

SECRETARIA MUNICIPAL DA SAÚDE
SECRETARIA-EXECUTIVA DE GESTÃO ADMINISTRATIVA
COORDENADORIA DE GESTÃO DE PESSOAS
ESCOLA MUNICIPAL DE SAÚDE
8ª COREME

ANA CECÍLIA DE ALMEIDA VALADARES

ANÁLISE GENOMICA EM VALVAS REUMÁTICAS

São Paulo

2023

ANA CECÍLIA DE ALMEIDA VALADARES

ANÁLISE GENOMICA EM VALVAS REUMÁTICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Comissão de Residência Médica da Escola
Municipal de Saúde, como requisito para obtenção
do título de Especialista – Modalidade Residência
Médica.

Área: Clínica Médica

Orientador(a): Eleni Canabrava Galanos

São Paulo

2023

Resumo

A doença reumática (DR) resulta de uma resposta autoimune à infecção estreptocócica, embora sua patogênese não seja totalmente compreendida. Alguns genes associados à DR têm sido descritos, muitos associados à resposta imune. Sabe-se, também, que respostas a diversos tipos de estresse, incluindo reações de oxido-redução e distúrbios da proteostase desempenham papel importante na patogênese de doenças cardiovasculares. Destacam-se processos inflamatórios, fibrose e calcificação vascular, contribuindo para doenças como a aterosclerose e valvar. Nossa hipótese é que a patogênese da doença valvar reumática depende não somente de imunorregulação como de genes inflamatórios associados a reação redox e que a doença tenha particularidades a depender da valva acometida. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é identificar uma assinatura de expressão gênica, proteômica e de pequenos metabólitos relacionada a processos redox, estresse do retículo endoplasmático (RE), imuno-inflamação, calcificação e fibrose em doença valvar reumática assim como estudar possíveis particularidades da doença nas valvas mitral e aórtica.

Método: No primeiro experimento, para avaliação do perfil genético, **histopatologia e calcificação na doença reumática valvar sintomática**, foram coletadas 4 valvas mitrais e 4 aórticas reumáticas obtidas durante troca valvar no Instituto do Coração-HC-FMUSP. O grupo controle constituiu-se de 4 valvas obtidas de cadáver. A expressão simultânea de 90 genes foi avaliada por kit customizado de RT-PCR array. Foram selecionados os genes que codificam proteínas associadas a vias ligadas a sinalização redox, homeostase do RE, imuno-inflamação, calcificação tecidual e matriz extracelular.

Resultados: Experimento 1

A média etária dos participantes foi **de 39±10 anos no grupo de estudo aórtico e 59±10 anos** no grupo reumático mitral. 2 do sexo masculino, com características ecocardiográficas uniformes entre o grupo de estudo. Foram encontrados padrões de genes mais expressos relacionados à imune inflamação e calcificação na doença reumática em relação ao controle. Na doença valvar mitral estavam mais expressos genes relacionados ao processo de calcificação e inflamação quando comparados ao grupo aórtico. A histopatologia confirmou mais lesões/inflamação na doença valvar mitral que na aórtica assim como a calcificação foi mais intensa na valva mitral quando comparado a aórtica Conclusão: 1) A doença cardiopatia reumática valvar exibe padrões genéticos peculiares, com predominância de proteínas relacionadas às vias de metabolismo lipídico, ativação de vias da coagulação 2) A inflamação e a calcificação são maiores na doença reumática mitral do que na aórtica. 3) Os padrões de proteômica também se diferem observando-se diferenças de expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e degeneração da matriz extracelular. Estas assinaturas genéticas e moleculares provavelmente influenciam no processo patológico de imuno-inflamação e reparação valvar determinando evoluções distintas nas lesões valvares reumáticas mitrais e aórticas.

Palavras-chave:

Doença reumática, patogênese, genômica

INTRODUÇÃO

A febre reumática (FR) resulta de uma resposta auto-imune à infecção pelo estreptococo b-hemolítico do grupo A (EBHGA) de Lancefield. Caracteriza-se por uma complicação tardia, não-suprativa, de uma infecção estreptocócica não tratada, que ocorre em pessoas geneticamente predispostas¹⁻³.

A FR e sua seqüela crônica, a cardiopatia reumática (CR), são responsáveis por importante morbi-mortalidade em crianças e adultos jovens, e alto impacto socio-econômico. A incidência de Febre reumática aguda em alguns países em desenvolvimento é superior a 50 por 100.000 crianças . A prevalência mundial de CR é de pelo menos 15,6 milhões de casos, e esta doença é responsável por cerca de 233.000 mortes / ano ⁴. Apesar da redução do número de casos em países desenvolvidos, continua sendo de alta prevalência em países em desenvolvimento¹⁻⁵, sendo a doença reumatológica mais comum em crianças no Brasil, 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, sendo responsável por 40% das cirurgias cardíacas no país ⁶.

A patogênese da doença reumática (DR) ainda permanece não totalmente compreendida . Vários genes associados com DR têm sido descritos ; A maioria destes estão envolvidos com respostas imunitárias .

