ m, 120 \AA , 15cm x 75 μ m (IonOptiks, Fitzroy, Austrália) mantida a 40°C. A captura e dessalinização dos peptídeos foi realizada em 2min com um fluxo de 50 μ L/min de TFA 0,1%. A separação na coluna analítica foi obtida com um gradiente binário de acetonitrila contendo 1% de DMSO e 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B) em água contendo 1% de DMSO e 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O fluxo foi de 0,4 μ L/min e a concentração de B foi mantida inicialmente em 5% por 1min e, a seguir, elevada para 30% em 29min, de 30 a 50% em 5min, elevada para 90% em 1min, mantida nessa condição por 2min. A aquisição dos dados foi feita no modo *Data Independant Aquisition* (DIA). A resolução em MS1 foi 60.000 a 200m/z e o intervalo de m/z adquirido foi de 300 a 1200. Os espectros de dissociação foram obtidos a partir da seleção de janelas de 25m/z com overlap de 2m/z no intervalo de 310 a 1010m/z a uma resolução ajustada para 15.000 a 200m/z. Os dados brutos foram preliminarmente avaliados pelo software DIANN versão 18.1 (<https://www.nature.com/articles/s41592-019-0638-x>) no modo *library-free* (biblioteca espectral gerada a partir dos dados brutos e biblioteca FASTA *Uniprot reviewed* baixada em 13/10/2023). No primeiro ciclo, foram determinadas as correntes iônicas e intensidades obtidas pela injeção de 1 μ L de extrato. Uma nova análise foi realizada ajustando os volumes de forma a equalizar a concentração dos extratos trópticos. A segunda análise foi também processada pelo DIANN e o arquivo de saída obtido foi analisado pelo pipeline estatístico MS-DAP (<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.2c00513>) no R.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 PROTOCOLO I – ESTUDO COM VALVAS NÃO PAREADAS

Inicialmente, foi realizado um experimento com as valvas mitrais reumáticas e aórticas reumáticas para avaliar se, geneticamente, haveria diferenças entre esses grupos quanto à expressão de genes relacionados às principais características fenotípicas apresentadas pelas valvas em vigência da doença (imunoinflamação, fibrose e calcificação). Experimentos para análise fenotípica das valvas e, em seguida, análise genética foram realizados.

5.1.1 Avaliação clínica e ecocardiográfica

Nas Tabelas 8 e 9, as características clínicas e ecocardiográficas do RAOV e RMV (Protocolo I).

Tabela 8 - Dados clínicos doença cardíaca reumática

Doença Cardíaca Reumática				
	Controle Aórtico/Mitral	Aórtico	Mitral	p-value**
Pacientes	3 (50% M)			
Doença valvar				
Sexo masculino	50%	42%	42%	
Total (n)	4	4	4	
Idade (anos)	35 ± 5	47±7		0,0009
		39 ± 10	59 ± 3	
ECO-FEVE (%)*	-	62 ± 7	60 ± 10	0,000
Lesão celular		100% dupla lesão		
NYHA II-III *	-	100%	100%	
Massa VE	-	99 ± 20	110 ± 40	0,853
DDVE *	-	46 ± 8	58 ± 15	0,041
DSVE *	-	29 ± 7	38 ± 10	0,002

* ECO-FEVE fração de ejeção;

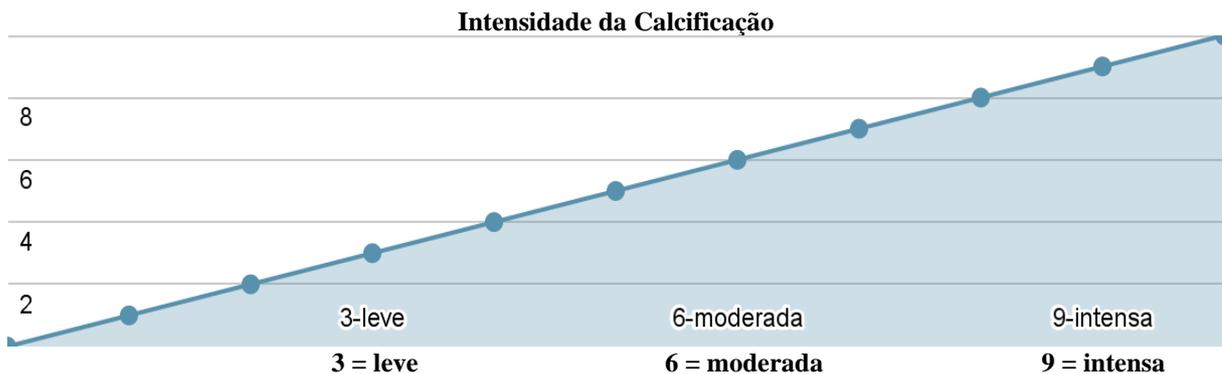
** teste t de Student

DDVE: Classificação *New York Heart Association*; DSVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Legenda: Análise clínica dos grupos com relação à idade, sexo, classe funcional pelo *New York Heart Association* (NYHA), lesão valvar predominante, tempo de doença, integridade da função cardíaca pelo ecocardiograma (fração de ejeção – FEVE) e diâmetros ventriculares

Tabela 9 - Quantificação da calcificação protocolo I

Angiotomografia Pré-Operatória			
Grupos	Cálcio mitral	Cálcio aórtico	Cálcio coronariano
Mitral Reumático	8	3	3
Aórtico Reumático	3	6	6



Fonte: Produção da autora (2024)

Nota: Análise qualitativa da calcificação valvar.

5.1.2 Análise de calcificação por meio de angiotomografia computadorizada valvar

A intensidade de cálcio nas amostras obtidas por dados de angiotomografia gateada em tomógrafo de 320 canais foi identificada e atribuída uma graduação numérica com a finalidade de quantificar o cálcio por meio de imagens. A pontuação 9 caracteriza calcificação intensa de todas as cúspides, 6 calcificação valvar moderada e 3 calcificação leve das valvas.

A valvopatia mitral reumática predominante se mostrou mais intensamente calcificada, em relação às valvas aórticas ou ao cálcio coronariano.

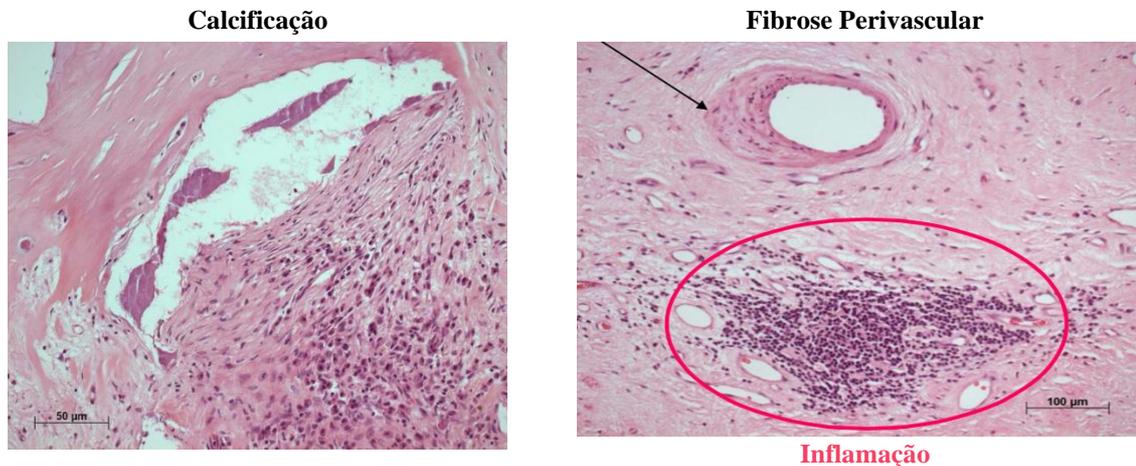
Na valvopatia aórtica reumática predominante, o cálcio aórtico demonstrou uma calcificação moderada (em comparação com o predominantemente mitral) e moderado acometimento coronariano calcífico.

5.1.3 Histopatologia

O estudo histopatológico foi realizado no serviço de patologia do Instituto do Coração-HCFMUSP pelo mesmo patologista. Todas as valvas mitrais reumáticas e aórticas reumáticas tiveram seu diagnóstico patológico compatível com sequelas de febre reumática. As valvas do grupo-controle obtiveram o diagnóstico de valvas saudáveis.

Foi observado que as valvas mitrais do grupo reumático apresentavam processo inflamatório e de reparação, ou seja, fibrose, mais intenso que o grupo aórtico.

Figura 3- Valvas reumáticas - Protocolo I



Fonte: Produção da autora (2024).

A análise fenotípica quanto a parâmetros clínicos e ecocardiográficos, análise da quantificação da calcificação por angiotomografia de amostras mitrais reumáticas e aórticas, e análise histopatológica sugerem que, de fato, a calcificação, imunoinflamação e fibrose são mais exuberantes nas valvas mitrais reumáticas em comparação à aórtica reumática. Dessa forma, foi, então, realizada a análise genética desse grupo em busca de padrões que definem essas diferenças.

Assinaturas genômicas direcionadas a genes de interesse destacam possível evolução específica das válvulas na CRC.

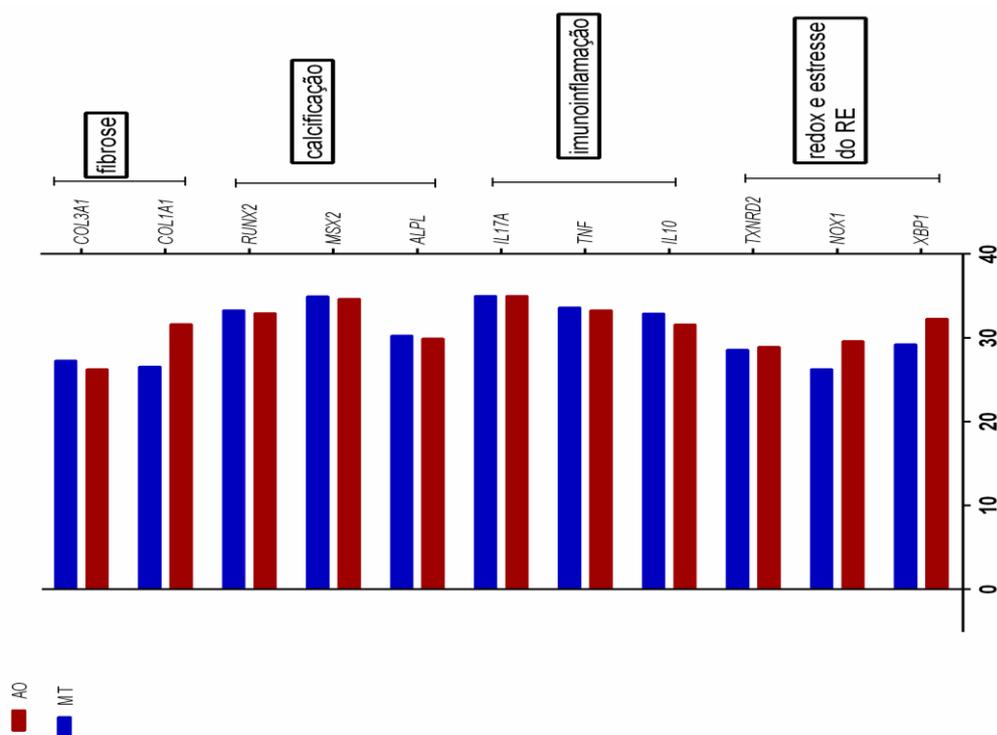
Para obter insights sobre possíveis características intrínsecas dos processos avançados da doença reumática, inicialmente, conduzimos uma triagem transcricional direcionada exploratória das válvulas mitral (MV) e aórtica (AOV) coletadas de diferentes pacientes durante a substituição cirúrgica, e as comparamos com nossas amostras-controle, pareadas por idade e coletadas em autópsia, assim como com amostras de pacientes com doenças valvares de outras origens (ver métodos). A investigação incluiu 84 genes selecionados em quatro processos biológicos que caracterizam a doença valvar em geral (calcificação, fibrose, inflamação imunológica e estresse redox/retículo endoplasmático) (Tabelas 3-7).

5.1.4 Análise genética do Grupo-controle (MV e AOV) - Protocolo I

Inicialmente foi realizado a análise do grupo-controle a fim de elucidar se haveria diferença de padrão da expressão dos genes possivelmente relacionados às alterações fenotípicas sugeridas nos experimentos anteriores entre os grupos reumáticos mitral e aórtica.

A análise dos valores absolutos das expressões dos principais genes relacionados aos processos de fibrose, calcificação, imunoinflamação e estresse do retículo sugere que a expressão desses genes são quantitativamente equivalentes não havendo diferença de expressão significativa entre os subgrupos mitral e aórtico controle do Protocolo I (Figura 4).

Figura 4 - Protocolo I: Análise genética de AOV E MV



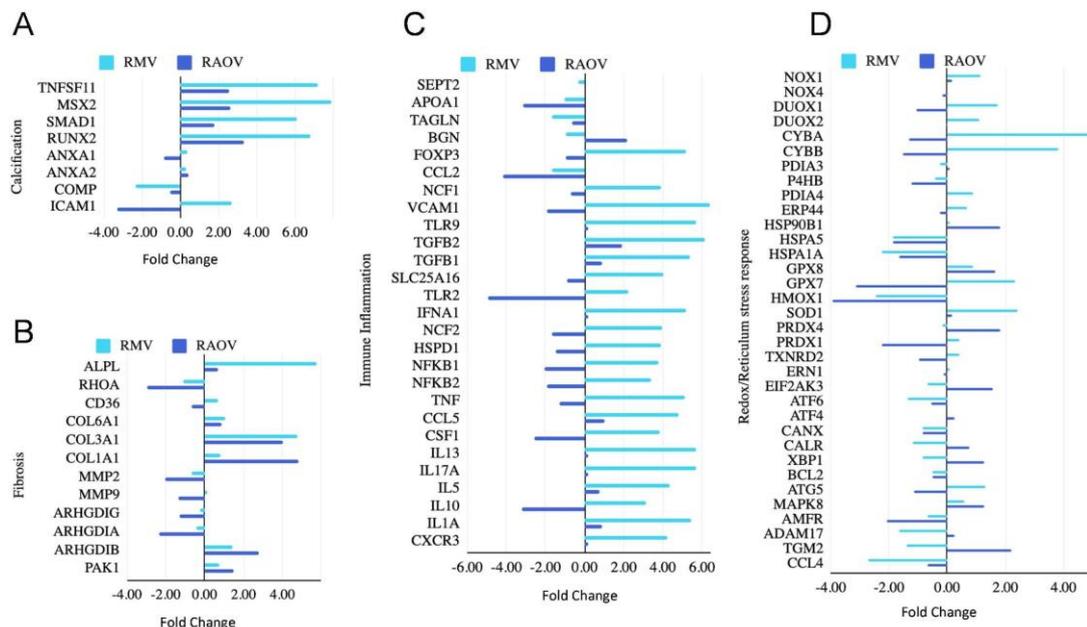
Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: Análise genética do controle. A análise gênica representa a quantificação da expressão de alguns genes dos 94 analisados das amostras normais obtidas do SVO-FMUSP. A expressão gênica das valvas mitrais está em azul e as aórticas, em vermelho.

5.1.5 Análise genética RAOV e RMV (Protocolo I)

Foi, então, realizada a análise do padrão genético das valvas doentes em comparação com as valvas sem evidência de patologia do grupo-controle.

Observam-se padrões distintos de alguns dos genes relacionados ao processo de imunoinflamação e calcificação entre as valvas mitral reumática e aórtica reumática (Figura 5).

Figura 5 - Protocolo I: Análise genética RAOV *vs* AOV e RMV *vs* MV

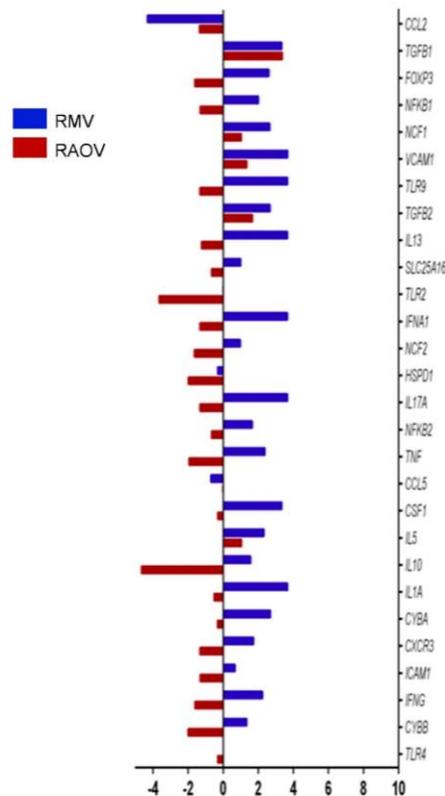
Fonte: Produção da autora (2024).

Nota: (A) Calcificação, (B) Fibrose, (C) Imunoinflamação e (D) Processos redox. N=8.

Legenda: Análise genômica de válvulas do protocolo I comparando válvulas cardíacas reumáticas *vs.* controles. Representação gráfica das mudanças de expressão gênica em RAOV *vs.* AOV e RMV *vs.* MV.

Para complementar a avaliação anterior, realizou-se a análise separada de uma amostra de valva aórtica e mitral retirada do mesmo indivíduo submetido à dupla troca mitroaórtica e, portanto, com mesmo tempo de doença dentre outros fatores epigenéticos e mesma carga genética.

Embora os genes relacionados ao processo de calcificação tenham apresentado aumento (*vs.* controle) tanto na RMV quanto na RAOV, 5 (de 8) tiveram maior expressão na RMV *vs.* RAOV (Figura 5A). Vinte e dois (22) (de 27) genes inflamatórios-imunológicos exibiram maior expressão na RMV *vs.* RAOV (Figura 5C). Tanto a RMV quanto a RAOV apresentaram assinaturas gênicas consistentes de processos relacionados ao redox e à fibrose [*vs.* controle] (Figura 5B-D). A descoberta de genes mais expressos de inflamação e calcificação na RMV *vs.* RAOV, incluindo um conjunto comparativo do mesmo paciente (Figura 6), destaca possíveis fatores específicos da válvula envolvidos na evolução da DRC. Embora esse conjunto de dados exploratório apresente limitações intrínsecas devido ao tamanho da amostra e à escolha arbitrária dos genes, esses resultados motivou a coleta de amostras para análise proteômica de pacientes submetidos à substituição dupla de MV e AOV, minimizando as diferenças genéticas e os perfis da doença entre os indivíduos.

Figura 6 - Protocolo I: Análise genética de valvas reumáticas obtidas do mesmo paciente

Fonte: Produção da autora (2024).

Nota: Valva aórtica (representada em vermelho) e mitral (representada em azul) retirada do mesmo paciente reumático em mesmo momento cirúrgico evidenciando assinatura imunoinflamatória maior em valva mitral. Legenda: Representação quantitativa dada em medidas de *fold-change* da expressão de genes ligados ao processo de imunoinflamação da valva mitral e aórtica comparados ao MRV e AOV (Protocolo I)

5.2 PROTOCOLO II – ESTUDO COM VALVAS PAREADAS

O estudo do padrão genético da doença mitral evidenciou não só padrões de imunoinflamação, fibrose, calcificação além de oxirredução maior nas valvas reumáticas assim como sugerem padrões diferentes quanto à valva acometida mitral ou aórtica. Entretanto, uma limitação do estudo foi a variabilidade genética inerente entre indivíduos que compuseram o experimento além do direcionamento da análise genética para genes sabidamente envolvidos em vários processos de doença que culminam com fibrose, calcificação imunoinflamação e reações de oxirredução.

Foi, então, realizado o experimento da análise global e em larga escala dos Proteomas, que são o conjunto de proteínas e suas isoformas expressas em uma amostra biológica com valvas pareadas obtidas do mesmo paciente com mesmo tempo de doença e mesma epigenética.

5.2.1 Avaliação clínica e ecocardiográfica

As características clínicas (Tabela 10) e ecocardiográficas (Tabela 11) dos pacientes mitroaórticos com doença cardíaca valvar reumática (RMV e RAOV) e o controle (MV e AOV).

Tabela 10 - Características clínicas Protocolo II.

Características	Grupo-controle (N=6; 46,16%)	Doença reumática (N=7; 53, 84%)	p
Idade	43,50 ± 7,17	59,43 ± 7,25	0,002 *
IMC	27,83 ± 7,70	26,00 ± 3,69	0,586 °
Gênero			0,592 **
Feminino	2 (33,30%)	4 (57,10%)	
Masculino	4 (66,70%)	3 (42,90%)	
Classificação NYHA (%)			0,029 **
II e III	1 (16,70%)	6 (85,70%)	
IV	5 (83,30%)	1 (14,30%)	
Antecedentes			
HAS	3 (50,00%)	4 (57,10%)	1,000 **
DM	0 (00,00%)	1 (14,30%)	1,000 **
DLP	3 (50,00%)	4 (57,10%)	1,000 **
Tabagismo	2 (33,30%)	2 (28,60%)	1,000 **
IAM	1 (13,30%)	0 (00,00%)	0,462 **
AVE	1 (16,70%)	1 (14,30%)	1,000 **
Fibrilação atrial	3 (50,00%)	5 (71,40%)	0,592 **

*Test T independente; **Teste exato de Fischer;

Mann-Whitney; p < 0,05: significância estatística;

IMC: índice de massa corporal; NYHA: *New York Heart Association*; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; DLP: dislipidemia; IAM: infarto do miocárdio; AVE: acidente vascular encefálico; PSAP (mmHg): pressão da artéria pulmonar; ECO-FEVE (%): fração de ejeção do ventrículo esquerdo; ECO-MASSA VE (g/m²): massa de ventrículo esquerdo; DDVE (mm): diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo; DSVE (mm): diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; IECA: enzima conversora de angiotensina; BRA: bloqueadores de receptores da angiotensina.

Legenda: Características clínicas dos pacientes com doença crônica reumática e controles. Os pacientes do grupo de estudo eram mais velhos e estavam em classe funcional (NYHA) menor quando comparados ao grupo controle.

Tabela 11 - Características ecocardiográficas Protocolo II

Variáveis	M ± DP
AVAO (cm ²)	0,92 ± 0,13
AVMI (cm ²)	1,14 ± 0,37
GRDMT MAX (mmhg)	20,86 ± 7,29
GRDMIT MED (mmhg)	10,43 ± 4,68
GRDAOMX (mmhg)	65,71 ± 17,10
GRDAO MED (mmhg)	40,57 ± 11,47
LVM – Estenose	
Normal	0 (00,00%)
Leve/Discreto	1 (16,70%)
Moderado	1 (16,70%)
Importante	4 (67,70%)
LVM-Insuficiência	
Normal	0 (00,00%)
Leve/Discreto	2 (33,30%)
Moderado	2 (33,30%)
Importante	2 (33,30%)
LVA – Estenose	
Normal	0 (00,00%)
Leve/Discreto	0 (00,00%)
Moderado	2 (16,70%)
Importante	5 (83,30%)
LVA – Insuficiente	
Normal	0 (00,00%)
Leve/Discreto	0 (00,00%)
Moderado	2 (33,30%)
Importante	4 (67,70%)

M: média; DP: desvio padrão; AVAO: área valvar aórtica; AVMI (cm²): área valvar mitral; GRDMT MAX (mmhg): Gradiente mitral máximo; GRDMIT MED (mmhg): gradiente mitral médio; GRDAOMX (mmhg): gradiente aórtico máximo; GRDAO MED (mmhg): gradiente aórtico médio; LVM: lesão valvar mitral; LVA: lesão valvar da aórtica.

Legenda: Características da lesão valvar mitral e da aórtica de pacientes RMV E AOV (n=6) do Protocolo II. No grupo estudado, há predominância de dupla lesão valvar mitral com predominância do tipo estenose e, na valva aórtica, dupla lesão com predominância de insuficiência.

5.2.2 Extração proteica das valvas mitrais e aórticas reumáticas e valvas controles

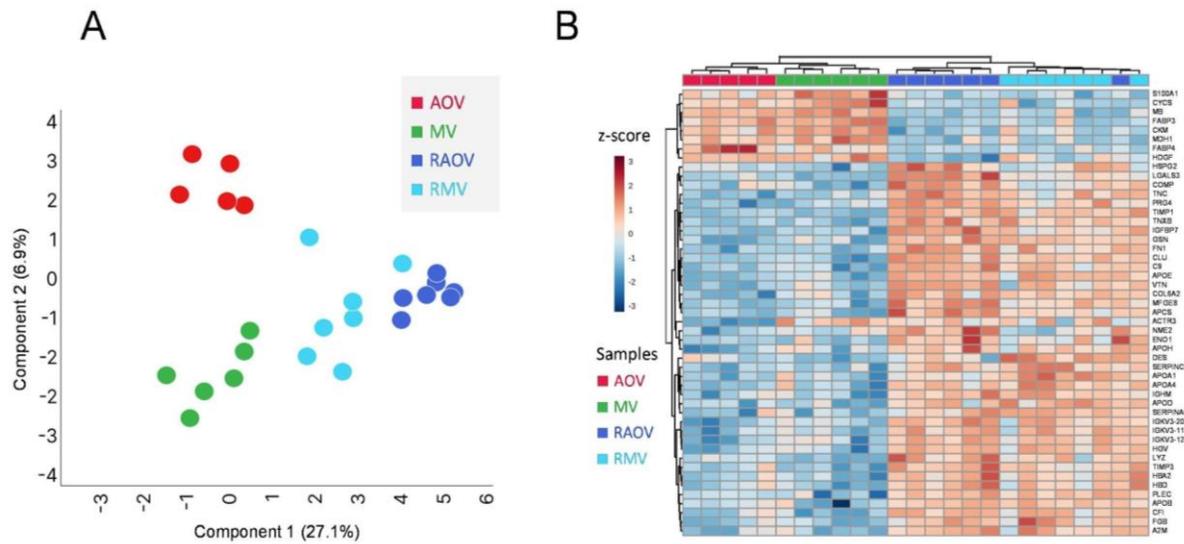
O processo de extração de proteínas forneceu um rendimento que não variou significativamente em função da origem do material: controles (MV E AOV) e pacientes com doença reumática cardíaca (RMV E RAOV). Entre as condições analisadas (ANOVA p-valor<0,05), foram encontradas 393 proteínas reguladas. Dessas proteínas reguladas, foram consideradas para análise em banco de dados de interações proteína-proteína conhecidas e previstas aquelas com *fold change* maior que 20%, ou seja, 1,2. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais); eles decorrem da previsão computacional, da transferência de conhecimento entre organismos e de interações agregadas de outros bancos de dados (primários).

5.2.3 Perfil proteômico global de MV e AOV do mesmo indivíduo de controles normais e pacientes com CRC

Inicialmente, foi realizada uma análise multivariada para identificar padrões proteômicos gerais nos grupos estudados e seu modo de agrupamento. Tal análise destacou diferenças significativas na expressão de proteínas entre os grupos (Figura 7A). As válvulas reumáticas exibiram padrões de expressão distintos em comparação com os controles normais (Figura 7A), bem como, diferenças entre válvulas mitrais e aórticas (Figura 7A). Cinquenta proteínas foram identificadas como as mais significativas para diferenciar os quatro grupos estudados entre MV e AOV reumáticas e não doentes (Figura 7B). Os resultados dessa análise multivariada mostraram uma segregação estatisticamente significativa dos padrões proteicos entre válvulas normais e doentes. Os processos biológicos relacionados incluem respostas a estímulos ou estresse (Figura 8A). As principais localizações celulares foram: matriz extracelular, vesículas e exossomos (Figura 8B).

Assim, a análise multivariada indica que as válvulas podem ser diferenciadas com base em seus padrões únicos de expressão proteica, não apenas comparando válvulas saudáveis *versus* doentes, mas, também, MV *versus* AOV. Para fins didáticos, os resultados subsequentes serão descritos primeiro como comparações entre MV *versus* AOV, seja em controles seja em pacientes reumáticos. Em segundo lugar, abordaremos as diferenças específicas entre amostras de controle e CRC.

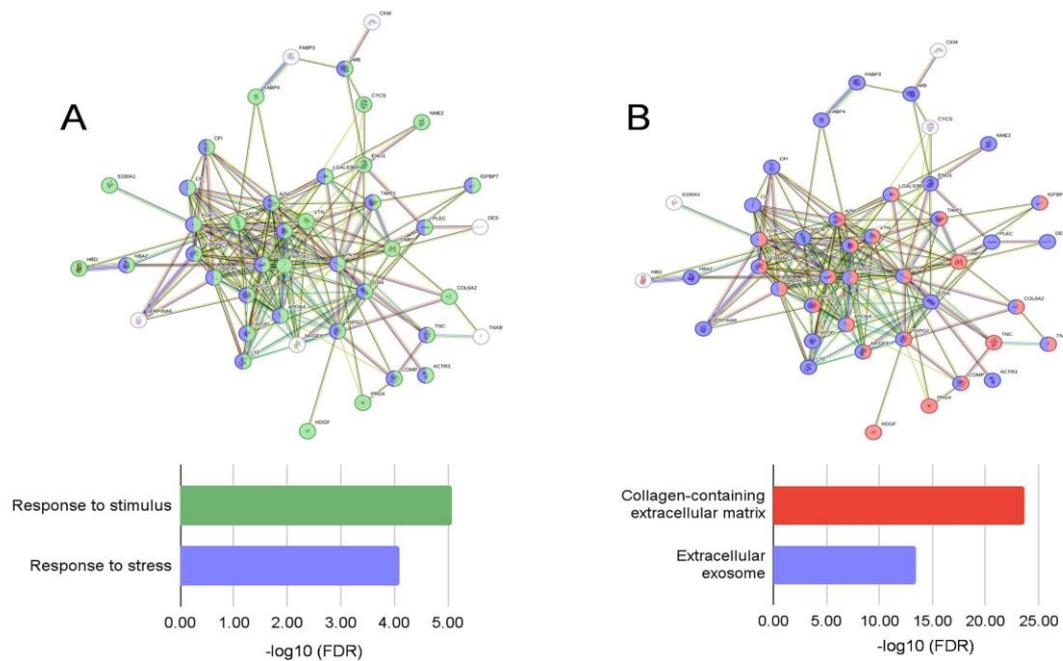
Figura 7 - Protocolo II: Análise multivariada entre os grupos estudados



Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: Análise multivariada DDA-MS de válvulas de todos os grupos. (A) Análise de componentes principais de todos os pacientes com Doença Valvular Reumática e controles. Há diferenças nos padrões proteômicos tanto em relação à válvula afetada quanto ao processo da doença. (B) Clusterização hierárquica não supervisionada das 50 proteínas mais variáveis. Mapa de calor colorido mostra as amostras por cor: RMV (azul), AoV (vermelho), MV (verde), RAOV (azul escuro) e RMV (azul claro). Há um padrão proteômico que caracteriza a doença valvular reumática, mesmo em seu estágio crônico.

Figura 8 - Protocolo II: proteínas mais variantes entre AOV, MV, ARV e MRV



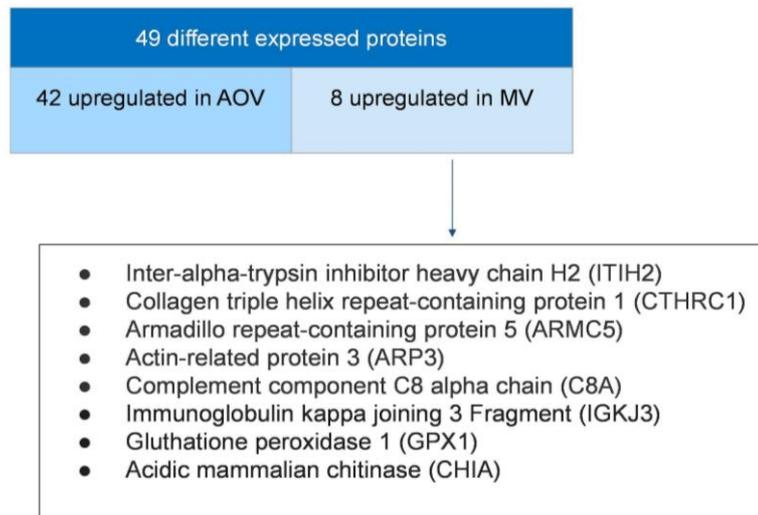
Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: Mapa interativo proteína-proteína das 50 proteínas mais variantes entre todos os cenários estudados (AOV/MV/ARV/MRV). Os processos biológicos referidos de acordo com o banco de dados de *Gene Ontology* são descritos (A), assim como, a localização (componente celular) (B).

5.2.4 Padrão diferencial de expressão proteica entre válvulas aórticas *vs.* mitrais controle e válvulas aórticas *vs.* mitrais reumáticas

Nossa análise sugere assinaturas moleculares específicas entre válvulas mitrais e aórticas, tanto para válvulas reumáticas quanto para válvulas de controle. Portanto, realizamos uma análise detalhada das proteínas diferencialmente expressas entre MV *vs.* AOV do mesmo indivíduo (Figura 9). A clusterização hierárquica não supervisionada revelou grandes agrupamentos de proteínas dentro dos dois tipos de válvulas. Usando análise de enriquecimento a partir do STRING, realizamos anotações sobre processos biológicos para fornecer insights sobre as implicações funcionais desses agrupamentos. Comparações entre MV *vs.* AOV mostraram um total de 49 proteínas com expressão diferencial significativa (valor de *p* ajustado < 0,05 e variação absoluta de expressão >1,1) (Figura 10). Dentre essas, 8 (ARP3, CTHRC1, ITH2, IGKJ3, C8A, GPX1, ARMC5 e CHIA) apresentaram maior expressão na MV e 42 na AOV (Figura 10C). Na AOV, o proteoma foi caracterizado por três grandes agrupamentos de proteínas associadas a processos biológicos essenciais, a saber: 1) formação de matriz extracelular (SOD3, TIMP3, COL14A1, FMOD, ANG, COL18A1, THBS4 e HSPG2); 2) organização do citoesqueleto de actina (PDLIM1, PDLIM3, PDLIM5, PDLIM7, CSR1, CAPZB e MYL9) e 3) proteínas relacionadas a exossomos extracelulares (CAT, RPL23A, ACLY, GSR, FABP4, ENO2 e DES). Vale destacar que proteínas da família LIM e proteínas relacionadas ao citoesqueleto de actina também foram superexpressas na AOV de controle (Figura 10A). O citoesqueleto de actina é considerado um regulador chave das respostas celulares ao seu ambiente mecânico e resposta ao estresse, deformação e rigidez (propriedades mecânicas que variam durante situações de estresse)³⁶⁻³⁷. Proteínas da família LIM, como PDLIM1, são reguladoras do citoesqueleto e da inflamação imunológica. Especificamente, a PDLIM1 regula negativamente a sinalização de NF- κ B, e sua deficiência promove o aumento nos níveis de proteína p65 nuclear, levando à produção elevada de citocinas pró-inflamatórias em resposta a estímulos inatos³⁸. Além disso, proteínas com funções antioxidantes (SOD3, CAT e GSR) também foram mais expressas na AOV (Figura 10B). No geral, os padrões de expressão proteica em MV *vs.* AOV de controle sugerem que a AOV é constitutivamente dotada de níveis mais altos de recursos protetores contra a inflamação e o estresse redox.

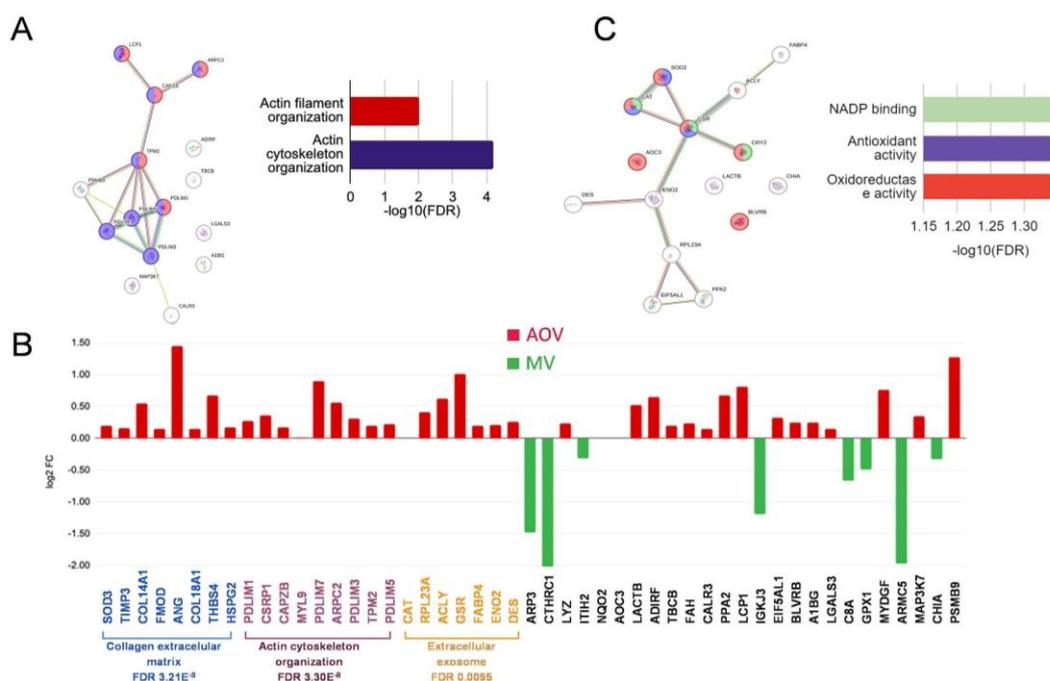
Figura 9 - Protocolo II: AOV vs MV



Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: As comparações entre o controle MV e AOV mostraram um total de 49 proteínas com expressão diferencial significativa (valor-p ajustado <0,05 e mudança de dobra absoluta >1,1). Dentre essas, 8 (ARP3, CTHRC1, ITIH2, IGKJ3, C8A, GPX1, ARMC5 e CHIA) apresentaram expressão mais alta em MV, enquanto 42 mostraram maior expressão em AOV

Figura 10 - Protocolo II: AOV vs MV

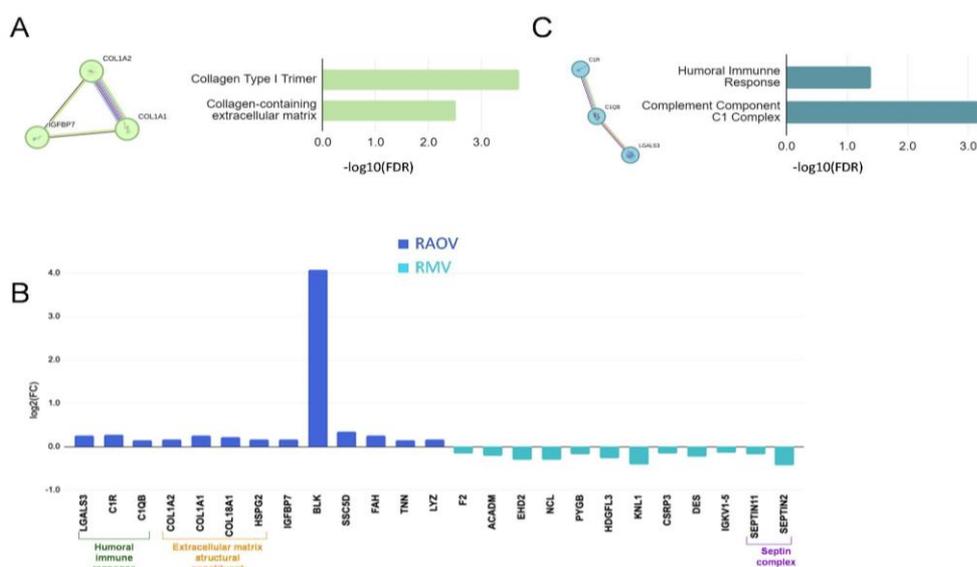


Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: Principais diferenças constitucionais entre válvulas mitrais e aórticas não doentes (Protocolo II) – ambas as válvulas foram obtidas do mesmo indivíduo. Análise de enriquecimento de conjunto de proteínas diferencialmente expressas com base em processos biológicos/moleculares e termos do banco de dados de ontologia genética acessado via String. Cluster de proteínas superexpressas na AOV (A) relacionadas às vias das proteínas da família Lim e ao citoesqueleto de actina, (B) vias de atividade antioxidante, e (C) perfil geral das proteínas diferencialmente expressas em AOV vs. MV, destacando as principais diferenças constitucionais entre elas.