A existência de processo auto-imune 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, porém passam a reconhecer também as células do hospedeiro, que se tornam alvos dos anticorpos produzidos contra o antígeno infeccioso, processo chamado mimetização molecular ^{7,8}. Sabe-se que ambas as respostas imunes mediadas por linfócitos B e T estão envolvidas 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 crônica ⁹.

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 FR¹⁰. 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 das 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 reumática. No início ocorrem lesões como a fragmentação das fibras colágenas, edema da substância intercelular, infiltração celular e degeneração fibrinoide. 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 valvas. A valva mitral é mais frequentemente envolvida, vindo a seguir a aórtica, a tricúspide, e, raramente a pulmonar ¹³.

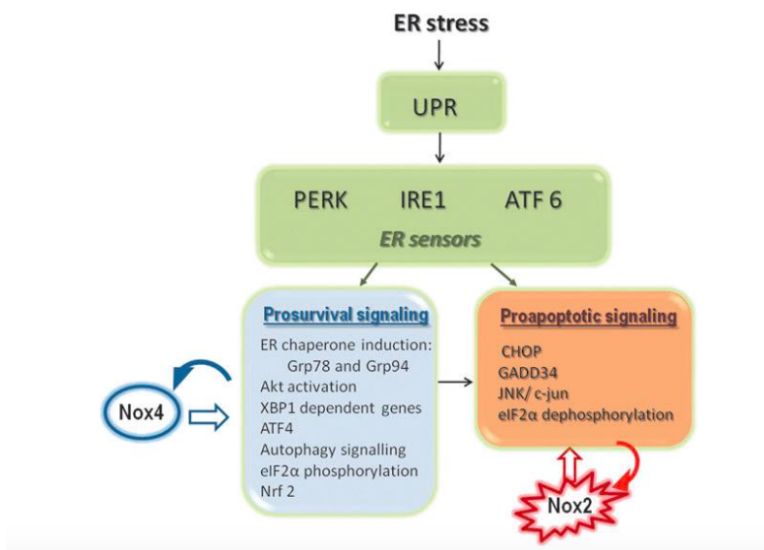
Pode ocorrer degeneração difusa e até necrose das células musculares cardíacas, com lesões inflamatórias perivascularres, formando os nódulos de Aschoff, que são formados por área central fibrinoide circundada por linfócitos, plasmócitos e grandes células basofílicas ¹⁴.

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 alfa e IFN γ (padrão Th1) ¹⁵.

Embora a pesquisa clínica e bacteriológica tenha evoluído significativamente, na área da biologia molecular, muitas dúvidas ainda carecem de explicação principalmente quanto as bases fundamentais do mecanismo imunológico na patogênese da FR, processo esse que até o momento não foi completamente elucidado.

Estresse oxidativo e resposta ao estresse e calcificação, fibrose e imunoinflamação

A fim de manter a defesa contra as espécies de oxigênio destrutivas, um equilíbrio adequado de processos enzimáticos e não enzimáticos de defesas antioxidante é necessário. O dano oxidativo pode desempenhar um papel importante na causa de uma série de doenças humanas. Dados emergentes mostram que as interações redox aberrantes com proteínas-chave nas doenças neurodegenerativas (como esclerose múltipla, Parkinson e Alzheimer) e a posterior indução do estresse oxidativo levam a neurodegeneração. Entretanto, longe de se limitar apenas a perturbações neurodegenerativas, estresse oxidativo manifesta seus efeitos tóxicos por meio de uma variedade de vias diferentes e também em outras patologias bastante diversas. O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem os danos por elas causados. Perturbações neste equilíbrio redox podem provocar a produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA. Resposta a proteínas desdobradas (UPR) por sua vez é um mecanismo que inicialmente visa restaurar a homeostasia celular, mas que, se continuamente ativado, pode desencadear apoptose.



Organização da sinalização a resposta a proteína mal-enovelada (UPR) e o envolvimento de Nox NADPH oxidase. (modificado de Laurindo et al, *ARS*, 2014). As principais proteínas da membrana do RE envolvidas na indução da UPR são Ire1 (Inositol- requiring enzyme 1), PERK (RNA-actived protein Kinase (PKR)-like ER kinase) e ATF6 (Activating Transcription Factor 6) (SHEN et al., 2004). No estado basal, estas três proteínas são inibidas pela ligação da chaperona BiP (Binding Protein). (BERTOLOTTI et al., 2000).

Várias evidências demonstram que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese e no desenvolvimento de doenças cardiovasculares(DCV) ligadas a processos inflamatórios associados também a fibrose e calcificação vascular, como na aterosclerose, hipertensão, dislipidemia, aterosclerose, angina pectoris e insuficiência cardíaca¹⁶⁻¹⁹.

Atualmente tem sido proposto que os processos oxidativos mediados por radicais livre e seus produtos específicos desempenham um papel-chave na aterogênese²⁰.

A favor da teoria oxidativa na aterosclerose tem a presença de oxLDL dentro das placas ateroscleróticas rotas e a correlação entre a sensibilidade de LDL à oxidação e o risco de DCV²¹. Muito além do processo de calcificação vascular relacionado ao processo aterosclerótico, os processos relacionados ao estresse reticular e dano oxidativo estão ligados ao desenvolvimento de calcificação vascular em outras patologias.