A análise comparativa de RMV e RAOV obtidas do mesmo paciente identificou 27 proteínas com expressão diferencial significativa (Figura 11C). Doze proteínas foram superexpressas na RMV *vs.* RAOV, incluindo F2, ACADM, EHD2, NCL, PYGB, HDGFL3, KNL1, CSRP3, DES, IGKV1, SEPTIN11 e SEPTIN2. No entanto, a análise de enriquecimento funcional não revelou vias específicas associadas a essas proteínas, consistente com sua superexpressão como processos isolados de significado ainda indefinidos. Por outro lado, treze proteínas foram diferencialmente superexpressas na RAOV, associadas a mecanismos biológicos como resposta imune humoral (LGALS3, CIR e CIQB) (Figura 11B-C) e estrutura da matriz extracelular (COL1A1, COL1A2, COL18A1 e HSPG2) (Figura 11A-C). Galectinas, em particular, são conhecidas por regular respostas inflamatórias e imunológicas³⁹, exibindo papéis duplos. A Galectina-3 (Gal-3) exibe efeitos protetores de sobrevivência no coração, entretanto, sua expressão prolongada pode levar à fibrose e ao remodelamento tecidual adverso. A Gal-3 é secretada por tecidos lesionados e ativa fibroblastos para produzir componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo I, ao mesmo tempo em que inibe a degradação da matriz⁴⁰. Isso sugere que, na RAOV, pode haver um componente diferencial de reorganização da matriz extracelular em comparação com a RMV, potencialmente ligado a uma resposta imune humoral distinta.

Figura 11 - Protocolo II: RMV *vs.* RAOV

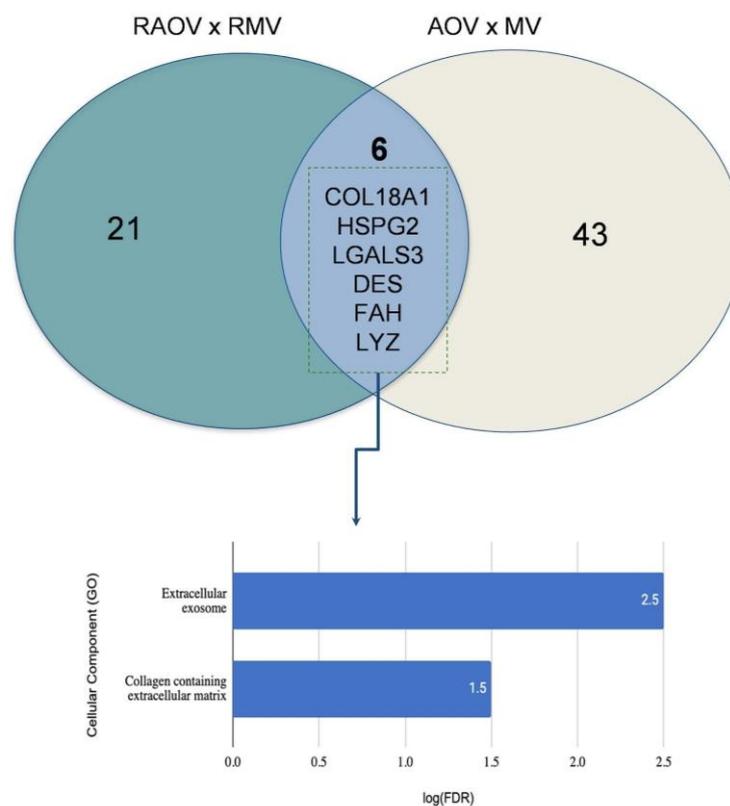


Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: Principais proteínas diferencialmente expressas entre RMV *vs.* RAOV, ambas as válvulas foram obtidas do mesmo indivíduo (Protocolo II). Análise de enriquecimento de conjunto de proteínas diferencialmente expressas com base em termos de processos biológicos no banco de dados de ontologia genética acessado via String. As proteínas identificadas estavam relacionadas a (A) Colágeno e matriz extracelular e (B) Respostas imunológicas. (C) Perfil geral das proteínas diferencialmente expressas em RAOV *vs.* RMV destacando as principais diferenças constitucionais entre elas.

Certas proteínas exibiram expressão diferencial significativa em ambos os cenários: válvulas de controle (AOV *vs.* MV) e RAOV reumática *vs.* RMV. Isso inclui DES, FAH, LYZ, COL18A1, HSPG2 e LGALS3, que foram super expressas nas válvulas aórticas. Essas proteínas podem servir como marcadores inerentes da AOV, distinguindo-a da MV independentemente da exposição a fatores externos (Figura 12).

Figura 12 -Representação gráfica de proteínas em comum entre os cenários controle e doença do protocolo II



Fonte: Produção da autora (2024).

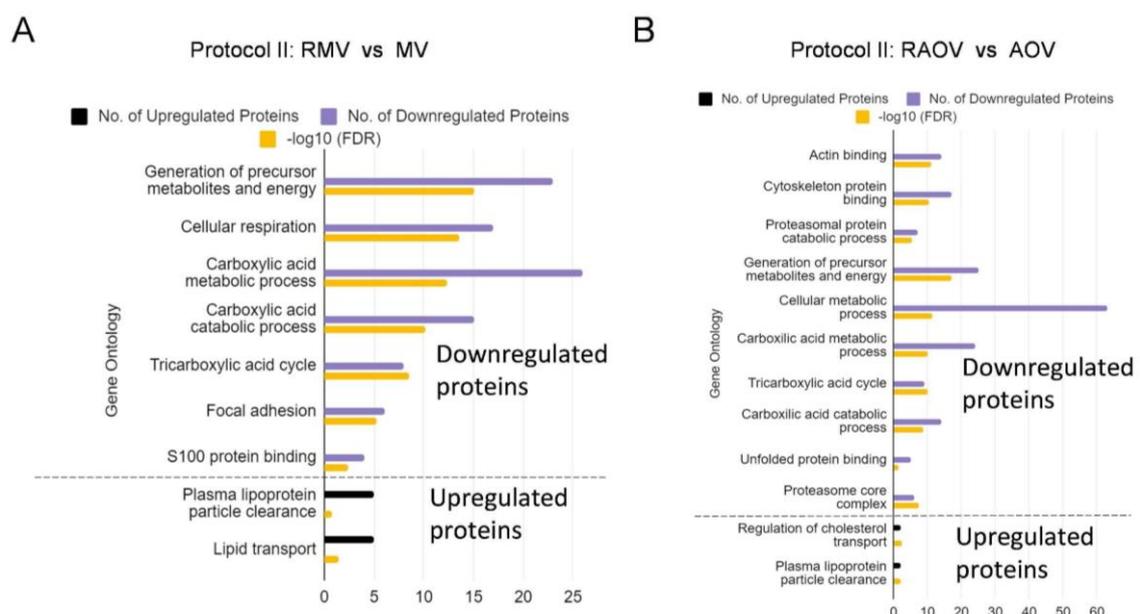
Legenda: Seis proteínas exibiram expressão diferencial significativa em ambos os cenários: válvulas controle (AOV *vs.* MV) e válvula aórtica reumática (AOV) *vs.* MV. Tais proteínas sinalizadas na região de intersecção no gráfico se encontram superexpressas na valva aortica. A análise de enriquecimento de vias foi realizada com base na localização celular.

5.2.5 Assinaturas proteômicas da doença valvar reumática avançada

Para identificar assinaturas proteicas especificamente enriquecidas em RMV ou RAOV, em comparação com suas válvulas de controle correspondentes, realizamos subanálises independentes.

Um total de 158 proteínas foi identificado como diferencialmente expresso entre a AOV reumática e a válvula aórtica de controle (Figura 13B). Curiosamente, apenas 13 proteínas foram superexpressas, enquanto 145 foram supressos na RAOV. Além disso, essas proteínas, predominantemente, se segregam em mitocôndrias, vesículas extracelulares e no citoesqueleto de actina (Figura 14B-C). Em particular, foi observada uma substancial redução na regulação de proteínas associadas às vias metabólicas mitocondriais na RAOV em comparação com a válvula aórtica de controle (Figura 13B). Essas vias estão associadas a complexos proteicos mitocondriais bem como ao metabolismo, incluindo beta-oxidação de ácidos graxos (ACAT1, ACAA2, ACADM, DECR1, ETFB e HSD17B10), ligação de proteínas mitocondriais mal enoveladas (CRYAB, HSPA9, ST13, HSPD1 e HSPE1), oxidação de compostos orgânicos (COX6B1, ATP5F1D, ATP5F1B, CYCS, CYC1, ETFB e DLD) e ciclo do ácido tricarbóxico (ATP5F1A, PDHA1, PDHB, DLST, SDHA, ACO1, FH, DH2, SUCLG2 e OGDHL) (Figura 14). Vale destacar a subregulação da expressão de enzimas glicolíticas e do processo biossintético de acetil-CoA mitocondrial a partir de piruvato (subregulação de PDHA1, PDHB e DLD) e da proteína LDHB⁴¹ (Figura 15).

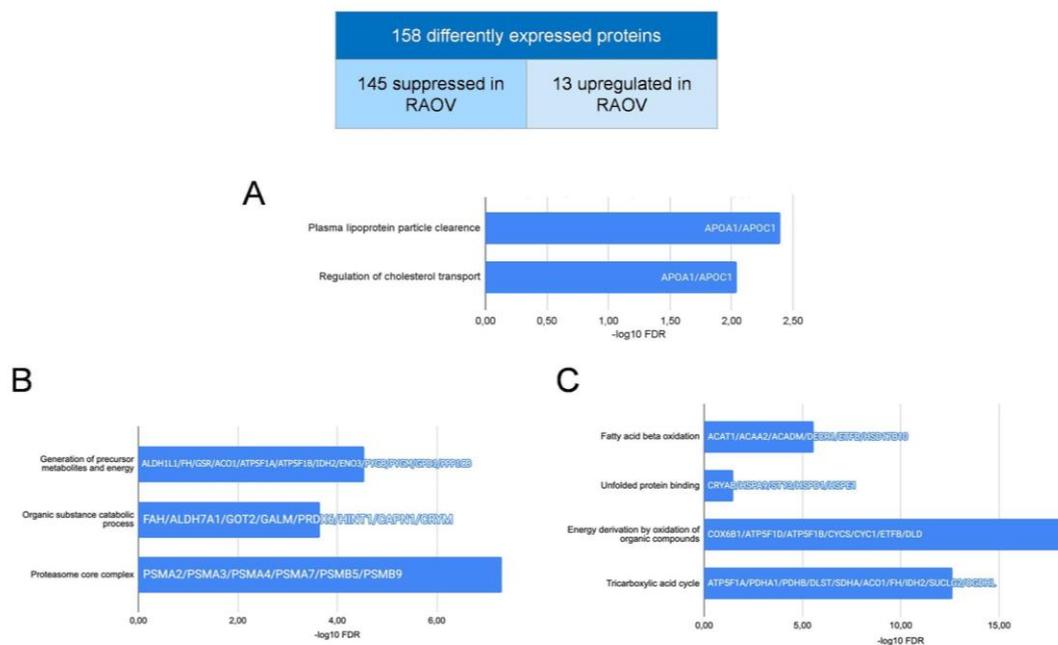
Figura 13 - Protocolo II: Doença vs controle



Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: Vias importantes (e números correspondentes de proteínas) para diferenciar válvulas doentes vs. não doentes em cada cenário. (A) Válvulas do Protocolo II comparando RMV vs MV e (B) Válvulas do Protocolo II comparando RAOV vs. AOV.

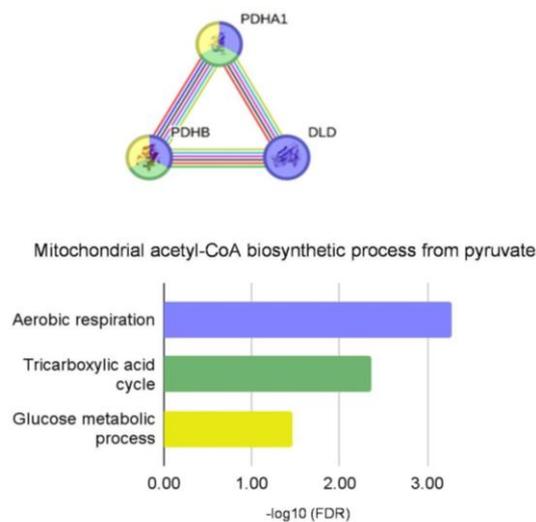
Figura 14 - Protocolo II: RAOV vs AOV



Fonte: Produção da autora (2024).

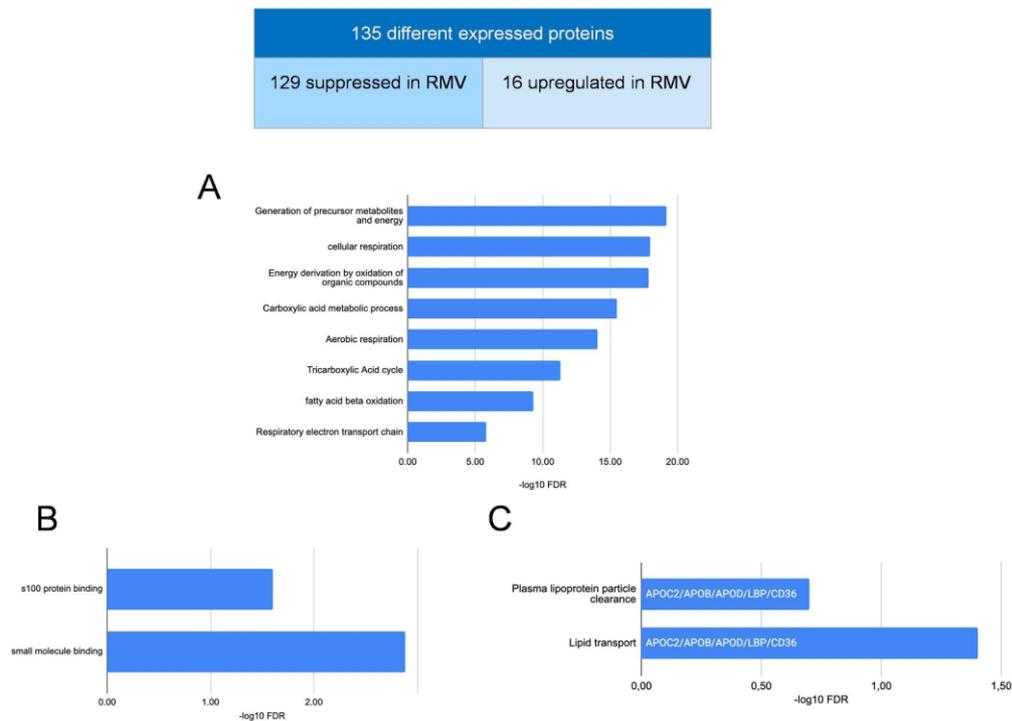
Legenda: Proteínas estatisticamente significativas na diferenciação entre válvula aórtica reumática e válvula aórtica normal foram agrupadas com base no componente celular (banco de dados *Gene Ontology*) e divididas em duas localizações principais: vesícula extracelular e mitocôndria. A análise de enriquecimento proteico das proteínas diferencialmente expressas, com base nos termos de processo biológico no banco de dados *Gene Ontology* acessado através do *String*, identificou assinaturas importantes. (A) mostrou a regulação positiva de proteínas envolvidas na regulação do colesterol, (B) indicou a regulação negativa de proteínas envolvidas no proteassoma e (C) destacou a regulação negativa do metabolismo mitocondrial.

Figura 15 - Protocolo II: Proteínas relacionadas ao processo glicolítico



Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: Mapa interativo proteína-proteína das proteínas reguladas negativamente relacionadas ao processo glicolítico e à biossíntese mitocondrial de acetil-CoA a partir do piruvato.

Figura 16 - Protocolo II: RMV vs MV

Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: Proteínas estatisticamente significativas na diferenciação entre a válvula mitral reumática e a válvula mitral normal. (A) Evidente supressão das proteínas relacionadas ao metabolismo mitocondrial e (B) as vesículas extracelulares (componente celular segundo *Gene Ontology*) e os processos biológicos. (C) Expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios.

Além disso, as proteínas subreguladas na RAOV estão relacionadas à proteostase, ou seja, à homeostase proteica, incluindo proteínas relacionadas à transdução de sinal e ao controle de qualidade. Estas últimas incluem, em particular, proteínas associadas ao sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) (PSMA2, PSMA3, PSMA4, PSMA7, PSMB5 e PSMB9) (Figura 14B). As proteínas do sistema UPS são cruciais para a degradação de proteínas irreversivelmente mal enoveladas no citosol e para a manutenção da homeostase do retículo endoplasmático e da sobrevivência celular em geral^{42,43}. Além disso, o UPS participa de processos inflamatórios, da homeostase redox e do controle do ciclo celular⁴⁴.

Por outro lado, as vias relacionadas ao metabolismo lipídico foram evidentemente superexpressas na RAOV em comparação com a válvula aórtica de controle (Figura 13B). APOA1 e APOC1, que estão correlacionadas com o suporte à esterificação do colesterol, foram, especificamente, superexpressas na RAOV (Figura 14A). De maneira geral, a APOC1 está envolvida em diversos aspectos do metabolismo das lipoproteínas e de HDL, além de regular as respostas inflamatórias e a biologia das células da parede vascular⁴⁵. A Apolipoproteína-A1

(APOA1), um componente crucial das partículas de HDL, está associada à proteção contra a aterosclerose. No entanto, em ambientes perilesionais pró-oxidantes e inflamatórios, a APOA1 e o HDL podem sofrer modificações pós-traducionais, como oxidação e nitratação, afetando sua função. A mieloperoxidase dos neutrófilos suporta esse processo e as subsequentes reações pró-inflamatórias⁴⁶.

A superexpressão de proteínas relacionadas a vesículas extracelulares (Figura 14B) na RAOV é interessante, já que essas vesículas estão envolvidas em trocas significativas de precursores metabólicos, ácidos nucleicos, respostas imunológicas, inflamação e outros processos de sinalização^{47,48}.

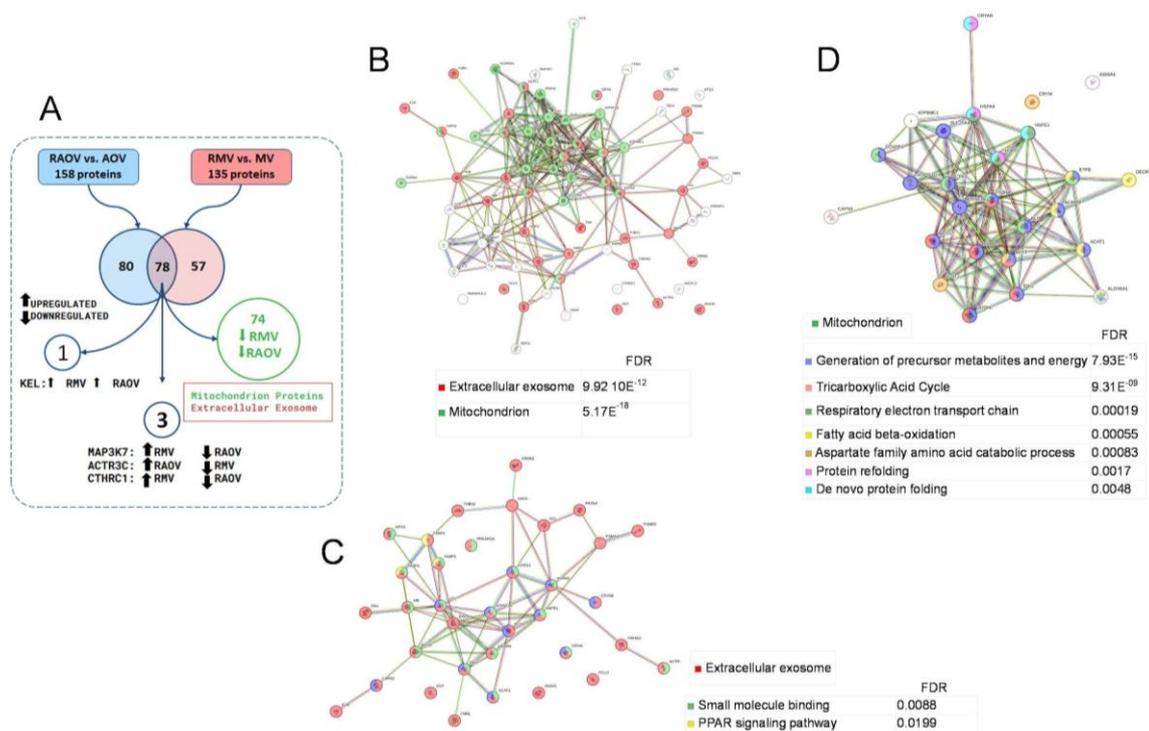
Na RMV, semelhante aos achados na RAOV, a expressão diferencial de proteínas compreende predominantemente supressão de proteínas em comparação com a válvula mitral controle, com 16 proteínas superexpressas e 129 subexpressas identificadas (Figura 16A). As proteínas subreguladas também estavam associadas a dois principais componentes celulares: metabolismo mitocondrial e vesículas extracelulares. A RMV também apresentou uma significativa supressão do metabolismo mitocondrial, com redução na regulação de proteínas associadas a complexos mitocondriais e processos biológicos relacionados, indicando uma diminuição significativa na capacidade do metabolismo mitocondrial (Figura 16B). Juntamente com mudanças análogas observadas na RAOV, o número e a abrangência da supressão de proteínas mitocondriais fazem dessa uma assinatura mais proeminente das válvulas reumáticas em comparação com as de controle.

Notavelmente, a supressão de proteínas do sistema UPS, como PSMA4 e PSMB5, e importantes chaperonas (HSPD1, HSPE1 e HSPA9), apresentou consistentemente tendências nos conjuntos de dados (Figura 16C). Curiosamente, houve uma proteína que foi encontrada como supressão na doença em ambos os cenários: a proteína Kell, conhecida por seu papel como anticorpo de grupo sanguíneo monoespecífico (Figura 17A).

As proteínas suprimidas ligadas a vesículas extracelulares estavam, principalmente, envolvidas na ligação de proteínas S100 e na ligação de pequenas moléculas. Essas moléculas, conhecidas como alarminas ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs)⁴⁹, geram assinaturas específicas de citocinas em células-alvo, influenciando a qualidade e a intensidade das fases inflamatórias subsequentes. As proteínas S100 atuam como mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos nas células cardíacas por meio dos receptores TLR4 e RAGE.

Semelhante à RAOV, houve uma superexpressão de vias relacionadas ao metabolismo lipídico na RMV. APOB, APOD, LBP, CD36 e APOC2 foram superexpressas na RMV em comparação com a válvula mitral de controle, sugerindo seu envolvimento na depuração de partículas de lipoproteínas plasmáticas (Figura 16C). Para entender proteínas cruciais para definir o padrão proteômico geral da DRC, independentemente da válvula afetada, realizamos uma análise global, identificando um total de 74 proteínas supressas na RMV e RAOV (Figura 17A) em comparação com os controles (Figura 17B). Como esperado das análises individuais, as principais vias enriquecidas foram aquelas associadas à função mitocondrial e aos processos de enovelamento de proteínas (Figura 17D), com alguma participação de proteínas relacionadas a vesículas extracelulares (Figura 17C).

Figura 17 - Assinatura proteica na doença reumática



Fonte: Produção da autora (2024).

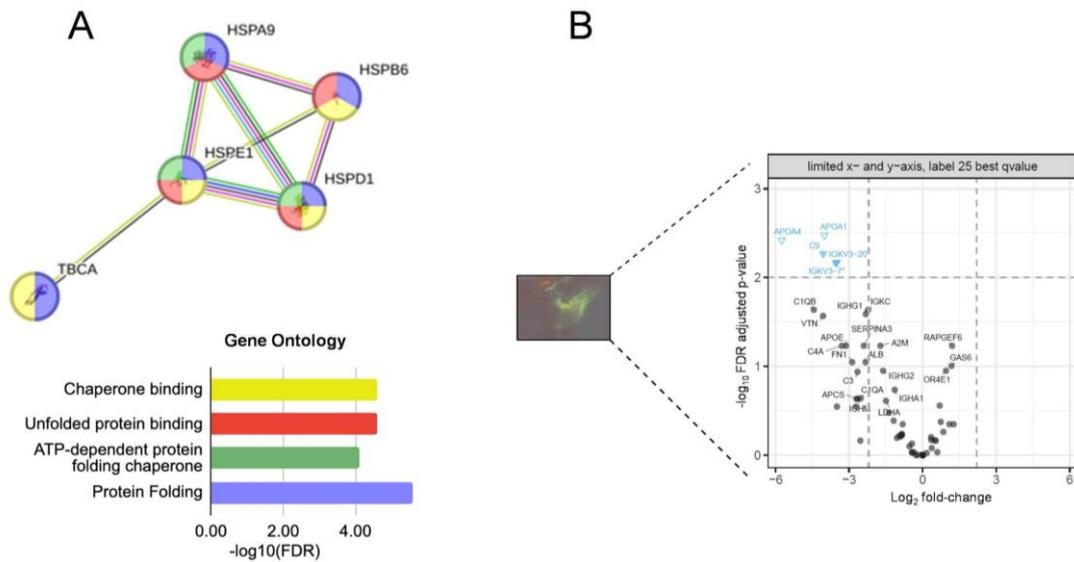
Legenda: Padrão de proteínas comuns tanto em RAOV quanto em RMV. (A) Gráfico esquemático representando o número de proteínas que diferenciam o cenário da doença tanto em MV quanto em AOV. Setenta e oito proteínas foram identificadas, das quais 74 estão sub-reguladas em ambos os cenários. Estas estão relacionadas a processos localizados em mitocôndrias e exossomos extracelulares. (B) Rede de componentes celulares mostrando proteínas relacionadas a exossomos extracelulares (vermelho) e mitocôndrias (verde). (C e D) Processos biológicos relacionados a cada localização. (C) Exossomos extracelulares: ligação de pequenas moléculas e sinalização PAR, e (D) Mitocôndrias: geração de metabólitos e energia bem como distúrbios do proteossoma.

5.2.6 Alteração da proteostase em válvulas reumáticas: estudo proteômico de depósitos fibrilares

Conforme discutido anteriormente, foi observada uma redução significativa na regulação de proteínas relacionadas ao sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) e de chaperonas importantes (HSPD1, HSPE1 e HSPA9) em válvulas reumáticas (Figura 18A). Estudos anteriores são consistentes com um padrão similar, incluindo a observação de depósitos de proteínas fibrilares em válvulas doentes, embora apenas em 6 casos, incluindo amostras de válvulas reumáticas (3 AOV reumáticas e 3 MV reumáticas)⁵⁰(Figura 19). Isso nos motivou a investigar mais a fundo a presença de proteínas mal enoveladas, incluindo proteínas fibrilares, para avaliar a possibilidade de seu envolvimento hipotético nesse contexto.

Em válvulas reumáticas com quantidades adequadas de tecido, uma coloração inicial com Vermelho do Congo foi realizada para visualizar o depósito de proteínas fibrilares (Figura 19). Para determinar um perfil dessas proteínas usando espectrometria de massa, foi empregada a microdissecção a laser para excisar os depósitos fibrilares de cada tecido valvar. Devido à disponibilidade limitada de tecido valvar microdissecado para avaliação proteômica, foi utilizada a aquisição independente de dados (DIA). A DIA supera as limitações da análise convencional baseada em aquisição dependente de dados (DDA), como a seleção estocástica de íons precursores e a baixa eficiência de amostragem, e gera um mapa abrangente de fragmentação de precursores detectáveis, permitindo quantificação precisa ao dividir os íons precursores de peptídeos em janelas consecutivas durante a fragmentação. Após a normalização dos dados, a análise estatística identificou a APOA1 como a proteína fibrilar predominante nos depósitos, com outras proteínas, como APOA4, C9 e IGKV3, também consideradas potenciais componentes, embora em um grau menos evidente (Figura 18B).

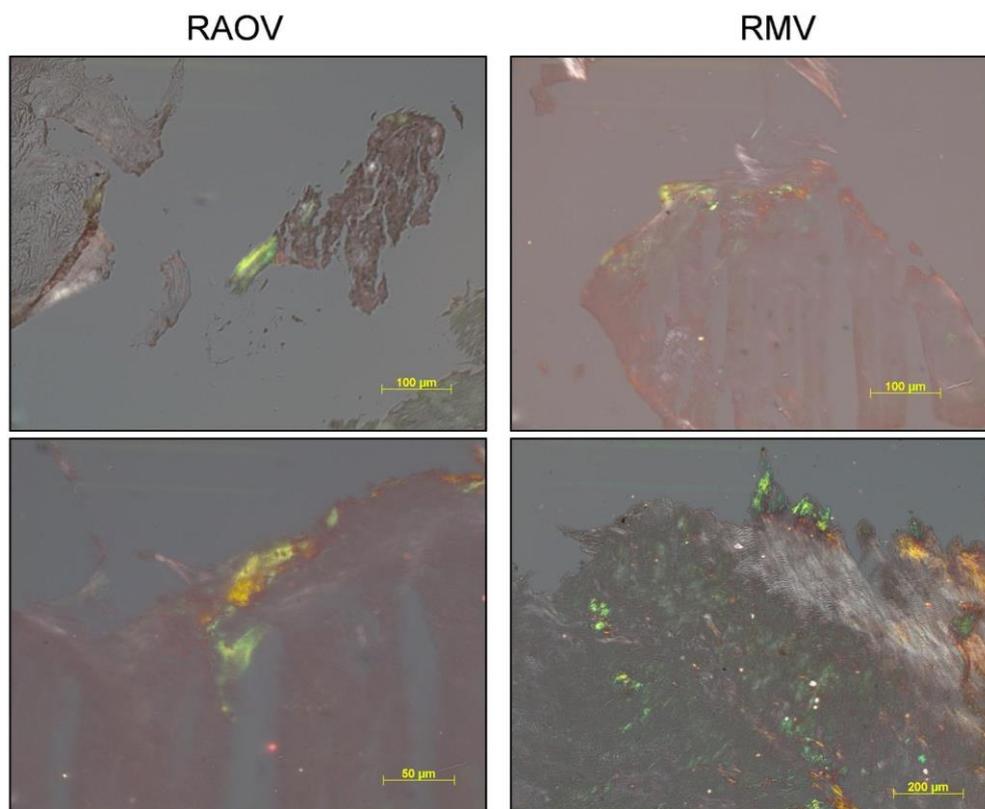
Figura 18 -Protocolo III: Distúrbio da proteostase valvar e depósito amiloide em valva reumática



Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: Estudo proteômico de depósitos amiloides fibrilares em válvulas com Doença Reumática (Protocolo III). (A) Proteínas alteradas em RAOV e RMV estão associadas a distúrbios de proteostase (banco de dados Gene Ontology). (B) Análise proteômica dos depósitos amiloides isolados por microdissecção a laser revela a apoA1 como a proteína mais importante no depósito amiloide em válvulas reumáticas.

Figura 19 - Protocolo III- depósito amiloide

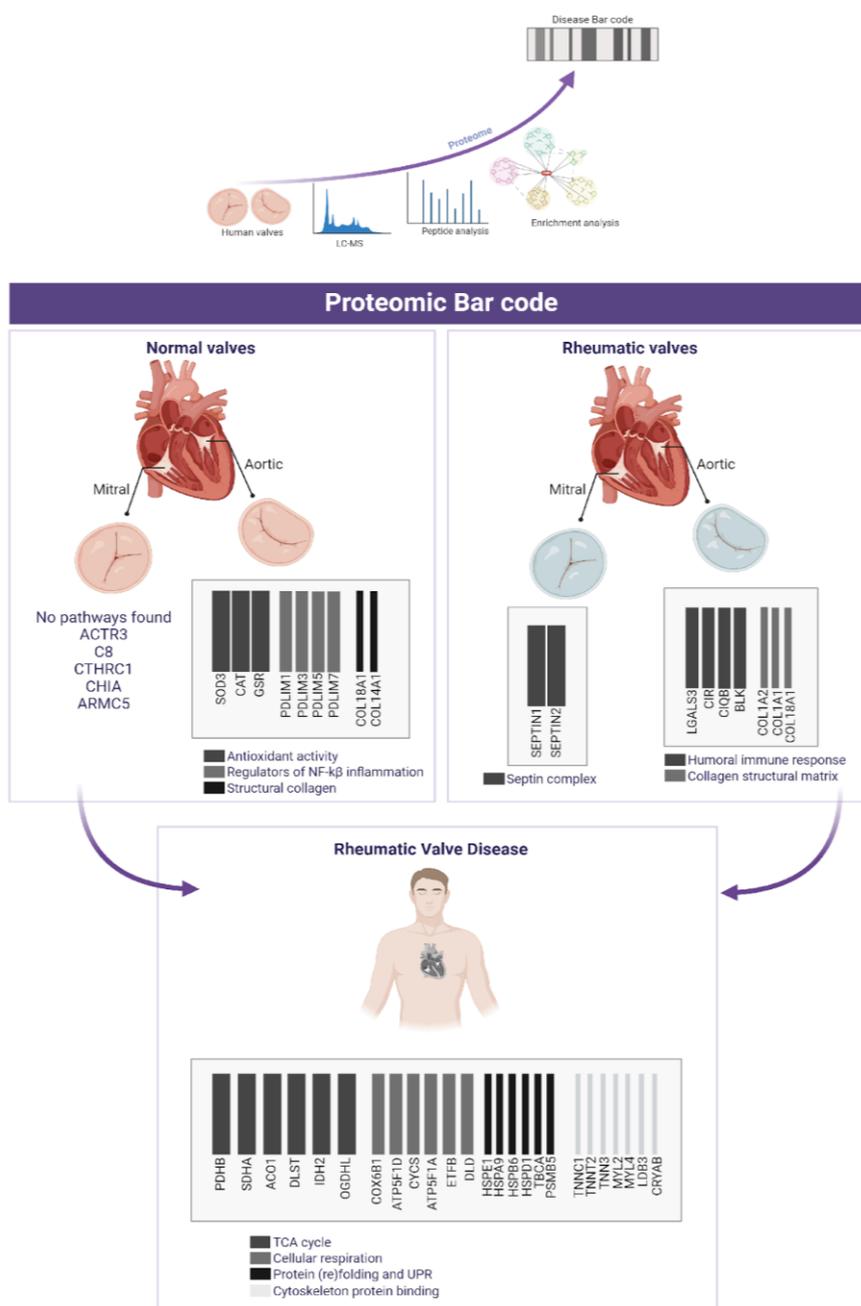


Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: A coloração com Vermelho do Congo, vista sob luz polarizada, mostra depósitos de amiloide na válvula.

Sumarizando resultados acima elucidamos algumas significativas características das válvulas cardíacas (Figura 20).

Figura 20 - Sumário de resultados



Fonte: Produção da autora (2024).

Legenda: Figura sumário de resultados evidenciando assinaturas protéicas que diferenciam e caracterizam tanto as valvas normais quando comparadas entre si quanto diferenças entre valvas reumáticas e não doentes.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A febre reumática aguda é causada por uma resposta imune anormal a infecções estreptocócicas do grupo A, geralmente ocorrendo na infância⁵¹. A doença cardíaca reumática é o resultado de lesão valvar após episódios repetidos de febre reumática⁵². Acredita-se que a base da febre reumática seja semelhança molecular (mimetismo) entre a proteína M estreptocócica e uma série de proteínas cardíacas (miosina cardíaca, tropomiosina, queratina, laminina e vimentina) devido as quais ocorrem danos imunomediados ao tecido cardíaco. A semelhança antigênica com outros tecidos, como sinóvia (articulações) e tecido neurológico, é responsável pelas manifestações não cardíacas da febre reumática. A base fisiopatológica para RHD é, portanto, a confluência de cepas reumatogênicas de *Streptococcus* do grupo A (GAS), indivíduos geneticamente suscetíveis e uma resposta imune aberrante do hospedeiro^{53,54}. Avanços em pesquisas na doença reumática cardíaca têm o potencial de alterar drasticamente a compreensão e abordagem para prevenção e gerenciamento dessa doença. Uma melhor compreensão dos determinantes imunogênicos da doença, por exemplo, pode fornecer uma rota potencial para identificar antígenos bacterianos relevantes e auxiliar novos desenvolvimentos em vacinas estreptocócicas e indivíduos vulneráveis, permitindo terapias direcionadas⁵⁴.

Esforços têm sido feitos para compreender a fisiopatologia da doença reumática cardíaca, no entanto, o conhecimento gerado ainda não permite o entendimento completo de suas patogêneses.

Nosso estudo translacional criou um mapa proteômico CRC usando válvulas mitrais (MV) e aórticas (AV) dos mesmos pacientes, comparando-as com válvulas análogas de pacientes de controle sem doença, obtidas de receptores de transplante cardíaco. Identificamos que uma parte substancial das diferenças entre as assinaturas proteômicas de MV e AV reside nas válvulas controle, e as diferenças entre MV e AV diminuem no cenário de CRC, indicando que a CRC avançada converge para vias comuns. Além disso, identificamos, pela primeira vez, que a assinatura reumática da doença avançada inclui uma importante sub-regulação de proteínas relacionadas à estrutura e função mitocondrial, bem como, a um possível comprometimento dos mecanismos de proteostase, expresso como sub-regulação do sistema UPS e aumento no depósito de proteínas amiloides fibrilares. Além disso, nossa proteômica sugere uma desregulação das vias de metabolismo lipídico. Esses mecanismos indicam que, mesmo considerando o estágio avançado de formação de cicatrizes e calcificação, as válvulas reumáticas exibem distúrbios ativos contínuos nos processos metabólicos, redox e de proteostase.

6.1 PADRÕES MOLECULARES NA DOENÇA

Análise global de expressão gênica em pacientes com indicação cirúrgica mostrou que valvas reumáticas mitrais exibiram, em comparação com valvas aórticas, maior expressão de genes ligados a processos redox, calcificação, inflamação e, em particular, resposta imune.

Estes dados sugerem que o processo patológico da doença reumática evolui de forma distinta entre as duas valvas, sendo, preferencialmente, sustentado e mais intenso na valva mitral.

A análise genômica da Valvopatia Reumática sugeriu não só a existência de padrões potencialmente identificáveis e correlacionados à doença, mas, também, padrões mais específicos com relação à valva acometida (Figura 6). Dessa forma, pretendeu-se complementar a análise gênica com outros níveis moleculares, os quais poderiam ser integrados de forma a favorecer estatisticamente a probabilidade da descoberta de assinaturas de doença e as vias pelas quais se expressam, e, portanto, foi realizado o estudo proteômico valvar.

6.2 DIFERENÇAS ENTRE PADRÕES PROTEICOS DE VALVAS AÓRTICA E MITRAL NORMAIS

Nossos resultados oferecem insights para entender a conhecida maior incidência de CRC na MV em comparação com a AOV⁵⁵. Claramente, os perfis de expressão gênica (Figura 6) e proteômica (Figura 7) diferem entre RMV e RAOV. No entanto, o grau geral de diferença se concentra na comparação entre MV e AV de controle (Figura 9), enquanto a extensão dessas diferenças se torna relativamente menor na comparação entre RMV e RAOV, à medida que as válvulas transitam para fenótipos que compreendem calcificação, inflamação e fibrose evidentes na análise patológica. A explicação mais provável para esse resultado é que o processo reumático em evolução converge para desfechos semelhantes em ambas as válvulas, dominando parcialmente o perfil proteômico e, em certa medida, suavizando as diferenças naturais entre MV e AV. Ou seja, nossos dados sugerem que a maior prevalência da doença em RMV em comparação com RAOV parece ser devido a intensidades diversas das respostas inflamatórias, metabólicas e fibróticas, em vez de tipos abertamente diferentes de vias da doença. O proteoma da AOV de controle revela um fenótipo distinto em comparação com a MV, com assinaturas aprimoradas de proteínas ligadas a processos de manutenção, como regulação da matriz extracelular e do citoesqueleto, bem como, níveis mais elevados de enzimas relacionadas ao antioxidante e à regulação de processos imunoinflamatórios (como proteínas

da família LIM)⁵⁶. Isso é consistente com um fenótipo intrinsecamente mais adaptativo da AOV em comparação com a MV. Essas características constitutivas basais divergentes, que, pelo menos, em parte, podem derivar de suas distintas origens embriológicas⁵⁷, podem influenciar o desenvolvimento da doença e contribuir para uma doença mais grave na RMV.