Assim o processo de calcificação vascular não é mais considerado um processo passivo secundário ao processo de envelhecimento, mas sim um fenômeno ativo de biomineralização do tecido não esquelético, relacionado a processos tróficos e inflamatórios específicos²². A calcificação cardiovascular também pode incidir em valvas cardíacas, como a valva aórtica, implicando na estenose valvar aórtica degenerativa. A presença de mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio, estresse do retículo endoplasmático, LDL oxidado, fósforo, vitamina-D3 e diminuição da fetuína A (um inibidor de calcificação vascular), podem contribuir para a calcificação vascular por aumentar a expressão de Runx2 e desencadear desdiferenciação de células musculares lisas (VSMC) assumindo fenótipo osteocondrogênico^{23,24}.

Estresse oxidativo excessivo tem também uma participação importante na patogênese de doenças auto-imunes, aumentando a inflamação e modificando o mecanismo de tolerância imunológica através de modificações estruturais de proteínas que induzem o

aparecimento de neo epítomos(determinantes antigénicos)^{25,26}.Existe uma relação recíproca complexa entre estresse oxidativo e ambos apoptose e autofagia, essencial para determinar o destino da célula²⁷. Isto é especialmente relevante no contexto de distúrbios auto-ímmunes em que a apoptose e autofagia desempenham um papel patogénico importante.²⁸

As lesões de febre reumática e da cardiopatia reumática resultam de uma rede complexa de vários genes que controlam respostas imune tanto inatas quanto respostas imunes adaptativas após uma infecção da faringe por *S. pyogenes* . O processo inflamatório permeia o desenvolvimento de lesões cardíacas com elevada produção de citocinas inflamatórias levando a calcificação e fibrose valvar. As vias celulares através das quais esses fenómenos imunorregulados ocorrem não foram até o momento totalmente esclarecidos. A participação dos processos redox e de estresse de retículo endoplasmático ainda é desconhecida apesar de bem estabelecidos os links entre os processos de oxirredução e resposta ao estresse e várias doenças imunoinflamatórias e cardiovasculares.

Assim sendo, com a finalidade de compreender mais completamente as vias patogénicas da doença reumática cardíaca e portanto identificar outros possíveis alvos terapêuticos, nossa proposta é investigar qual a participação das vias de oxirredução no processo de desequilíbrio das respostas imunes e degenerativas valvar.

Justificativa, hipótese, relevância

O processo redox desempenha função fundamental nas doenças cardiovasculares coronarianas e ateroscleróticas, participando do processo inflamatório. Atualmente, tem-se relatado a grande importância das vias redox principalmente aquelas relacionadas ao estresse de retículo e resposta ao estresse na calcificação valvar e em outras patologias com grande presença de fibrose dos tecidos. É possível que tais processos e vias de sinalização sejam agentes protagonistas também nas doenças valvares, principalmente, na doença reumática (doença essa caracterizada por um processo de imunoinflamação), atuando os ROS tanto como fatores de risco como aceleradores do processo imune.

Objetivo geral

Analisar a potencial participação das vias de sinalização de oxirredução e estresse do retículo endoplasmático na fisiopatologia de valvopatias mitrales de etiologia reumática, degenerativa e mixomatosa.

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 etiologia da doença mitral (reumática vs degeneração).

Abordagem experimental

Objetivo 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

Nesta etapa o mRNA será extraído a partir das válvulas mitrales patológicas obtidas durante procedimento cirúrgico de troca valvar realizados no Instituto do Coração - HC/FMUSP e devidamente preparadas segundo protocolo para extração de RNA conforme previamente padronizado (ref). Após a extração do RNA total segue-se a síntese de DNA via transcrição reversa que produz um DNA complementar (cDNA). Este cDNA então obtido será utilizado com o objetivo de analisar a expressão de genes indicadores das vias ligadas à:

- 1) sinalização redox;
- 2) homeostase do RE;
- 3) imunoinflamação;
- 4) calcificação tecidual e matriz extracelular;
- 5) proteínas previamente detectadas como preferencialmente expressas em valvas reumáticas.

Estas proteínas serão organizadas em um kit comercial customizado de PCR-array e a análise quantitativa realizada por RT-PCR.
VIDE TABELA DE GENES