6.3 ASSINATURA PROTEÔMICA DA DOENÇA REUMÁTICA

Outra implicação importante de nossos resultados é a obtenção de insights relevantes sobre a assinatura da RHVD avançada. É notável que essa assinatura, identificada tanto na RMV quanto na RAOV dos mesmos pacientes, foi caracterizada pela predominância de um padrão semelhante de supressão proteica em comparação com seus respectivos controles. A via mais evidente nesse contexto foi o aparato energético mitocondrial, com supressão de várias proteínas da cadeia respiratória mitocondrial, proteínas estruturais e outras proteínas relacionadas ao metabolismo, incluindo MnSOD (localizada na matriz mitocondrial) e CuZnSOD (localizada no espaço intermembrana, embora principalmente no citosol)⁵⁸. Os mecanismos subjacentes a esses achados podem ser múltiplos. O silenciamento da cadeia respiratória mitocondrial, juntamente com a supressão observada das vias glicolíticas, é um marcador de pluripotência celular⁵⁹, indicando que o reparo ou a calcificação da válvula pode recapitular processos de desenvolvimento. Além disso, o envolvimento mitocondrial é bem conhecido por estar associado à morte celular induzida por citocinas como o TNF-alfa⁶⁰. Nesse processo, as mitocôndrias desenvolvem inchaço e inibição da cadeia respiratória mitocondrial, com consequente redução no ATP celular, juntamente com a geração de superóxido e peróxido de hidrogênio⁶⁰. A MnSOD neutraliza o superóxido mitocondrial e antagoniza a apoptose mediada pelo TNF-alfa⁶¹. Foi demonstrado que essa geração aumentada de oxidantes inibe a expressão de proteínas da cadeia respiratória mitocondrial por meio de uma via sensível a antioxidantes⁶¹. Assim, a produção contínua de citocinas na DRC em estágio terminal pode contribuir para a disfunção mitocondrial no tecido valvular. De fato, a RMV é bem caracterizada por exibir infiltrados inflamatórios compostos por células mononucleares, como linfócitos T CD4 e CD8, macrófagos e células B. A resolução da inflamação, com consequente síntese e secreção maciça de colágeno, juntamente com a calcificação, pode estar associada ao estresse do retículo endoplasmático, que agrava ainda mais a disfunção mitocondrial^{62,63}.

6.4 DISTÚRPIO DA PROTEOSTASE NA DRC E DEPÓSITO AMILOIDE

A disrupção dos mecanismos de proteostase foi outra assinatura importante da RHVD avançada. A homeostase proteica é crucial para a organização das células vivas, e muitos mecanismos, incluindo chaperonas e o sistema UPS, foram adquiridos evolutivamente para prevenir a alta toxicidade de proteínas mal enoveladas, que estão envolvidas na patogênese de várias doenças⁶⁴. Nossos achados de sub-regulação de chaperonas e proteínas do sistema UPS trazem implicações potenciais significativas em relação ao estresse celular contínuo, mesmo em válvulas calcificadas avançadas⁶⁵. O estresse do retículo endoplasmático, em conexão com distúrbios redox, está envolvido na patogênese da calcificação valvular⁶⁶, um leitmotiv da RHVD. Além disso, a disrupção da proteostase pode promover a agregação de proteínas, que pode retroalimentar a inflamação e o estresse celular.

Pesquisas anteriores identificaram depósitos de amiloide na RMV, exibindo uma relação espaço-temporal com áreas de calcificação e esclerose valvular⁵⁰. Nossos achados fornecem, pela primeira vez, evidências da formação de proteínas amiloides fibrilares tanto na RMV quanto na RAOV. Além disso, caracterizamos esses aglomerados amiloides por meio de análise proteômica específica e identificamos a APOA1, relacionada ao metabolismo lipídico, como um componente principal, embora, de forma importante, outras proteínas codepositadas não possam ser excluídas. Depósitos amiloides foram associados à doença da AOV⁶⁷ de outras etiologias, por exemplo, doença degenerativa da AOV, enquanto a presença de apolipoproteínas em aglomerados amiloides perto de regiões calcificadas de válvulas doentes e outros tecidos também foi documentada⁵⁰. Além disso, depósitos amiloides de várias apolipoproteínas também ocorrem em ateromas^{51,52}. Portanto, os depósitos amiloides na DRC poderiam servir como um modelo ou local amplificador para calcificação, inflamação sustentada e remodelamento da matriz extracelular⁵⁰. Um mecanismo relacionado pode ser a ativação do inflamassoma NLRP3^{68,69}, conhecido por reconhecer peptídeos endógenos agregados, como o beta-amiloide, desencadeando a produção de citocinas pró-inflamatórias⁷⁰.

Tanto na RMV quanto na RAOV, também observamos aumento na expressão de proteínas envolvidas na depuração de lipoproteínas plasmáticas e esterificação de colesterol, incluindo apolipoproteínas, um padrão consistente com o desequilíbrio da homeostase lipídica. Atualmente, há uma escassez de estudos abordando o mecanismo de calcificação na DRC e a possível interação com lipídios. Na calcificação degenerativa da AOV, o acúmulo de apolipoproteínas se correlaciona com a progressão da estenose e os infiltrados de células inflamatórias^{71,72}. Também é bem conhecido a partir de estudos *in vitro* que lipoproteínas

induzem a calcificação em células intersticiais humanas da AOV^{73,74}. Assim, por semelhança, os distúrbios lipídicos podem contribuir ainda mais para a calcificação também na CRC.

6.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As limitações deste estudo incluem a falta de tecido valvar disponível por se tratar de uma amostra menor, que inviabiliza a execução de múltiplos métodos investigativos. Julgamos que seria importante a avaliação adicional do perfil metabólico das valvas estudadas.

6.6 PERSPECTIVAS

Avaliação de marcadores mecanicistas por meio de testes quantitativos em um modelo *in vivo* de doença da reumática cardíaca, como ensaios randomizados de perda de função ou intervenções. O acompanhamento *in vivo* e a caracterização adicional dos marcadores da população serão realizados como parte de um estudo de sequência.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Valvas reumáticas mitrais exibiram maior expressão de genes ligados à calcificação, e imunoinflamação em relação a valvas reumáticas aórticas. Houve, também, predominância de genes relacionados a processos redox, embora com menor expressão;
2. É provável que esse perfil genético influencie no processo patológico de imunoinflamação e de reparação, determinando evoluções distintas nas lesões reumáticas mitrais e aórticas, sendo, particularmente, mais sustentado e intenso na valva mitral;
3. Estudar a MV e a AOV de controles não doentes ou pacientes reumáticos ofereceu uma oportunidade de revelar diferenças basais importantes entre a MV e a AOV, com nossos dados sugerindo que a AOV é mais bem dotada de mecanismos de proteção contra desafios oxidativos e inflamatórios. Essas diferenças ajudam a explicar a evolução acentuada da doença na RMV em comparação com a RAOV e sua maior prevalência;
4. Além disso, pela primeira vez, identificamos assinaturas proteômicas das doenças valvulares reumáticas avançadas em evolução. Essas assinaturas incluíram subregulação importante de proteínas mitocondriais e desequilíbrios relacionados à disrupção da proteostase, com a identificação de APOA1 contendo fibrilas amiloides tanto na MV quanto na AV;
5. Esses *insights* sobre as características e a fisiopatologia proposta da RHVD indicam um processo ativo de doença em evolução que pode lançar luz sobre os mecanismos de como as válvulas reumáticas fazem a transição do episódio agudo para a disfunção avançada;
6. Compreender as complexas redes regulatórias, bem como, as variações imunoinflamatórias, pode nos ajudar a combater eficientemente a doença cardíaca reumática.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Cassidy JT, Petty RE. Systemic disorders with rheumatic disease. In: Cassidy JT, Petty RE. Textbook of pediatric rheumatology. 5ª ed. Philadelphia: Elsevier, 2005; p. 614-29.
2. Oliveira SKF, Azevedo ECL. Febre reumática. In: Oliveira SKF, Azevedo ECL. Reumatologia pediátrica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2001; p. 365-400.
3. World Health Organization - WHO. Study Group on Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO expert consultation. Geneva, Switzerland & World Health Organization, 20 October - 1 November 2001. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/42898>.
4. World Health Organization - WHO. The current evidence for the burden of Group A Streptococcal diseases. 2005. World Health Organization. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/69063>.
5. Carapetis JR, McDonald M, Wilson NJ. Acute rheumatic fever. Lancet. 2005;366:155-68.
6. Carvalho MF, Bloch KV, Oliveira SK. Quality of life of children and adolescents with rheumatic fever. J Pediatr (Rio J). 2009 Sep-Oct;85(5):438-42.
7. Guilherme L, Faé KC, Higa F, Chaves L, Oshiro SE, Freschi de Barros S, Puschel C, Juliano MA, Tanaka AC, Spina G, Kalil J. Towards a vaccine against rheumatic fever. Clin Dev Immunol. 2006 Jun-Dec;13(2-4):125-32.
8. Spina GS. Doença reumática: negligenciada, mas ainda presente e mortal. Rev Med. 2008;87(2):128-41.
9. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006 Feb 24;124(4):783-801.
10. Narin N, Kütükçüler N, Ozyürek R, Bakiler AR, Parlar A, Arcasoy M. Lymphocyte subsets and plasma IL-1 alpha, IL-2, and TNF-alpha concentrations in acute rheumatic fever and chronic rheumatic heart disease. Clin Immunol Immunopathol. 1995 Nov;77(2):172-6.
12. Goldberg AC, Kalil J, Kotb M, Mehra N, SaruhanDiresKenel G, Barbalho TP, et al. HLA in medicine. In: Carron D (editor). HLA: genetic diversity of HLA functional and medical implications. Proceeding of the twelve International Histocompatibility workshop and Conference. France: EDK Medical and Scientific International Publisher; 1997. p.413-8.
13. Costa LP, Domiciano DS, Pereira RMR. Características demográficas, clínicas, laboratoriais e radiológicas da febre reumática no Brasil: revisão sistemática. Rev Bras Reumatol. 2009;49(5):606-10.

14. Marijon E, Ou P, Celermajer DS, Ferreira B, Mocumbi AO, Sidi D, Jouven X. Echocardiographic screening for rheumatic heart disease. *Bull World Health Organ.* 2008 Feb;86(2):84.
15. Patarroyo ME, Winchester RJ, Vejerano A, Gibofsky A, Chalem F, Zabriskie JB, Kunkel HG. Association of a B-cell alloantigen with susceptibility to rheumatic fever. *Nature.* 1979 Mar 8;278(5700):173-4.
16. McGarrah RW, Crown SB, Zhang GF, Shah SH, Newgard CB. Cardiovascular Metabolomics. *Circ Res.* 2018 Apr 27;122(9):1238-58.
17. Schlotter F, Halu A, Goto S, Blaser MC, Body SC, Lee LH, Higashi H, DeLaughter DM, Hutcheson JD, Vyas P, Pham T, Rogers MA, Sharma A, Seidman CE, Loscalzo J, Seidman JG, Aikawa M, Singh SA, Aikawa E. Spatiotemporal multi-omics mapping generates a molecular atlas of the aortic valve and reveals networks driving disease. *Circulation.* 2018 Jul 24;138(4):377-93.
18. Haug K, Salek RM, Conesa P, Hastings J, de Matos P, Rijnbeek M, Mahendraker T, Williams M, Neumann S, Rocca-Serra P, Maguire E, González-Beltrán A, Sansone SA, Griffin JL, Steinbeck C. MetaboLights - an open-access general-purpose repository for metabolomics studies and associated meta-data. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D781-6.
19. Martin-Rojas T, Mourino-Alvarez L, Alonso-Orgaz S, Rosello-Lleti E, Calvo E, Lopez-Almodovar LF, Rivera M, Padial LR, Lopez JA, de la Cuesta F, Barderas MG. iTRAQ proteomic analysis of extracellular matrix remodeling in aortic valve disease. *Sci Rep.* 2015 Dec 1;5:17290.
20. Gil-Dones F, Martin-Rojas T, Lopez-Almodovar LF, de la Cuesta F, Darde VM, Alvarez-Llamas G, Juarez-Tosina R, Barroso G, Vivanco F, Padial LR, Barderas MG. Valvular aortic stenosis: a proteomic insight. *Clin Med Insights Cardiol.* 2010 Feb 4;4:1-7.
21. Barabási AL, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev Genet.* 2011 Jan;12(1):56-68.
22. Pescatore LA, Bonatto D, Forti FL, Sadok A, Kovacic H, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *J Biol Chem.* 2012 Aug 24;287(35):29290-300.
23. Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes Dde C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2012 May 1;52(9):1954-69.
24. Karthikeyan G, Guilherme L. Acute rheumatic fever. *Lancet.* 2018 Jul 14;392(10142):161-74.
25. Villaseñor A, Garcia-Perez I, Garcia A, Poma JM, Fernández-López M, Nicholas AJ, Modi N, Holmes E, Barbas C. Breast milk metabolome characterization in a single-phase extraction, multiplatform analytical approach. *Anal Chem.* 2014 Aug 19;86(16):8245-52.

26. Dudzik D, Barbas-Bernardos C, García A, Barbas C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Jan 5;147:149-73.
27. Kuligowski J, Sánchez-Illana Á, Sanjuán-Herráez D, Vento M, Quintás G. Intra-batch effect correction in liquid chromatography-mass spectrometry using quality control samples and support vector regression (QC-SVRC). *Analyst.* 2015 Nov 21;140(22):7810-7.
28. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jul 2;46(W1):W486-W494.
29. Gil-de-la-Fuente A, Godzien J, Saugar S, Garcia-Carmona R, Badran H, Wishart DS, Barbas C, Otero A. CEU Mass Mediator 3.0: a metabolite annotation tool. *J Proteome Res.* 2019 Feb 1;18(2):797-802.
30. Arshid S, Tahir M, Fontes B, Montero EF, Castro MS, Sidoli S, Schwämmle V, Roepstorff P, Fontes W. Neutrophil proteomic analysis reveals the participation of antioxidant enzymes, motility and ribosomal proteins in the prevention of ischemic effects by preconditioning. *J Proteomics.* 2017 Jan 16;151:162-73.
31. Arshid S, Tahir M, Fontes B, de Souza Montero EF, Castro MS, Sidoli S, Roepstorff P, Fontes W. High performance mass spectrometry based proteomics reveals enzyme and signaling pathway regulation in neutrophils during the early stage of surgical trauma. *Proteomics Clin Appl.* 2017 Jan;11(1-2).
32. Tanca A, Palomba A, Deligios M, Cubeddu T, Fraumene C, Biossa G, Pagnozzi D, Addis MF, Uzzau S. Evaluating the impact of different sequence databases on metaproteome analysis: insights from a lab-assembled microbial mixture. *PLoS One.* 2013 Dec 9;8(12):e82981.
33. Zhang J, Xin L, Shan B, Chen W, Xie M, Yuen D, Zhang W, Zhang Z, Lajoie GA, Ma B. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Apr;11(4):M111.010587.
34. Välikangas T, Suomi T, Elo LL. A comprehensive evaluation of popular proteomics software workflows for label-free proteome quantification and imputation. *Brief Bioinform.* 2018 Nov 27;19(6):1344-55.
35. Xia J, Mandal R, Sinelnikov IV, Broadhurst D, Wishart DS. MetaboAnalyst 2.0 - a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul;40(Web Server issue):W127-33.
36. Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2009 May;1793(5):911-20.
37. Romet-Lemonne G, Jégou A. Mechanotransduction down to individual actin filaments. *Eur J Cell Biol.* 2013 Oct-Nov;92(10-11):333-8.

38. Ono R, Kaisho T, Tanaka T. PDLIM1 inhibits NF- κ B-mediated inflammatory signaling by sequestering the p65 subunit of NF- κ B in the cytoplasm. *Sci Rep.* 2016;5:18327.
39. Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, Bos EM, van Goor H, Sanjabi B, van der Harst P, Pitt B, Goldstein IJ, Koerts JA, van Veldhuisen DJ, Bank RA, van Gilst WH, Silljé HH, de Boer RA. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circ Heart Fail.* 2013 Jan;6(1):107-17.
40. Zaborska B, Sikora-Fraç M, Smarż K, Pilichowska-Paszkiel E, Budaj A, Sitkiewicz D, Sygitowicz G. The role of Galectin-3 in heart failure-the diagnostic, prognostic and therapeutic potential-where do we stand? *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 23;24(17):13111.
41. Yetkin-Arik B, Vogels IMC, Nowak-Sliwinska P, Weiss A, Houtkooper RH, Van Noorden CJF, Klaassen I, Schlingemann RO. The role of glycolysis and mitochondrial respiration in the formation and functioning of endothelial tip cells during angiogenesis. *Sci Rep.* 2019 Aug 30;9(1):12608.
42. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM, Stefani M. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature.* 2002 Apr 4;416(6880):507-11.
43. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004 Oct;84(4):1381-478.
44. Qiu M, Chen J, Li X, Zhuang J. Intersection of the Ubiquitin-Proteasome System with Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 13;23(20):12197.
45. Rouland A, Masson D, Lagrost L, Vergès B, Gautier T, Bouillet B. Role of apolipoprotein C1 in lipoprotein metabolism, atherosclerosis and diabetes: a systematic review. *Cardiovasc Diabetol.* 2022 Dec 5;21(1):272.
46. Teixeira PC, Ducret A, Ferber P, Gaertner H, Hartley O, Pagano S, Butterfield M, Langen H, Vuilleumier N, Cutler P. Definition of human apolipoprotein A-I epitopes recognized by autoantibodies present in patients with cardiovascular diseases. *J Biol Chem.* 2014 Oct 10;289(41):28249-59.
47. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, Horwood N, Nanchahal J. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest.* 2012 Aug;122(8):2711-9.
48. Averill MM, Kerkhoff C, Bornfeldt KE. S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Feb;32(2):223-9.
49. Assis RVC, Grinberg M, Lopes EA, Decourt LV, Corbett CEP, Pileggi F, Jatene ADD. Amiloidose e inflamação em válvulas mitrais calcificadas de pacientes reumáticos crônicos. *Arq Bras Cardiol.* 1988;51(6):433-6.
50. Cooper JH. Localized dystrophic amyloidosis of heart valves. *Hum Pathol.* 1983 Jul;14(7):649-53.

51. Westermark P, Mucchiano G, Marthin T, Johnson KH, Sletten K. Apolipoprotein A1-derived amyloid in human aortic atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1995 Nov;147(5):1186-92.
52. Li XA, Hatanaka K, Ishibashi-Ueda H, Yutani C, Yamamoto A. Characterization of serum amyloid P component from human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Feb;15(2):252-7.
53. Eisenberg MJ. Rheumatic heart disease in the developing world: prevalence, prevention, and control. *Eur Heart J.* 1993 Jan;14(1):122-8.
54. Parks T, Mirabel MM, Kado J, Auckland K, Nowak J, Rautanen A, Mentzer AJ, Marijon E, Jouven X, Perman ML, Cua T, Kauwe JK, Allen JB, Taylor H, Robson KJ, Deane CM, Steer AC, Hill AVS; Pacific Islands Rheumatic Heart Disease Genetics Network. Association between a common immunoglobulin heavy chain allele and rheumatic heart disease risk in Oceania. *Nat Commun.* 2017 May 11;8:14946.
55. Veasy LG, Tani LY, Daly JA, Korgenski K, Miner L, Bale J, Kaplan EL, Musser JM, Hill HR. Temporal association of the appearance of mucoid strains of *Streptococcus pyogenes* with a continuing high incidence of rheumatic fever in Utah. *Pediatrics.* 2004 Mar;113(3 Pt 1):e168-72.
56. Tanaka T, Grusby MJ, Kaisho T. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):584-91.
57. Henderson DJ, Eley L, Chaudhry B. New Concepts in the Development and Malformation of the Arterial Valves. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2020 Sep 24;7(4):38.
58. Siasos G, Tsigkou V, Kosmopoulos M, Theodosiadis D, Simantiris S, Tagkou NM, Tsimpiktsioglou A, Stampouloglou PK, Oikonomou E, Mourouzis K, Philippou A, Vavuranakis M, Stefanadis C, Tousoulis D, Papavassiliou AG. Mitochondria and cardiovascular diseases-from pathophysiology to treatment. *Ann Transl Med.* 2018 Jun;6(12):256.
59. Nguyen YT, To NB, Truong VN, Kim HY, Ediriweera MK, Lim Y, Cho SK. Impairment of Glucose Metabolism and Suppression of Stemness in MCF-7/SC Human Breast Cancer Stem Cells by Nootkatone. *Pharmaceutics.* 2022 Apr 21;14(5):906.
60. Vringer E, Tait SWG. Mitochondria and cell death-associated inflammation. *Cell Death Differ.* 2023;30:304-12.
61. Candas D, Li JJ. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Apr 1;20(10):1599-617.
62. Middleton FM, McGregor R, Webb RH, Wilson NJ, Moreland NJ. Cytokine imbalance in acute rheumatic fever and rheumatic heart disease: Mechanisms and therapeutic implications. *Autoimmun Rev.* 2022 Dec;21(12):103209.
63. Ni L, Yang L, Lin Y. Recent progress of endoplasmic reticulum stress in the mechanism of atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2024 Jul 12;11:1413441.