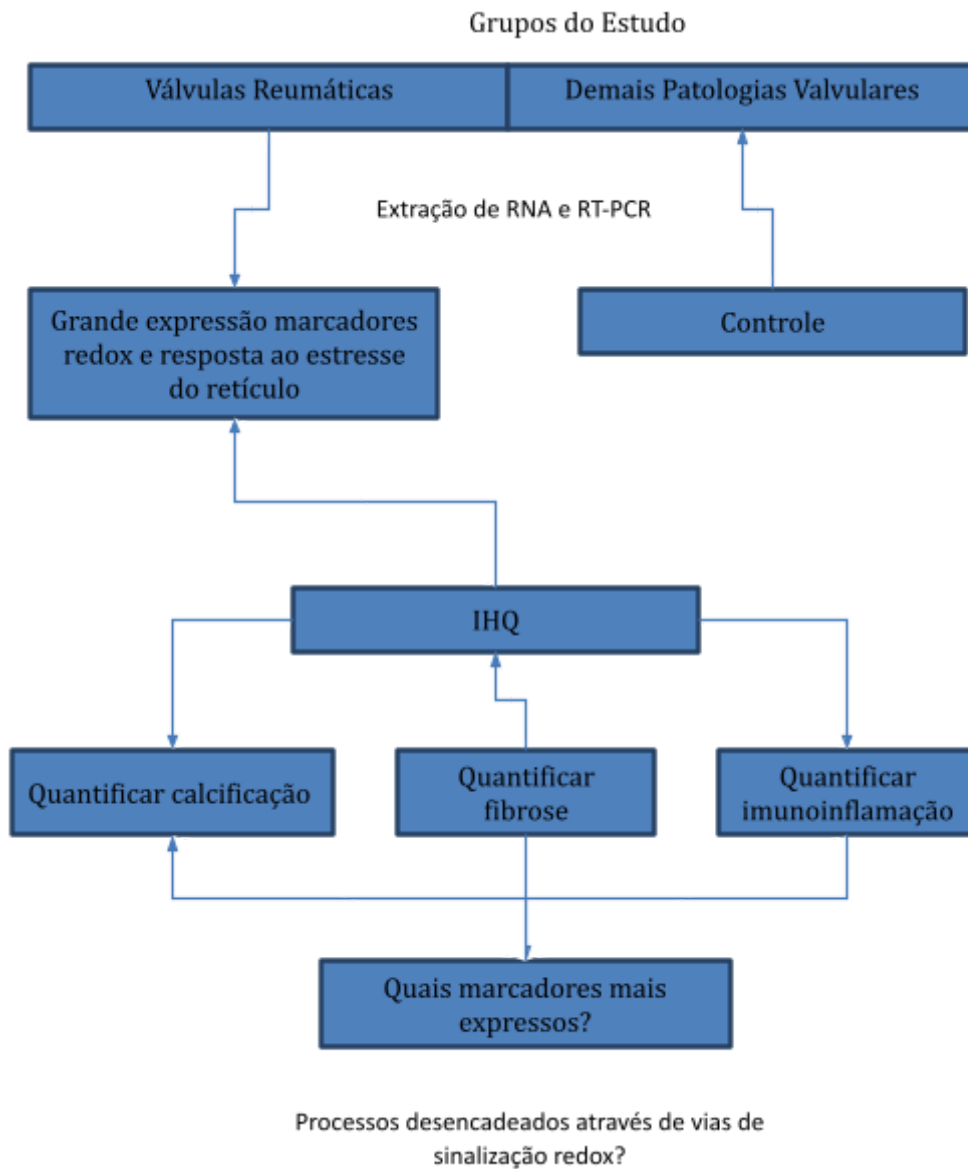
Objetivo 2- Correlacionar a expressão gênica de proteínas selecionadas e sua expressão tecidual à intensidade de calcificação, fibrose e inflamação.

Após a obtenção dos dados sobre a expressão dos genes supracitados no objetivo 1, pretende-se correlacionar a expressão gênica de proteínas selecionadas à intensidade da calcificação, fibrose e inflamação presentes na valva mitral estudada. Estas variáveis serão analisadas por meio de escores histológicos (descritos em Métodos) mediante colorações específicas: Alizarin Red (calcificação), Picrossirius (colágeno) e imunomarcagem para CD-68.

Objetivo 3- Analisar as variáveis obtidas nos objetivos (1) e (2) com relação à etiologia da doença mitral (reumática vs degeneração).

Características clínicas do paciente serão avaliadas e os dados pertinentes correlacionados com as variáveis obtidas nos objetivos 1 e 2. As variáveis serão coletadas a partir dos prontuários dos pacientes e ou avaliação clínico pré-operatória:

- Idade
- Gênero
- Valvopatia de base
- Etiologia da doença valvar (baseada em história clínica, exame físico e ecocardiograma)
- Comorbidades: hipertensão arterial, diabetes mellitus, coronariopatia, arteriopatia periférica, outras doenças de natureza inflamatória ou auto-imune.
- Cirurgia cardíaca prévia
- Medicamentos em uso pelo paciente.
- Período do primeiro surto de Febre reumática



Material e método

Extração de RNA de válvulas cardíacas

Para verificar a taxa da expressão gênica de proteínas específicas relacionadas a processo de fibrose e calcificação, processos imunoinflamatórios e ligados as vias redox e de resposta ao estresse reticular nas válvulas cardíacas. Para tanto faremos mini arrays de RT-PCR. A extração de RNA será 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 abaixo). O RNA será quantificado e o cDNA transcrito através do Kit High Capacity (Life Technologies). Aproximadamente 50ng de cDNA será colocado em microtubos juntamente com Taqman (Applied Biosystems) e primers específicos. O resultado será 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 (Pescatore et al, 2012).

Quantificação da calcificação por histoquímica com Alizarin Red S.

Nesta técnica, o cálcio liga-se ao corante, formando o complexo Cálcio-Alizarin Red S, através do processo de quelação. As amostras do tecido são inicialmente fixados em formalina e em seguida desidratados e embebidos em parafina. Após este procedimento é realizado o corte histológico do bloco de parafina e então cortada em micrótomo cortado em panorama coronal mediano e colocada em lamina histológica silanizada. O material será então desparafinizado e as lâminas imersas em 100% de xilol durante 3 minutos, logo depois em 100% de etanol durante 3 minutos sendo sequencialmente as lâminas imersas em 95%, 85% e 70% de etanol sempre durante 3 minutos. As lâminas serão hidratadas em álcool a 70% e lavadas rapidamente em água destilada, em seguida, serão imersas no corante Alizarin Red S por 10 minutos, serão aplicadas 20 gotas de acetona, e novamente lavadas com xilol. Será analisado o percentual da calcificação em relação a área da válvula avaliada após observação do material em microscópio.

Quantificação da fibrose por histoquímica com Picrosirius

Em torno de 25 a 70 mg do material será fixado com formol a 10% por 24 horas e em seguida, esse material embebido em parafina, para avaliação por microscopia eletrônica. Feito 1 corte histológico de 5µ de espessura o passo seguinte é corar com corante Picrosirius a 0,2%, dissolvido em solução aquosa de ácido pícrico saturado que determina a matriz de colágeno em vermelho rutilante, destacando do tecido cardíaco valvar e obtendo da lamina, analisada por meio de um filtro polarizador acoplado ao microscópio de luz, percentual médio de fibrose expressa em percentagem da área ocupada.

Análise do grau de inflamação das válvulas cardíacas

A amostra da válvula mitral selecionada é inicialmente processada de forma semelhante ao processo descrito para identificação do grau de calcificação valvar.

Com a finalidade de analisar o grau de inflamação das válvulas mitraes selecionadas serão realizadas técnicas de imunohistoquímica, utilizados marcadores de células inflamatórias como macrófagos (CD68) e todos os cortes analisados sob luz polarizada.

Processo de extração de material genético segundo patente de numero BR 102016011463-2:

PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO EM VÁLVULAS CALCIFICADAS.

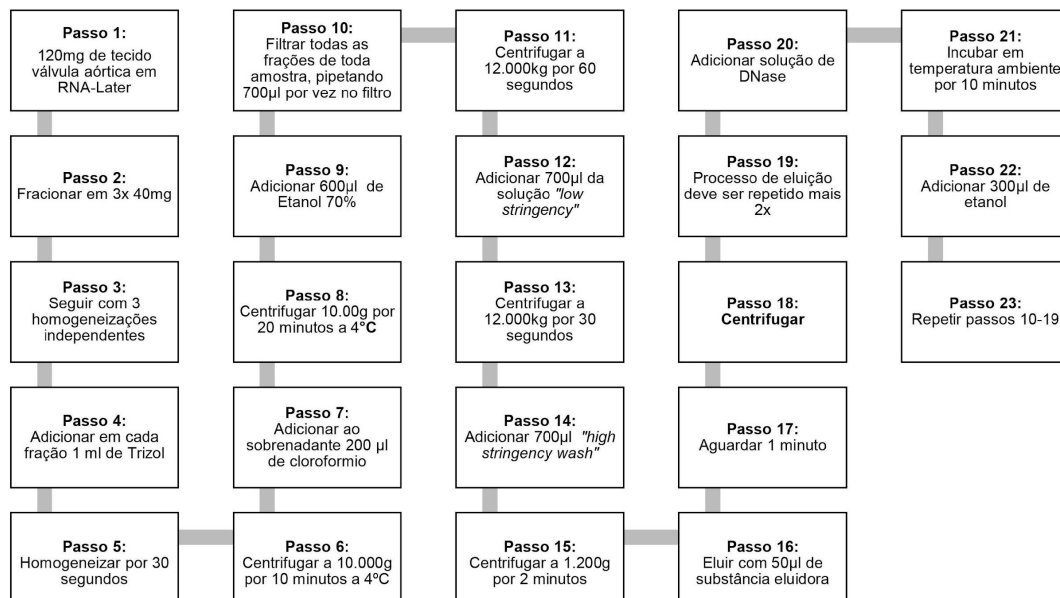


TABELA DE GENES:

GENES RELACIONADOS AO PROCESSO DE FIBROSE

PAK1	Este membro da família das proteínas PAK regula a motilidade e morfologia celular. Estas proteínas são efetores intermediários fazendo o link entre as RhoGTPases 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 promove a reorganização do citoesqueleto de actina e regula a forma da célula , anexos e motilidade	Rho(ras homolog family member A)
ARHGDIA	Este gene codifica uma proteína que desempenha um papel chave na regulação da sinalização através de GTPases Rho .	Rho GDI 1(Rho GDP dissociation inhibitor alpha)
ARHGDIE	A proteína codificada por este gene esta envolvida em diversos acontecimentos celulares, incluindo a sinalização celular , proliferação , organização do citoesqueleto e secreção .	Rho GDI 2 (Rho GDP dissociation inhibitor beta)
ARHGDIG	A Proteína desempenha um papel central na modulação da ativação de GTPases inibindo a troca de GDP por GTP .	Rho GDI G(Rho GDP dissociation inhibitor gamma)
COL1A1	Este gene codifica as cadeias pró- alfa1 de colágeno tipo I , cuja hélice tripla compreende duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2 .	collagen type I alpha 1
COL3A1	Este gene codifica para as cadeias alfa 1 do pro- 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 colagénio do tipo I .	collagen type III alpha 1 chain
COL6A1	Os colagenos são uma super família de proteínas que desempenham um papel na manutenção da integridade dos vários tecidos . Colagenos são proteínas da matriz extracelular e possuem um domínio de hélice tripla como elemento estrutural comum . Colageno VI é um dos componentes estruturais principais das microfibrilas .	collagen type VI alpha 1 chain
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 metallopeptidase 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 metallopeptidase 9

CD36	Esta proteína corresponde a um receptor das trombospondinas. As trombospondinas estão amplamente distribuídos e esta proteína pode ter funções importante como uma molécula de adesão celular . Ela se liga ao colágeno, trombospondina , fosfolípídeos aniônicos e LDL oxidado.	CD36 molecule
------	--	---------------

GENES ENVOLVIDOS NAS DOENÇAS VALVARES

COMP	Gene expressa proteína conectora de colágeno e fibronectina. reduced expression. In RHD	COMP
ANXA1	Codifica proteína quelante do cálcio. reduced expression MXD	anexina-A1
ANXA2	Codifica proteína relacionada a angiogenese e fusão de proteínas. reduced expression in MXD	anexina-A2
SEPT2	A proteína septina-2 possui atividade GTPase além de ser uma constituinte do citoesqueleto. reduced expression. In MXD	septina-2
TAGLN	reduced expression. In MXD	Transgelin
LUM	Lumican regula a organização do colágeno e crescimento de fibrilas circunferencial , a transparência da córnea, e migração de células epiteliais e reparação de tecidos . Esta proteína se apresentou superexpressa em válvulas de pacientes reumáticos quando comparado a outras patologias mitrales.	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 superexpressa em válvulas de pacientes reumáticos.	Apolipoproteína A
BGN	A proteína codificada apresenta atividade celular de receptor. Reduced expression in mxd and rhd.	Biglican

GENES ASSOCIADOS AO PROCESSO DE CALCIFICAÇÃO

SMAD1	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 actividades biológicas, incluindo o crescimento celular , a apoptose , a morfogénese , e o desenvolvimento de respostas imunitárias	SMAD family member 1
SMAD3	Vide SMAD 1	SMAD family member 3
TNFSF11	Este gene codifica um membro da família de citocinas do factor de necrose tumoral (TNF) , que é um ligando para osteoprotegerina e funciona como um factor chave para a diferenciação e activação de osteoclastos . Esta proteína mostrou ser um factor de sobrevivência de células dendrítica e está envolvido na regulação da resposta imunitária dependente da célula T	tumor necrosis factor superfamily member 11 (RANK L)
RUNX2	Este gene é um membro da família de factores 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 morfogénese óssea e actua como um andaime para ácidos nucleicos e factores reguladores envolvidos na expressão do gene do esqueleto.	runt related transcription factor 2
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 necessário para adequada morfogénese craniofacial.	msh homeobox 2
ALPL	Este gene codifica um membro da família de proteínas fosfatase alcalina . Há pelo menos quatro fosfatase alcalina distintas, porém relacionadas : intestinal, placentária , placentário -like, e fígado / osso / rim (tecido não-específica	alkaline phosphatase

GENES RELACIONADOS AOS PROCESSOS IMUNOINFLAMATÓRIOS

CYBA	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 ativado para produzir o ânion superóxido .	Fator 1 citosolico de neutrófilo (NCF1)

NCF2	Este gene codifica o fator 2 citosólico de neutrófilos (subunidade citosólica do complexo de multi –proteínas 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 factor 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 a inflamação , a imunidade , diferenciação , de células crescimento , tumorigénese 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 envolvidos em várias respostas imunitárias , processos inflamatórios , e hematopoiese	IL1 a (Interleucina 1 alfa)
IL6	Este gene codifica uma citocina que funciona na inflamação e a maturação de células B . Além disso , a proteína codificada foi mostrada para ser um pirogénio endógeno capaz de induzir febre em pessoas com doenças auto-imunes ou infecções .	IL6 (Interleucina 6)
IL17A	A proteína codificada por este gene é uma citocina pró-inflamatória produzido por células T activadas . Esta citocina regula as atividades de proteínas quinases ativadas por mitógenos NF-kappaB	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-células endoteliais e a transdução de sinal , e pode desempenhar um papel no desenvolvimento da aterosclerose e artrite reumatóide	VCAM
	Xx	Selectina (p)
TNFA	Este gene codifica uma citocina pró-inflamatória multifuncional que pertence à superfamília do factor de necrose tumoral (TNF) . Esta citocina é secretada principalmente por macrófagos .	TNF alfa
CCl5	As quimioquinas formam uma super família de proteínas envolvidas em processos inflamatórios e com função imunorreguladora .	CCl5 (C-C motif chemokine ligand 5)
IL17 A	Interleucina 17A (IL17A) é uma citocina pró-inflamatória segregado por linfócitos T activados .	interleukin 17 receptor A