64. Hartl F, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475:324-32.
65. Hu C, Yang J, Qi Z, Wu H, Wang B, Zou F, Mei H, Liu J, Wang W, Liu Q. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm* (2020). 2022 Aug 2;3(3):e161.
66. Rao Z, Zheng Y, Xu L, Wang Z, Zhou Y, Chen M, Dong N, Cai Z, Li F. Endoplasmic reticulum stress and pathogenesis of vascular calcification. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Jun 16;9:918056.
67. Sud K, Narula N, Aikawa E, Arbustini E, Pibarot P, Merlini G, Rosenson RS, Seshan SV, Argulian E, Ahmadi A, Zhou F, Moreira AL, Côté N, Tsimikas S, Fuster V, Gandy S, Bonow RO, Gursky O, Narula J. The contribution of amyloid deposition in the aortic valve to calcification and aortic stenosis. *Nat Rev Cardiol*. 2023 Jun;20(6):429.
68. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis*. 2019 Feb 12;10(2):128.
69. Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG, Ting JP. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 8;104(19):8041-6.
70. Howlett GJ, Moore KJ. Untangling the role of amyloid in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:541-7.
71. O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Apr;16(4):523-32.
72. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 May;19(5):1218-22.
73. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):857-65.
74. Nsaibia MJ, Mahmut A, Boulanger MC, Arsenaault BJ, Bouchareb R, Simard S, Witztum JL, Clavel MA, Pibarot P, Bossé Y, Tsimikas S, Mathieu P. Autotaxin interacts with lipoprotein(a) and oxidized phospholipids in predicting the risk of calcific aortic valve stenosis in patients with coronary artery disease. *J Intern Med*. 2016 Nov;280(5):509-17.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS SOBRE A PESQUISA****TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

Estresse oxidativo, resposta ao estresse de retículo endoplasmático e interações imunológicas na doença valvar reumática.

PESQUISADORA RESPONSÁVEL PELO ESTUDO: Dr. Roney Orismar Sampaio

CARGO/FUNÇÃO: Médico assistente. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 71832

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração

- 1) Convite a participação, justificativa e objetivos da pesquisa:** Essas informações estão sendo fornecidas para esclarecer sobre a sua participação voluntária neste estudo. **Você está sendo convidado a participar de um protocolo de pesquisa** que visa identificar se certos mecanismos bioquímicos estão ativos ou inativos sendo portanto responsáveis pelas lesões no coração após a Febre reumática causada pelo agente responsável pela doença, chamado “estreptococo”. O estreptococo ataca principalmente a garganta, provocando infecção (dor e febre), e em alguns casos pode evoluir para formas mais graves, que causam diversas lesões no coração, conhecida como doença reumática cardíaca. Este protocolo de pesquisa tem como objetivo elucidar quais os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença no coração para que no futuro seja possível ter a cura para essa doença. Para participar deste estudo o (a) senhor (a) deve ter indicação de cirurgia de troca valvar e autorizar o acesso as válvulas cardíacas doentes que serão retiradas durante a cirurgia. **O senhor será solicitado a assinar duas vias desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes que qualquer procedimento do estudo seja feito. Uma das vias desse TCLE será entregue ao senhor** Essa pesquisa em nada vai mudar o modo como o seu caso será conduzido.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

2

2) Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros e métodos que serão empregados:

As válvulas coletadas durante a cirurgia de troca valvar vão ter o perfil de expressão (ou seja como eles se comportam) de alguns genes de interesse analisados através de técnicas modernas e serão avaliadas também quanto a fibrose e calcificação. Queremos relacionar a expressão de alguns genes com a doença em análise (por exemplo, de etiologia (ou causada por) reumática, mixomatosa (como o prolapso valvar mitral) e degenerativa, uma alteração que ocorre nas válvulas de pessoas idosas) para entender como funciona o processo que leva a disfunção dela.

3) Explicação dos possíveis desconfortos e riscos esperados: Não haverá possíveis desconfortos ou riscos adicionais causados ao senhor ou a senhora por causa do protocolo dessa pesquisa. As valvas cardíacas retiradas na cirurgia ocorrerão dentro do procedimento rotineiro ou “normal” da cirurgia cardíaca. As valvas destinadas ao projeto serão retiradas em bloco portanto dispensando análise patológica. Essas valvas cardíacas, quando não utilizadas para a pesquisa, ou para outro fim, são descartadas após um período variável. Não haverá, portanto, nenhum procedimento adicional que possa resultar em dano para o senhor ou senhora.

4) Benefícios para o participante: Não há nenhum benefício direto desta pesquisa para o senhor (a), entretanto, o conhecimento adquirido através deste estudo poderá auxiliar no desenvolvimento de novos conhecimentos sobre como ocorre a lesão da válvula cardíaca de etiologia reumática.

5) Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa: não está previsto acompanhamento ou assistência clínica do senhor ou da senhora devido a essa pesquisa. O acompanhamento e a assistência do senhor ou da senhora acontecerá normalmente, dentro da nossa instituição (Instituto do Coração), independente da sua participação nesse projeto de pesquisa.

6) Garantia de plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar o termo de consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

3

sigilo ou privacidade: Fica garantida, em qualquer etapa do estudo, a liberdade do senhor (a) em deixar de participar e de retirar o termo de consentimento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

7) Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento: o senhor (a) receberá uma via desse termo de consentimento para a sua participação nessa pesquisa.

8) Explicação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa: A resolução 466/2012 recomenda explicação da garantia de ressarcimento e como serão cobertas as despesas tidas pelos participantes da pesquisa e dela decorrentes. Reforçamos o compromisso com essa resolução. Entretanto, pelas características dessa pesquisa, não está previsto gasto com despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Se existir qualquer despesa adicional ou dano, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

9) Guarda de material biológico: o armazenamento do material biológico (pequenos “pedaços” da sua valva cardíaca retirada durante a cirurgia cardíaca) será armazenado de acordo com a resolução 441/2011. Não será solicitado patenteamento e não haverá utilização comercial do material biológico humano armazenado no biorrepositório.

10) Biorrepositório: O material coletado poderá ser armazenado pelo período de dez anos, para pesquisas futuras, mediante autorização do (a) senhor (a), conforme declarado no termo de consentimento. Fica claro que caso haja futuro uso do material dessa pesquisa (as valvas cardíacas) para nova pesquisa, será pedido novo termo de consentimento ao senhor (a) e só será realizada com a aprovação do sistema CEP-CONEP. O tempo de armazenamento das amostras será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq). O participante do estudo deverá ser informado caso ocorra perda ou destruição de suas amostras

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

4

biológicas ou ainda o encerramento do biorrepositório. No caso de utilização do biorrepositório por instituição estrangeira, o pesquisador responsável obedecerá às normas nacionais e internacionais para remessa de material biológico, em conformidade com a resolução 441 do Conselho Nacional de Saúde de 12/05/2011.

11) Confidencialidade: a garantia de sigilo dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras, será assegurada durante e depois do estudo. Toda informação obtida durante este estudo, incluindo os registros médicos, dados pessoais e da pesquisa, são confidenciais e serão usadas somente para fins desta pesquisa. Sua identidade pessoal, quer dizer, seu nome, endereço e outros dados, permanecerão sob sigilo, no centro de estudos. A forma de garantir este sigilo será identificá-lo(a) através de um número e das iniciais do seu nome. Somente a equipe do estudo será capaz de ligar o número ao seu nome completo. Apenas monitores, auditores, inspetores ou representantes das autoridades reguladoras e éticas podem acessar a documentação com identificação dos participantes. Estas informações serão arquivadas e mantidas em sigilo por 5 anos após o término do estudo.

Os resultados do estudo serão divulgados, para fins acadêmicos e científicos, sem a identificação de nenhum dado que revele a identidade dos pacientes que participaram. Caso o(a) senhor(a) seja acompanhado por um médico pessoal, e caso o(a) senhor(a) queira, o médico do estudo poderá informar este outro médico sobre sua participação no estudo.

12) Direito a informação: O (A) senhor (a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre o resultado parcial da pesquisa ou de resultados de estudos semelhantes que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Dr Roney Orismar Sampaio que pode ser encontrado no endereço Av Eneas de Carvalho Aguiar, 44, Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, andar AB, bloco 2, na Unidade Clínica de Cardiopatias Valvares. Telefone(s) 26615056 ,

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

5

e-mail: val_roney@incor.usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Estresse oxidativo, resposta ao estresse de retículo endoplasmático e interações imunológicas na doença valvar reumática”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Roney Orismar Sampaio) ou pessoa (s) por ele delegada (s) (.....) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador

Assinatura do paciente/representante legal. Data ____/____/____

Assinatura do pesquisador responsável. Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

ANEXO B – PAPER – ARTIGO SUBMETIDO

Original Manuscript

THE PROTEOMIC SIGNATURE OF ADVANCED RHEUMATIC VALVE DISEASE DEPICTS MITOCHONDRIAL AND PROTEOSTASIS Deregulation

Ana Cecília de Almeida Valadares², Aline Maria Araújo Martins³, Percillia Victoria Santos Oliveira², Valdemir Melechco Carvalho⁵, Jussara Bianchi Castelli⁵, Wagner Fontes⁴, Raphaela Meneses de Oliveira⁴, Rita de Cassia Marqueti⁹, Cesar Higa Nomura¹, Carlos Manuel de Almeida Brandao¹, Pablo Maria Alberto Pomerantzeff¹, Fábio Antonio Gaiotto¹, Vera Demarchi Aiello⁶, Luiza Guilherme Guglielmi⁷, Flávio Tarasoutchi¹, Francisco Rafael Martins Laurindo^{2*}, Roney Orismar Sampaio^{1*}.

From: ¹Instituto do Coração (Incor), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.

²Laboratório de Biologia Vascular (LVascBio), LIM64, Instituto do Coração (Incor), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.

³Department of Molecular Medicine and Neurobiology, Yates lab, The Scripps Research Institute, California, United States of America

⁴Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

⁵Grupo Fleury, Sao Paulo, Brazil

⁶Laboratory of Pathology, Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo School of Medicine, Sao Paulo, Brazil

⁷Instituto do Coração (Incor), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil; Immunology Investigation Institute, National Institute for Science and Technology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

*** Corresponding authors:****Roney Orismar Sampaio, MD, PhD**

Unidade de Cardiopatia Valvar, Instituto do Coração (InCor), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Email: roney.sampaio@hc.fm.usp.br

Francisco Rafael Martins Laurindo, MD, PhD

Laboratório de Biologia Vascular, LIM-64 (Biologia Cardiovascular Translacional), Instituto do Coração (InCor), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Email: francisco.laurindo@hc.fm.usp.br

ABSTRACT

Background: Dysfunctional immune-inflammatory events link streptococcal infection to acute rheumatic fever-related valve damage. However, processes underlying the progression to late-stage rheumatic heart valve disease (RHVD) are less understood. In addition, the preferential involvement of mitral vs. aortic valve remains unexplained. To clarify these aspects, we conducted a proteomic analysis of mitral and aortic valves of the same individuals with advanced RHVD.

Methods: From a total of 40 heart valves (HV) from 23 individuals, 26 HV were analyzed by tandem-mass untargeted proteomics. We generated proteomic maps of late-stage rheumatic mitral (RMV) and aortic valves (RAOV) extracted from the same patients at surgery and compared them to corresponding valves from control patients (MV and AOV) undergoing heart transplantation.

Results: Comparative proteomics of control MV vs. AOV depicted, among others, significant differences in stress-related proteins, indicating that the AOV is constitutively endowed with more robust protective mechanisms against redox stress and inflammation vs. the MV. In the RHVD scenario, RMV vs. RAOV differences diminish, suggesting that the evolving RHVD process converges into common disease pathways. Further comparisons between respective control vs. rheumatic valves through proteomic maps and protein-protein interaction networks indicated that both RMV and RAOV share a rheumatic signature of down-regulated mitochondrial function-related proteins, impairment of proteostatic mechanisms and altered lipid metabolism. Amyloid protein clusters were identified both in RMV and RAOV and their proteomic composition depicted APOA1 as a major component.

Conclusion: Advanced RHVD comprises an active ongoing process converging to mitochondrial down-regulation and proteostasis impairment, with prevalent amyloid clusters. The increased prevalence of mitral vs. aortic disease appears related to their basal constitutive differences and more aggressive mitral disease rather than a distinct disease process. These findings illuminate mechanistic signatures of RHVD.

INTRODUCTION

Rheumatic heart valve disease (RHVD) is the converging outcome of overt or subclinical acute rheumatic fever, triggered by an abnormal immune response to *streptococcal pharyngitis*¹. The pathophysiology of RHVD is not well understood, but it involves antigenic mimicry and an abnormal immune response, centered on a triad of rheumatogenic group A streptococcal strain, genetically susceptible host, and aberrant immune response^{1,2}.

In Brazil, 10 million cases of pharyngotonsillitis annually lead to approximately 30,000 cases of Acute Rheumatic Fever³, with 7 cases per 1,000 school children compared to 0.1-0.4 in the US⁴. About 70% of patients with acute rheumatic fever develop carditis, and a third of cardiovascular surgeries in Brazil are due to RHVD sequelae⁵.

Recurrent *Streptococcus pyogenes* infections, interplaying with recurrent episodes of rheumatic fever, can sustain prolonged immune response and inflammation. Together, these processes account for cycles of immune-inflammatory valve damage, which culminate in superimposed fibrous scar formation and calcification, further aggravating RHVD. Indeed, MV specimens from end-stage disease patients display increased thickness and rigidity due to extensive fibrosis^{6,7}. While RHVD predominantly affects the MV, the AOV is involved in about 30% of cases, resulting in aortic stenosis, regurgitation, or both⁶. A substantial number of patients present concomitant MV and AOV disease⁷ and the coexistence of both in the same patient – particularly the double stenosis / insufficiency lesion – can be taken as hard evidence of rheumatic origin except for other rare genetic causes. Understanding the pathophysiology of RHVD has remained an ongoing challenge. While many studies have focused on the sequence of immune-inflammatory events underlying the link between streptococcal infection and valve damage⁸, a less investigated but yet central remaining question is which processes account for the continued evolution of RHVD towards the persistently dysfunctional picture typical of the late-stage rheumatic disease found at the surgical scenario. In this context, rheumatic patients with indications for double MV and AOV replacement can offer a unique opportunity to address common pathophysiological conditions underlying the evolving valve disease process. The MV and AOV differ in their structure and hemodynamic burden, as well as in their embryologic origins, with the AV primarily derived from the neural crest and the MV from the endocardial cushion⁹. Despite these differences, however, the cellular immune component of ongoing RHVD is eminently local, alongside with humoral factors¹⁰. Indeed, there is currently no evidence that the presence of valve-reactive antibodies alone in the serum of RHVD patients is sufficient to

cause valve lesions¹¹. Thus, investigating molecular features of MV and AOV disease that have co-evolved in the same patient can reveal informative patterns of the immune-inflammatory process. Despite decades of research on RHVD pathogenesis, the failure of self-tolerance mechanisms in this disease and the interconnectedness of humoral and cellular inflammatory responses remain unclear. Various pathological mechanisms have been proposed for RHVD, but none adequately explains the preferential involvement of the MV². The inflammatory infiltrate observed in the rheumatic mitral valve (RMV) of end-stage disease patients primarily comprises mononuclear cells, including helper (Th)-CD4 and cytotoxic (T)-CD8 lymphocytes, macrophages, and B cells^{12, 13}. The function of these cells in RHVD pathogenesis is largely associated with their secreted cytokine profile, leading to differentiation of valve interstitial cells into activated collagen-producing myofibroblasts. Th1 cytokines, such as TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2 and IL-6 play significant roles in disease progression¹³. However, the role of cytokines and ensuing valve responses at the site of inflammation remains underexplored, as most studies have been conducted using peripheral blood, potentially underestimating processes restricted to the lesion site. Proteomics offers insights into protein identity, expression and modifications, being able to identify signatures of underlying molecular mechanisms of disease^{14, 15}. Here, to gain deeper insights into the pathophysiology of late-stage RHVD, we conducted a proteomic analysis of MV and AOV collected from normal and RHVD patients, in both cases from the same individual, aiming to detect common, as well as distinct, molecular patterns indicative of evolving disease mechanisms.

METHODS

Globally, 14 heart valves (HV) were used in a preliminary genomic micro array study (Protocol I), 26 HV in proteomics (Protocol II), of which 6 HV underwent further sectorial proteomics of microdissected amyloid deposits (Protocol III). Mitral and aortic leaflets were obtained from HV replacement surgeries for severe stenosis or multiple valvar lesion (Instituto do Coração-HC/FMUSP approved Institutional review board protocol number: 69241117.0.0000.0068). Written informed consent was provide.

The control group of Protocol I consisted of 6 valves obtained from cadavers (until 24 hours from time to death). The simultaneous expression of targeted 90 genes was evaluated using a customized RT-PCR array kit (Qiagen). A threshold for the fold change was established as ± 1.2 times (variation of +20% upregulated or -20% downregulated) in expression for each spot compared to the control group (n = 3 MV and 3 AOV).

Protocol II was carried out to evaluate untargeted proteomics. To this end, 7 MV and 7 AOV were obtained during valve replacement in the same patient (population described in suppl. table 1). The control group consisted of 6 AOV and 6 MV obtained from hearts explanted during heart transplantation due to non-valvular pathologies. Valve whole tissue label-free peptide samples were examined with the Q Exactive mass spectrometer. For proteomics, a protein was assigned to a given condition if its normalized mean AUC fold change was greater than 1.2 with respect to the other condition. For comparisons of distinct conditions within the same patient, we considered 1.1 of normalized mean AUC as relevant fold-change.

For pathway analysis, the protein sets corresponding to scenarios were tested for enrichment by a hypergeometric test and adjusted for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg method for controlling the false discovery rate (FDR). Pathway networks were constructed based on their gene overlap and using STRING software.

Protocol III was carried out at Fleury Group with the same sample as protocol II. Valves were further evaluated by histopathological analysis including Harris' hematoxylin-eosin and Congo red staining methods. Congo red-positive regions were laser microdissected and the fragments digested into tryptic peptides. Specimens were analyzed by nanochromatography coupled to tandem mass spectrometry (Thermo nano Ultimate/Exploris 240) and spectral data was analyzed against the Uniprot Swissprot Human database.

RESULTS

Targeted transcriptional signatures highlight possible valve-specific RHVD evolution

To gain insight into possible intrinsic features of advanced rheumatic disease processes, we initially conducted an exploratory targeted transcriptomic screen of MV and AOV collected from distinct patients during surgical replacement and compared them to our age-matched control samples collected at autopsy, as well as samples from patients with valve disease from other origins (see methods). The investigation comprised 84 genes selected across four biological processes that characterize valve disease in general (calcification, fibrosis, immune-inflammation and redox/ endoplasmic reticulum stress). (tables S2-5).

Although genes related to the calcification process were increased (vs. control) in both RMV and RAOV, 5 (out of 8) had greater expression in RMV vs. RAOV (Fig.2A). Accordingly, 22 (out of 27) immune-inflammatory genes exhibited greater expression in RMV vs. RAOV

(Fig.2C). Both RMV and RAOV exhibited consistent gene signatures of redox and fibrosis-related processes [vs control] (Fig.2B-D). The finding of enhanced inflammation and calcification genes in RMV vs. RAOV, including one comparative set from the same patient (Sup.Fig.1), highlight possible valve-specific factors involved in RHVD evolution. Although such an exploratory dataset presents intrinsic limitations due to sample size and arbitrary choice of genes, these results further motivated us to collect samples for proteomic analysis from patients submitted to double MV and AOV replacement, minimizing inter-individual genetic differences and disease profiles.

Global proteomic profile of MV and AOV of the same individual from normal controls and patients with RHVD.

The proteomic profile of 14 control and 14 rheumatic valves was comprehensively assessed, as described in Methods. Using the data-dependent acquisition (DDA) runs, a total of 1,202 proteins were identified and quantified from Uniprot maps. Among these, 393 proteins were consistently quantified across all samples (control and rheumatic) with FDR <0.01. All runs were performed in duplicate, with a correlation score of 0.75 between them, indicating adequate reproducibility.