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	toll like receptor 4
TLR9	Estudos indicam que este receptor medeia a resposta celular a dinucleótidos CpG não metilados em DNA bacteriano para montar uma resposta imune inata .	toll like receptor 9
CXCR3	A ligação de quimiocinas a proteína codificada por este gene induz respostas celulares que estão envolvidas no tráfego de leucócitos , ativação de integrina, alterações do citoesqueleto e migração quimiotática.	C-X-C motif chemokine receptor 3
IL10	A proteína codificada por este gene é uma citocina produzida principalmente por monocitos 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 péptidos multifuncionais que regulam a proliferação , diferenciação , adesão, migração , e outras funções em muitos tipos de células .	transforming growth factor beta 1
TGFB2	A proteína codificada é segregada e tem efeitos supressores de crescimento de células T dependente de interleucina - 2 .	transforming growth factor beta 2
CSF1	A proteína codificada por este gene é uma citocina que controla a produção , a diferenciação e a função dos macrófagos	colony stimulating factor 1
NFKB	O NFKB é um regulador de transcrição que é ativado por vários estímulos intra e extra celulares, tais como as citocinas , os radicais livres -oxidantes , irradiação ultravioleta , e produtos bacterianos ou virais	nuclear factor kappa B subunit 1
FOXP3	A proteína codificada por este gene é um membro da família forkhead de reguladores transcricionais .	forkhead box P3
GATA-3	é um importante regulador do desenvolvimento de células T e desempenha um papel importante na biologia das células endoteliais .	GATA binding protein 3
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 .	toll like receptor 2
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 ativação da imunidade inata .	heat shock protein family D (Hsp60) member 1

IL-13	Este gene codifica uma citocina produzida principalmente por imunorreguladora células Th2 ativadas	interleukin 13
IL-5	Este gene codifica uma citocina que atua como um fator de diferenciação e crescimento das células B e eosinófilos . A citocina codificado desempenha um papel importante na regulação da formação de eosinófilos , maturação , sobrevivência e recrutamento . O aumento da produção de citocina esta pode ser relacionada com a patogénese de doenças inflamatórias dependentes de eosinófilos	interleukin 5
RORγt		
CCL2;MCP-1	As quimiocinas são uma super família de proteínas envolvidas em processos inflamatórios e imunorreguladora .	C-C motif chemokine ligand 2
IL-12	A proteína codificada por esse gene é necessária a indução independente do IFN gama sendo importante para a diferenciação da resposta th1 e th2	interleukin 12A
IFN γ		
IL-1B	Esta citocina é um importante mediador da resposta inflamatória , e está envolvida numa variedade de actividades celulares , incluindo a proliferação celular , a diferenciação e a apoptose .	interleukin 1 beta
MIP-1B; CCL4	A proteína codificada é segregada e tem funções inflamatórias e quimiocinéticas	C-C motif chemokine ligand 4

GENES RELACIONADOS AO PROCESSOS REDOX E ESTRESSE DO RETICULO

GENE	FUNÇÃO	PROTEINA
EIF2AK3	Tipo de proteína de membrana localizada no reticulo endoplasmático(RE) na 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 reticulo 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 reticulo endoplasmático.	GP78
HSP90B1	Este gene codifica um membro de uma família de trifosfato de adenosina (ATP) - chaperonas	GRP94

	moleculares com papéis na estabilização e dobramento de outras proteínas	
XBP1	Verificou-se que após a acumulação de proteínas desdobradas no retículo endoplasmático (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 (splicing) 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 tiorredoxina 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 stress de retículo endoplasmático , e promove a apoptose	DDIT3
TXNRD1	Este gene codifica um membro da família das piridinas nucleotídeos oxidoredutases . Esta proteína reduz tiorredoxinas assim como outros substratos , e desempenha um papel no metabolismo de selênio e a protecção contra o stress oxidativo .	TRX1
SOD1	A proteína codificada por este gene se liga a íons de cobre e de zinco e é uma das duas isozimas 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 membro 4 da família das dissulfeto isomerases	ERP72
PRDX4	A proteína codificada por este gene é uma enzima antioxidante localizada no citoplasma e pertence à família peroxiredoxina . O status reduzido dessa proteína é um índice do 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 um importante armazenadora de Ca^{2+} no lúmen do retículo endoplasmático	Calreticulina
MAPK8	A proteína codificada por este gene é um membro da família MAP quinase . MAP quinases actuar 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 esta 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 onde atua como um sensor de oxigênio e cataliza a redução de oxigênio molecular para várias espécies de oxigênio reactivas (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 através da retenção para posterior degradação dentro do ER de subunidades de proteínas incorretamente dobradas.	Calnexina
ERP44	A proteína codificada regula ativamente o transporte de ions de cálcio	PDI10
ATG5	A proteína codificada está envolvido 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 desintegrina e metaloprotease de domínio) da família. Os membros desta família são proteínas ancoradas à membrana estruturalmente relacionados com desintegrinas de veneno de cobra , e têm sido implicadas numa variedade de processos biológicos envolvem interações célula-célula e célula-matriz	ADAM metallopeptidase domain 1