Initially, multivariate analysis was conducted to identify overall proteomic patterns across the studied groups and their clustering mode. Such analysis highlighted significant differences in protein expression across groups (Fig.3A). Rheumatic valves exhibited distinct expression patterns compared to normal controls (Fig.3B), as well as differences between mitral and aortic valves (Fig.3A). Fifty proteins have been identified as the most significant for differentiating the four groups studied among rheumatic and non-diseased MV and AOV (Fig.3A). Results from such multivariate analysis showed a statistically significant segregation of protein patterns between normal and diseased valves. The related biological processes are responses to stimuli or stress (Suppl.Fig.2A). The main cellular localizations were: extracellular matrix, vesicles, and exosomes (Suppl.Fig.2B).

Thus, multivariate analysis indicates that valves can be differentiated based on their unique protein expression patterns, not only comparing healthy vs. diseased valves, but also MV vs. AOV. For didactic purposes, the subsequent results will be described first as comparisons between MV vs. AOV, either controls or rheumatic patients. Second, we will address specific differences between control and RHVD samples.

Differential protein expression pattern between control or rheumatic aortic vs. mitral valves.

Our analysis suggests specific molecular signatures between mitral vs. aortic valves, not only for rheumatic but also for control valves. Therefore, we performed an in-depth analysis of differentially expressed proteins between control MV vs. AOV from the same individual (Fig.4). Non-supervised hierarchical clustering revealed major protein clusters within the two valve types. Using enrichment analysis from STRING, we performed annotations on biological processes to provide insights on functional implications of these clusters. Comparisons between control MV vs. AOV depicted a total of 49 proteins with significant differential expression (adjusted p-value <0.05 and absolute fold-change >1.1) (Suppl.Fig.3). Among these, 8 (ARP3, CTHRC1, ITH2, IGKJ3, C8A, GPX1, ARMC5, CHIA) showed higher expression in MV and 42 in AOV (Fig.4C). In the AOV, the proteome was characterized by three major protein clusters associated with essential biological processes, namely: 1) extracellular matrix formation (SOD3, TIMP3, COL14A1, FMOD, ANG, COL18A1, THBS4, HSPG2); 2) Actin cytoskeleton organization (PDLIM1, PDLIM3, PDLIM5, PDLIM7, CSRP1, CAPZB, MYL9) and 3) extracellular exosome-related proteins (CAT, RPL23A, ACLY, GSR, FABP4, ENO2, DES). Of note, proteins from the LIM family and actin cytoskeleton-related proteins were also upregulated in control AOV (Fig.4A). The actin cytoskeleton is regarded as a key regulator of cellular responses to their mechanical environments¹⁶ and changes in stress, strain, and stiffness (mechanical properties that vary during overload). These changes all alter the actin cytoskeleton¹⁷. LIM family proteins, such as PDLIM1, are regulators of the cytoskeleton and immune inflammation. PDLIM1, specifically, negatively regulates NF- κ B signaling and its deficiency promotes increase in nuclear p65 protein levels, leading to elevated production of proinflammatory cytokines in response to innate stimuli¹⁸. Additionally, proteins with antioxidant functions (SOD3, CAT, GSR) were also over-enriched in control AOV (Fig.4B). Overall, the protein expression patterns in control MV vs. AOV suggest that the AOV is constitutively endowed with higher levels of protective resources against inflammation and redox stress.

Comparative analysis of RMV and RAOV obtained from the same patient identified 27 proteins with significant differential expression (Fig.5C). Twelve proteins were upregulated in RMV vs. RAOV, comprising F2, ACADM, EHD2, NCL, PYGB, HDGFL3, KNL1, CSRP3, DES, IGKV1, SEPTIN11, and SEPTIN2. However, functional enrichment analysis revealed no specific pathway associated with these proteins, consistent with their upregulation as isolated processes of yet undefined significance. In turn, thirteen proteins were differentially

upregulated in RAOV, associated with biological mechanisms such as humoral immune response (LGALS3, CIR, CIQB) (Fig.5B-C) and extracellular matrix structure (COL1A1, COL1A2, COL18A1, HSPG2) (Fig.5A-C). Galectins, in particular, are known to regulate inflammatory and immune responses¹⁹, exhibiting dual roles. Galectin-3 (Gal-3) exhibits protective survival effects in the heart, however its prolonged expression can lead to fibrosis and adverse tissue remodeling. Gal-3 is secreted by injured tissues and activates fibroblasts to produce extracellular matrix components, such as type-I collagen, while inhibiting matrix degradation²⁰. This suggests that in RAOV, there may be a differential component of extracellular matrix reorganization compared to RMV, potentially linked to a distinct humoral immune response.

Certain proteins exhibited significant differential expression in both scenarios: control valves (AOV vs. MV) and rheumatic AOV vs. MV. That includes DES, FAH, LYZ, COL18A1, HSPG2, and LGALS3 and were upregulated in aortic valves. These proteins might serve as inherent AOV markers, distinguishing it from MV regardless of exposure to external factors. (Suppl.Fig.6).

Proteomic signatures of advanced rheumatic valve disease.

To identify protein signatures specifically enriched in either RMV or RAOV, compared to their corresponding control valves, we conducted independent sub-analyses.

A total of 158 proteins was identified as differentially expressed between RAV and control AV (Fig.6B). Intriguingly, only 13 proteins were upregulated, while 145 were downregulated in RAOV. Moreover, these proteins predominantly segregate to mitochondria, extracellular vesicles and the actin cytoskeleton (Suppl.Fig.4B-C). In particular, substantial down-regulation of proteins mapping to mitochondrial metabolism pathways was observed in RAOV vs control AV (Fig.6B). Such pathways associate with mitochondrial protein complexes as well as metabolism, including fatty acid beta-oxidation (ACAT1, ACAA2, ACADM, DECR1, ETFB, HSD17B10), mitochondrial unfolded protein binding (CRYAB, HSPA9, ST13, HSPD1, HSPE1), oxidation of organic compounds (COX6B1, ATP5F1D, ATP5F1B, CYCS, CYC1, ETFB, DLD), and the tricarboxylic acid cycle (ATP5F1A, PDHA1, PDHB, DLST, SDHA, ACO1, FH, DH2, SUCLG2, OGDHL) (Suppl.Fig.4). Of note, we detected a downregulation of glycolytic enzyme expression and mitochondrial acetyl-Coa biosynthetic process from pyruvate (downregulation of PDHA1, PDHB, DLD) and LDHB protein²¹ (Suppl.Fig.5).

Additionally, evident down-regulated proteins in RAOV are those related to proteostasis, i.e., protein homeostasis, including signal transduction and quality control-related proteins. The latter include, in particular, proteins associated with the ubiquitin-

proteasome system (UPS) (PSMA2, PSMA3, PSMA4, PSMA7, PSMB5, PSMB9) (Suppl.Fig.4B). UPS proteins are crucial for degrading irreversibly un/misfolded proteins in the cytosol and maintaining endoplasmic reticulum homeostasis and cell survival in general ^{22,23}. In addition, the UPS participates in inflammatory processes, redox homeostasis and cell cycle control ²⁴.

Conversely, pathways related to lipid metabolism were evidently upregulated in RAOV vs. control AV (Fig.6B). APOA1 and APOC1, which correlate with support of cholesterol esterification, were specifically upregulated in RAOV (Suppl.Fig.4A). Broadly, APOC1 is involved in diverse aspects of lipoprotein and high-density lipoprotein (HDL) metabolism, but also in regulating inflammatory responses and vascular wall cell biology ²⁵. Apolipoprotein-A1 (APOA1), a crucial component of HDL particles, is associated with protection against atherosclerosis. However, in prooxidant and inflammatory perilesional environments, APOA1 and HDL can undergo post-translational modifications such as oxidation and nitration, affecting their function. Neutrophil myeloperoxidase supports this process and the ensuing pro-inflammatory reactions ²⁶.

Upregulation of extracellular vesicle-related proteins (Suppl.Fig.4B) in RAOV is interesting, since such vesicles are involved in significant exchange of metabolic precursors, nucleic acids, immune responses, inflammation and other signaling processes ¹⁴.

In the RMV, similar to the findings in RAOV, differential protein expression comprises predominant downregulation vs. control MV, with 16 upregulated proteins and 129 downregulated proteins identified (Fig.6A). Downregulated proteins were, similarly, associated with two main cellular components: mitochondrial metabolism and extracellular vesicles. RMV also exhibited significant downregulation of mitochondrial metabolism, with down-regulation of proteins associated with mitochondrial complexes and related biological processes, indicating a significant decrease in mitochondrial metabolism capacity (Suppl.Fig.7A). Together with analogous changes observed for RAOV, the number and scope of mitochondrial protein down-regulation make this a most prominent signature of rheumatic valves as compared with controls.

Notably, downregulation of proteins from the UPS system, such as PSMA4 and PSMB5 and important chaperones (HSPD1, HSPE1, HSPA9), consistently exhibited trends across the datasets (Fig.8A). Interestingly, there was one protein found to be upregulated in disease in both scenarios: Kell protein, known for its role as monospecific blood group antibodies (Fig.7A).

The suppressed proteins linked to extracellular vesicles were primarily involved in s100 protein binding and small molecule binding.

These molecules, known as alarmins or damage-associated molecular patterns (DAMPs) ²⁷, generate specific cytokine signatures in target cells, influencing the quality and intensity of subsequent inflammatory phases ²⁸. S100 proteins act as pro-inflammatory and pro-fibrotic mediators on cardiac cells through TLR4 and RAGE ²⁹.

Similarly to RAOV, there was an upregulation of pathways related to lipid metabolism in RMV. APOB, APOD, LBP, CD36, and APOC2 were upregulated in RMV vs. control MV, suggesting their involvement in plasma lipoprotein particle clearance (Suppl.Fig.7C). To understand proteins crucial for defining the general proteomic pattern of RHVD irrespective of the affected valve, we conducted a global analysis, identifying a total of 74 proteins down-regulated in RMV plus RAOV (Fig.7A) vs. controls (Fig.7B). As expected from the individual analyses, the main enriched pathways were those associated with mitochondrial function and protein folding processes (Fig.7D), with some participation of extracellular vesicle-related proteins (Fig.7C).

Proteostasis disruption in rheumatic valves: proteomic study of fibrillar deposits.

As discussed above, significant down-regulation of UPS-related proteins and important chaperones (HSPD1, HSPE1, HSPA9) was observed in rheumatic valves (Fig.8A). Previous studies are consistent with a similar pattern, including the observation of deposits of fibrillar proteins in diseased valves, although only in 6 cases including samples from rheumatic valves (3 RAV and 3 RMV) ²⁹ (Supl.Fig.8). This prompted us to further investigate the presence of unfolded proteins, including fibrillar proteins, to evaluate the possibility of their hypothetical involvement in this context.

In rheumatic valves with adequate amounts of tissue, an initial Congo red stain was performed to visualize fibrillar protein deposition (Supl.Fig.8). To determine a profile of these proteins using mass spectrometry, laser capture microdissection was employed to excise the fibrillar deposits from each valve tissue. Because of the limited availability of microdissected valve tissue for proteomic evaluation, data-independent acquisition (DIA) mode was employed. DIA overcomes limitations of conventional data-dependent acquisition (DDA)-based analysis, such as stochastic precursor ion selection and low sampling efficiency collection and generates a comprehensive fragmentation map of detectable precursors, enabling accurate quantification by dividing peptide precursor ions into consecutive windows during fragmentation. After data normalization, statistical analysis identified APOA1 as the

predominant fibrillar protein in the deposits, with other proteins like APOA4, C9, and IGKV3 also considered potential components, albeit to a less evident degree (Fig.8B).

DISCUSSION

Our translational study created a proteomic map of RHVD using MV and AV from the same patients and comparing them to analogous valves from control non-diseased patients obtained from heart transplant recipients. We identified that a substantial component of the differences between the MV and AV proteomic signatures lie at the control valves and differences between MV and AV fade in the RHVD scenario, indicating that advanced RHVD converges to common pathways. Moreover, we identified for the first time that the rheumatic signature of advanced disease includes important down-regulation of proteins related to mitochondrial structure and function, as well a suggested impairment of proteostasis mechanisms expressed as down-regulation of the UPS system and enhanced deposition of amyloid fibrillar proteins. In addition, our proteomics suggests dysregulation of lipid metabolism pathways. These mechanisms indicate that even considering the advanced stage of scar formation and calcification, rheumatic valves display ongoing active derangements of metabolic, redox and proteostasis processes.

Our results offer insights to understand the well-known larger incidence of RHVD in MV vs. AOV ⁷. Clearly, the gene expression (Fig.2) and proteomic (Fig.5) profiles differ between RMV and RAOV. However, the overall degree of difference concentrates in control MV vs. AV (Fig.4), while the extent of such differences becomes relatively smaller in RMV vs. RAOV, as valves transition to phenotypes comprising calcification, inflammation, and fibrosis evident at pathological analysis. The most likely explanation for this result is that the evolving rheumatic process converges to similar outcomes in both valves, partially dominating the proteomic profile and to some extent buffering the naturally occurring differences between MV and AV. That is, our data suggest that the increased disease prevalence in RMV vs. RAOV seems due to diverse intensities of the inflammatory, metabolic and fibrotic responses rather than overtly different types of disease pathways. The proteome of control AOV unveils a distinct phenotype vs. MV, with enhanced signatures of proteins linked to housekeeping processes such extracellular matrix and cytoskeleton regulation, as well as higher levels of antioxidant-related enzymes and regulation of immune-inflammatory processes (such as LIM family proteins) ¹⁸. This is consistent with an intrinsically more resilient AOV phenotype vs. MV. Such divergent baseline constitutive features, which at least in part may derive from their

distinct embryological origins⁹, may influence disease development and could contribute to more severe disease in RMV.

Another important implication of our results is to allow relevant insights into the signature of advanced RHVD. It is remarkable that such signature, identified in both RMV and RAOV from the same patients, was characterized by predominance of a similar pattern of protein downregulation compared to their respective controls. The most evident pathway in this context was the energetic mitochondrial apparatus, with down-regulation of several mitochondrial respiratory chain proteins, structural proteins and other metabolism-related proteins, including MnSOD (located in mitochondrial matrix) and CuZnSOD (located in intermembrane space, though mainly in cytosol)³⁰. The mechanisms underlying these findings can be multiple. Silencing of mitochondrial respiration together with the observed down-regulation of glycolytic pathways (Suppl.Fig.5), is a marker of cell stemness²¹, indicating that valve repair or calcification may recapitulate developmental processes. In addition, mitochondrial involvement is well known to be associated with cell death induced by cytokines such as TNFalpha³¹. In this process, mitochondria develop swelling and inhibition of the mitochondrial respiratory chain, with ensuing reduction in cellular ATP, together with superoxide and hydrogen peroxide generation³¹. MnSOD neutralizes mitochondrial superoxide and antagonizes TNF alpha-mediated apoptosis³². Such increased oxidant generation was shown to inhibit mitochondrial respiratory chain protein expression through an antioxidant-sensitive pathway³². Thus, ongoing cytokine production in end-stage RHVD may contribute to mitochondrial dysfunction in valve tissue. Indeed, RMV is well characterized to display inflammatory infiltrates comprising mononuclear cells like CD4 and CD8 T lymphocytes, macrophages, and B cells³³. Inflammation resolution with ensuing massive collagen synthesis and secretion, together with calcification may be associated with endoplasmic reticulum stress, which further aggravates mitochondrial dysfunction³⁴.

Disruption of proteostasis mechanisms was another important signature of advanced RHVD. Protein homeostasis is crucial to the organization of living cells and many mechanisms, including chaperones and the UPS, were evolutionarily acquired to prevent the high toxicity of un/misfolded proteins, which is involved in the pathogenesis of several diseases³⁵. Our findings of down-regulated chaperones and UPS proteins bring significant potential implications concerning ongoing cellular stress even in advanced calcified valves³⁶. Endoplasmic reticulum stress, in connection with redox derangements, is involved in the pathogenesis of valve calcification³⁷, a leitmotif of RHVD. Moreover, disrupted proteostasis may promote protein aggregation, which can retro-feed on inflammation and cell stress.

Previous research identified amyloid deposits in RMV, displaying spatiotemporal relationship with areas of valve calcification and sclerosis²⁹. Our findings provide for the first time evidence for the formation of fibrillar amyloid proteins in both RMV and RAOV. Moreover, we further characterized such amyloid clusters by specific proteomic analysis and pinpointed lipid metabolism-related APOA1 as a major component, although, importantly, other co-deposited proteins cannot be excluded. Amyloid deposits have been associated with AOV disease from other etiologies, e.g., degenerative AOV disease³⁸, while presence of apolipoproteins in amyloid clusters near calcified regions of diseased AV and other tissues has also been documented²⁹. Furthermore, amyloid deposits from several apolipoproteins also occur in atheromas³⁹⁻⁴¹. Therefore, amyloid deposits in RHVD could serve as a template or amplifying site for calcification, sustained inflammation and extracellular matrix remodeling²⁹. A related mechanism may be the activation of the NLRP3 inflammasome, known to recognize aggregated endogenous peptides such as beta-amyloid, triggering the production of pro-inflammatory cytokines⁴².

In both RMV and RAOV, we also observed increased expression of proteins involving plasma lipoprotein clearance and cholesterol esterification, including apolipoproteins, a pattern consistent with imbalance of lipid homeostasis. Currently, there is a paucity of studies addressing the mechanism of calcification in RHVD and possible interplay with lipids. In degenerative AOV calcification, apolipoprotein accumulation correlates with stenosis progression and inflammatory cell infiltrates^{43, 44}. Also, it is well known from *in vitro* studies that lipoproteins induce calcification in human AOV interstitial cells^{45, 46}. Thus, by similarity, lipid derangements may further contribute to calcification also in RHVD.

In summary, studying MV and AOV from the same non-diseased controls or rheumatic patients offered an opportunity to disclose important baseline differences between MV and AOV, with our data suggesting that AOV are more endowed with protective mechanisms against oxidative and inflammatory challenges from the outset. These differences help explain the accentuated evolution of RMV vs RAOV disease and its increased prevalence. Moreover, for the first time we identify proteomic signatures of the evolving advanced rheumatic valve diseases. These signatures included important down-regulation of mitochondrial proteins and disrupted proteostasis-related imbalances, with identification of APOA1, containing amyloid fibrils both in MV and AV. Such insights into the characteristics and proposed pathophysiology of RHVD indicate an active evolving disease process that may shed light on mechanisms of how rheumatic valves transition from the acute episode to advanced dysfunction.

REFERENCES

1. Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:191-200.
2. Guilherme L, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading to autoimmune reactivity and disease. *J Clin Immunol.* 2010;30:17-23.
3. Oliveira GMM, Brant LCC, Polanczyk CA, Malta DC, Biolo A, Nascimento BR, Souza MFM, et al. Estatística Cardiovascular – Brasil 2023. *Arq. Bras. Cardiol.* 2024;121(2):e20240079.
4. World Health Organization (WHO). Rheumatic fever and rheumatic heart disease. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2004;923:1-122.
5. Lawrence JG, Carapetis JR, Griffiths K, et al. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease: incidence and progression in the Northern Territory of Australia, 1997 to 2010. *Circulation.* 2013;128:492-501. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001477.
6. Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, Jouven X. Rheumatic heart disease. *Lancet.* 2012;379:953-64. doi:10.1016/S0140-6736(11)61171-9.
7. Veasy LG, Tani LY, Daly JA, et al. Temporal association of the appearance of mucoid strains of *Streptococcus pyogenes* with a continuing high incidence of rheumatic fever in Utah. *Pediatrics.* 2004;113(3 Pt 1).
8. Moran M, Guzman J, Abela-Oversteigen L, et al. Neglected disease research and development?: is innovation under threat?? *Policy Cures*; 2011.
9. Henderson DJ, et al. New concepts in the development and malformation of the arterial valves. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2020;7.
10. Toor D, Vohra H. Immune responsiveness during disease progression from acute rheumatic fever to chronic rheumatic heart disease. *Microb Infect.* 2012;14:1111-7. doi:10.1016/j.micinf.2012.07.003.
11. Passos L. *Front Cardiovasc Med.* 2021;7. doi:10.3389/fcvm.2020.612716.
12. Kemeny E, Grieve T, Marcus R, et al. Identification of mononuclear cells and T cell subsets in rheumatic valvulitis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989;52:225-37. doi:10.1016/0090-1229(89)90174-8.
13. Guilherme L, Cury P, Demarchi LM, et al. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *Am J Pathol.* 2004.
14. Blaser MC, Buffolo F, Halu A, et al. Multiomics of tissue extracellular vesicles identifies unique modulators of atherosclerosis and calcific aortic valve stenosis. *Circulation.* 2022;148(8). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.122.063402.
15. Shelbaya K, et al. Large-scale proteomics identifies novel biomarkers and circulating risk factors for aortic stenosis. 2024. doi:10.1002/mco2.161.
16. Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:911-20. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.01.012.

17. Romet-Lemonne G, Jégou A. Mechanotransduction down to individual actin filaments. *Eur J Cell Biol.* 2013;92:333-8. doi:10.1016/j.ejcb.2013.10.011.
18. Ono R, Kaisho T, Tanaka T. PDLIM1 inhibits NF- κ B-mediated inflammatory signaling by sequestering the p65 subunit of NF- κ B in the cytoplasm. *Sci Rep.* 2016;5:18327. doi:10.1038/srep18327.
19. Suthahar N, Meijers WC, Silljé HHW, et al. Galectin-3 activation and inhibition in heart failure and cardiovascular disease: an update. *Theranostics.* 2018;8:593-609.
20. Zaborska B, Sikora-Fraç M, Smarż K, et al. The role of galectin-3 in heart failure—the diagnostic, prognostic and therapeutic potential—where do we stand? *Int J Mol Sci.* 2023;24:13111. doi:10.3390/ijms241713111.
21. Yetkin-Arik B, Vogels IMC, Nowak-Sliwinska P, et al. The role of glycolysis and mitochondrial respiration in the formation and functioning of endothelial tip cells during angiogenesis. *Sci Rep.* 2019;9:12608. doi:10.1038/s41598-019-48676-2.
22. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature.* 2002;416:507-11.
23. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381-478.
24. Qiu M, Chen J, Li X, Zhuang J. Intersection of the ubiquitin–proteasome system with oxidative stress in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23:12197. doi:10.3390/ijms232012197.
25. Rouland A, Masson D, Lagrost L, et al. Role of apolipoprotein C1 in lipoprotein metabolism, atherosclerosis and diabetes: a systematic review. *Cardiovasc Diabetol.* 2022;21:272. doi:10.1186/s12933-022-01703-5.
26. Teixeira PC, Ducret A, Ferber P, et al. Definition of human apolipoprotein A-I epitopes recognized by autoantibodies present in patients with cardiovascular diseases. *J Biol Chem.* 2014;289:28249-59.
27. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Investig.* 2012;122:2711-9.
28. Averill MM, Kerkhoff C, Bornfeldt KE. S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:223-9.
29. Assis RVC, et al. Amiloidose e inflamação em válvulas mitrais calcificadas de pacientes reumáticos crônicos. *Arq Bras Cardiol.* 1988;51(6):433-6.
30. Siasos G, et al. Mitochondria and cardiovascular diseases—from pathophysiology to treatment. *Ann Transl Med.* 2018;6:256.
31. Vringer E, Tait SWG. Mitochondria and cell death-associated inflammation. *Cell Death Differ.* 2023;30:304-312. doi:10.1038/s41418-022-01094-w.
32. Candas D, Li J. MnSOD in oxidative stress response: potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid Redox Signal.* 2013;20:10.1089/ars.2013.5305.
33. Middleton FM, McGregor R, Webb RH, Wilson NJ, Moreland NJ. Cytokine imbalance in acute rheumatic fever and rheumatic heart disease: mechanisms and therapeutic implications. *Autoimmun Rev.* 2022;21(12).

34. Ni L, Yang L, Lin Y. Recent progress of endoplasmic reticulum stress in the mechanism of atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2024;11:1413441. doi:10.3389/fcvm.2024.1413441.
35. Hartl F, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475:324-32. doi:10.1038/nature10317.
36. Hu C, Yang J, Qi Z, et al. Heat shock proteins: biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm (2020)*. 2022;3(3). doi:10.1002/mco2.161.
37. Rao Z, Zheng Y, Xu L, et al. Endoplasmic reticulum stress and pathogenesis of vascular calcification. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:918056. doi:10.3389/fcvm.2022.918056.
38. Sud K, Narula N, Aikawa E, et al. The contribution of amyloid deposition in the aortic valve to calcification and aortic stenosis. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(6):429.
39. Westermark P, Mucchiano G, Marthin T, et al. Apolipoprotein A1-derived amyloid in human aortic atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*. 1995;147:1186-92.
40. Li XA, Hatanaka K, Ishibashi-Ueda H, et al. Characterization of serum amyloid P component from human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:252-7.
41. Howlett GJ, Moore KJ. Untangling the role of amyloid in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:541-7.
42. O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, et al. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:523-32. doi:10.1161/01.ATV.16.4.523.
43. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of oxidized low-density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1218-22. doi:10.1161/01.ATV.19.5.1218.
44. Halle A, Hornung V, Petzold GC, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. 2008;9:857-65.
45. Nsaibia MJ, Mahmut A, Boulanger MC, et al. Autotaxin interacts with lipoprotein(a) and oxidized phospholipids in predicting the risk of calcific aortic valve stenosis in patients with coronary artery disease. *J Intern Med*. 2016;280:509-17. doi:10.1111/joim.12519.
46. Yu B, Khan K, Hamid Q, et al. Pathological significance of lipoprotein(a) in aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*. 2018;272:168-74. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.03.025.

MAIN FIGURES AND FIGURE LEGENDS

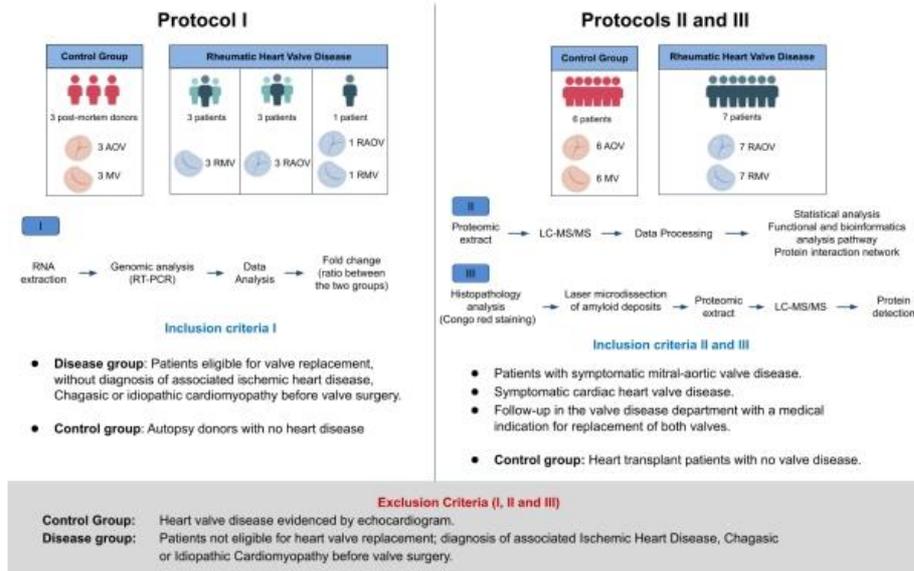


Figure 1. Graphic summary of the employed protocols. Protocol I (genomic analysis), protocol II (proteomic analysis) protocol III (proteomic analysis of amyloid deposit) and inclusion/exclusion criteria.

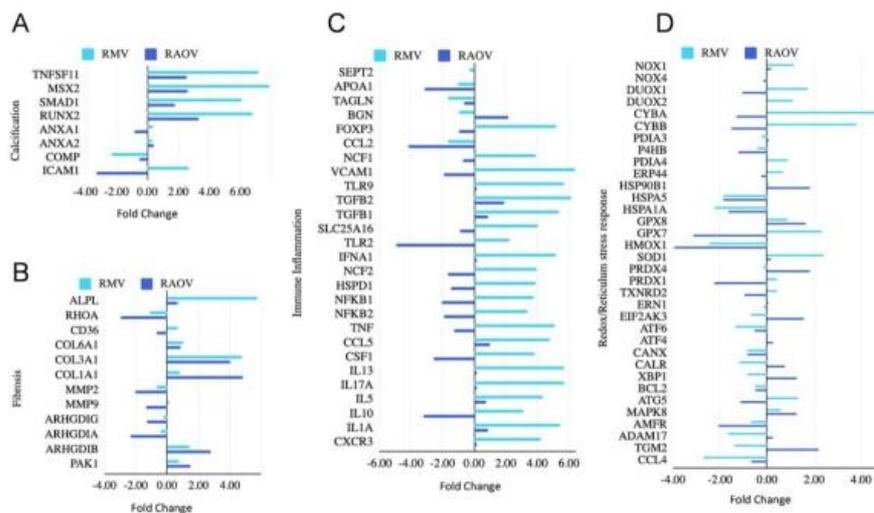


Figure 2. Valve genomic analysis from Protocol I comparing Rheumatic Heart Valves vs controls. Graphic representation of gene fold changes in RAOV vs AOV and RMV vs MV. (A) Calcification (A), (B) Fibrosis (C) Immuno-inflammation and (D) Redox processes (D). N=8.

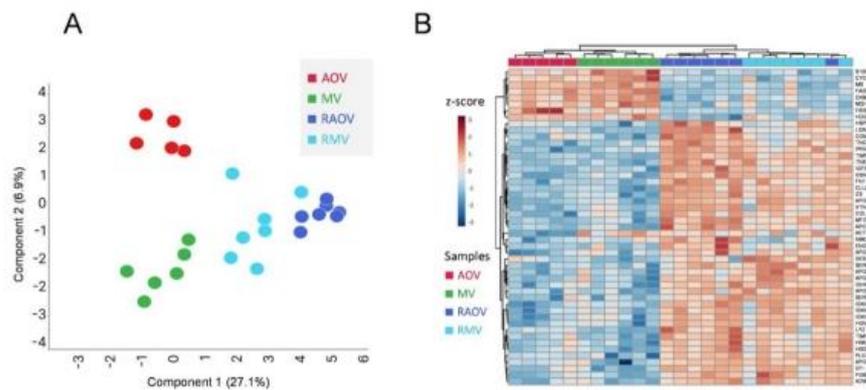


Figure 3. DDA-MS multivariate analysis of valves from all groups. (A) Principal Component Analysis of all patients with Rheumatic Valve Disease and controls. There are differences in proteomic patterns both in relation to the affected valve and the disease process. (B) Non-supervised hierarchical clustering of top 50 most variant proteins. Colored heat map shows samples by color: RMV (blue), AoV (red), MV (green), RAOV (dark blue) and RMV (light blue). There is a proteomic pattern that characterizes Rheumatic valve disease, even in its chronic stage.

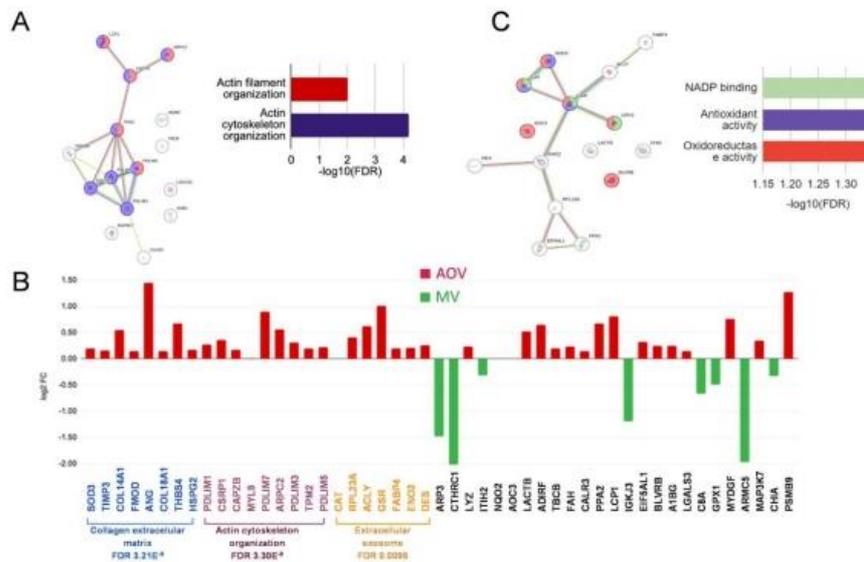


Figure 4. Main constitutional differences between non-diseased mitral and aortic valves (Protocol II), both valves were obtained from the same individual. Protein set enrichment analysis of differentially expressed proteins based on biological/molecular process and terms in the gene ontology database accessed via STRING. Cluster of proteins upregulated in AOV:

(A) related to Lim family proteins pathways and actin cytoskeleton: (C) antioxidant activity pathways. (B) Overall profile of proteins differentially expressed in AOV vs. MV highlighting the main constitutional differences between them.

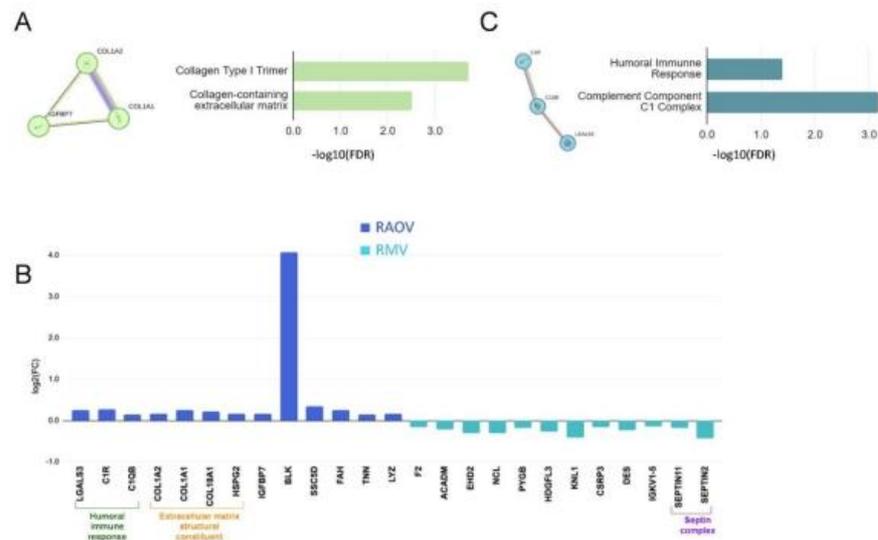


Figure 5. Main proteins differentially expressed between RMV vs RAOV. Both valves were obtained from the same individual (Protocol II). Protein set enrichment analysis of differentially expressed proteins based on biological process terms in the gene ontology database accessed via STRING. Identified proteins were related to: (A) Collagen and Extracellular Matrix and (C) Immune Responses. (B) Overall profile of proteins differentially expressed in RAOV vs RMV highlighting the main constitutional differences between them.

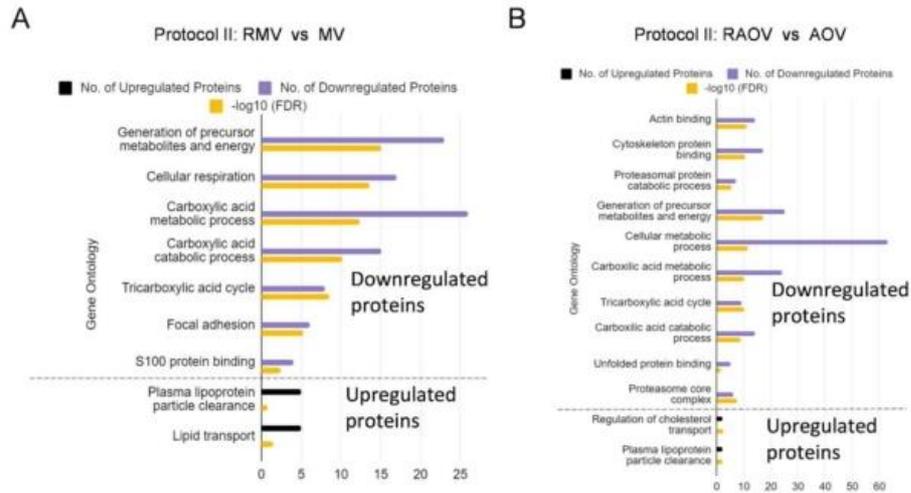


Figure 6. Important pathways (and numbers of correspondent proteins) to differentiate diseased vs non-diseased valves in each scenario. (A) Valves from Protocol II comparing RMV vs MV. (B) Valves from Protocol II comparing RAOV vs AOV.

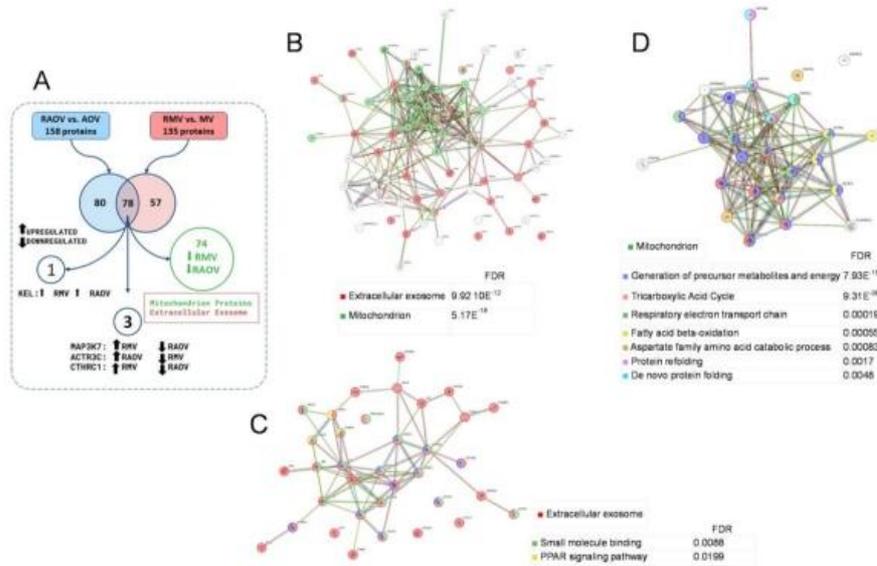


Figure 7. Pattern of common proteins in both RAOV and RMV. (A) Schematic graph representing the number of proteins that differentiate the disease scenario in both MV and AOV. 78 proteins were identified, of which 74 are downregulated in both scenarios. These ones are related to processes localized in mitochondria and extracellular exosomes. (B) Cellular component network depicting proteins related to extracellular exosomes (red) and

mitochondria (green). (C and D) Biological processes related to each localization. (C) Extracellular exosomes: small molecule binding and PAR signaling and (D) Mitochondria: generation of metabolites and energy as well as proteasome disorders.

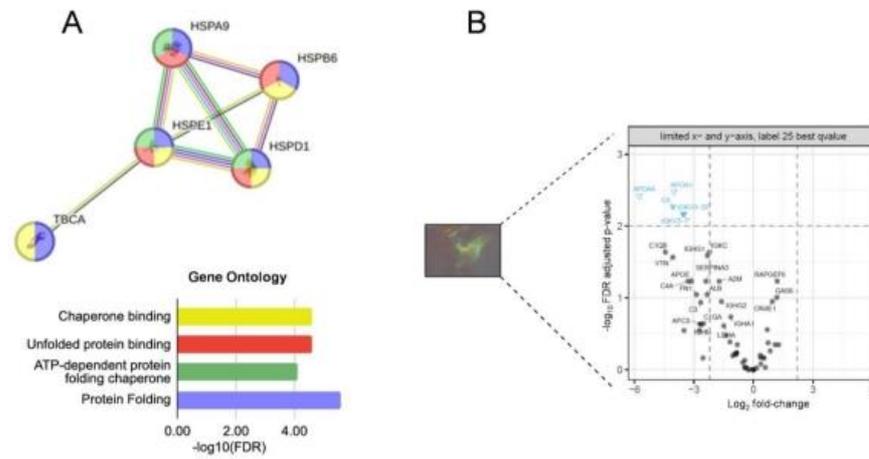


Figure 8. Proteomic study of fibrillar amyloid deposits in Rheumatic Disease valves (Protocol III). (A) Proteins altered in RAOV and RMV are associated with proteostasis disturbances (Gene Ontology database). (B) Proteomic analysis of amyloid deposits isolated through laser microdissection results in APOA1 as the most important protein of amyloid deposit in rheumatic valves.