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 retículo endoplasmático (ER) , e está envolvido na dobragem e montagem de proteínas no ER.	Grp78 ou heat shock protein family A (Hsp70) member 5
TGM2	As transglutaminases são enzimas que catalisam a reticulação de proteínas através de ligações glutamyl - lisina isopeptídicas epsilon gama.Embora a estrutura primária de transglutaminases não é 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 retinóico , e parece estar envolvido em apoptose .	Transglutaminase 2
HSPA5	A proteína codificada por este gene é um membro da família de proteínas de choque térmico (HSP70) . Ele está localizado no lúmen do retículo endoplasmático (RE) , e está envolvido no dobramento e montagem de proteínas no RE . Uma vez que esta proteína interage com muitas proteínas de RE , pode desempenhar um papel chave no transporte de proteína de monitorização através da célula.	HSPA5
NOX3	Estas enzimas têm a capacidade de geração de superóxido e outras espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de transporte de electrões através da membrana plasmática .	NADPH oxidase 3
NOX1	Este gene codifica um membro da família de NADPH -oxidase de enzimas responsáveis pela transferência catalítica de um eletrão de oxigénio para gerar superóxido ou peróxido de hidrogénio .	NADPH oxidase 1
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 eletrão de quinonas que resulta na produção de espécies radicais .	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
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.	thioredoxin reductase 2
TXNRD1	Este gene codifica um membro da família de oxidoredutases piridina nucleótidos . Esta proteína reduz tiorredoxinas assim como outros substratos , e desempenha	thioredoxin reductase 1

	um papel no metabolismo de selênio e a proteção contra o stress oxidativo .	
HSPA1A	Este gene codifica uma proteína de choque térmico de 70kDa. 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 .	heat shock protein family A (Hsp70) member 1A
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	heat shock protein 90 ou GRP94

Resultados e discussão

Avaliação clínica e ecocardiográfica.

Nas Tabela 8 e Tabela 9 as características clínicas e ecocardiográficas do DCR-Exp1 e GC-Exp1.

Tabela 8– Doença Cardíaca Reumática				
	Controle Aórtico/Mitral	Aórtico	Mitral	<i>p-value</i> **
Total (n)	3	4	4	
Sexo masculino	2	2	1	
Idade (anos)	35 ± 5	39 ± 10	59 ± 3	0,0009
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; Classificação New York Heart Association; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; ** teste t de Student

Tabela 8: 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.

Análise de calcificação através de angiotomografia computadorizada valvar.

Tabela 9 – Angiotomografia Pré Operatória

Grupos	Cálcio mitral	Cálcio aórtico	Cálcio coronariano
Mitral Reumático	8	3	3
Aórtico Reumático	3	6	6

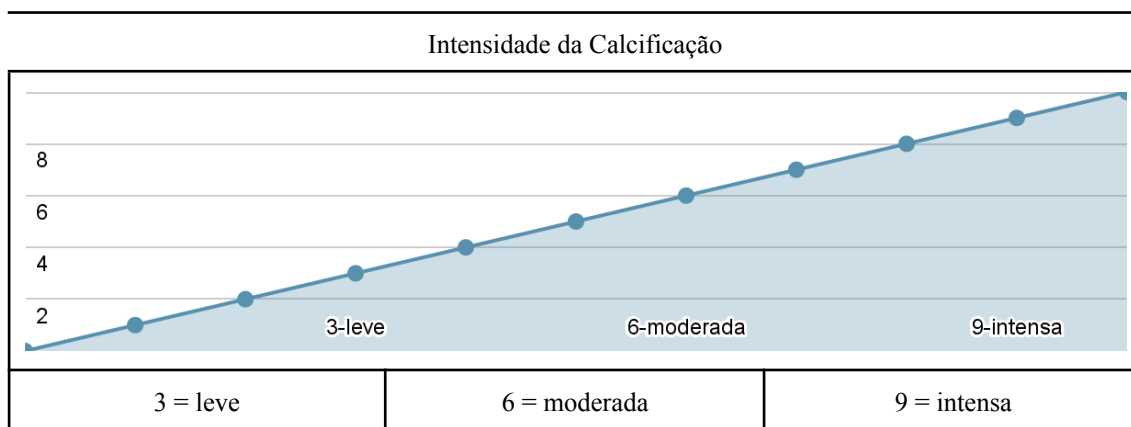


Tabela 9: Análise qualitativa da calcificação valvar. A intensidade de cálcio nas amostras obtidas por dados de angiotomografia gateada em tomógrafo de 320 canais foi identificada e atribuída uma graduação numérica com a finalidade de quantificar o cálcio através de imagens. A pontuação 9 caracteriza 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.

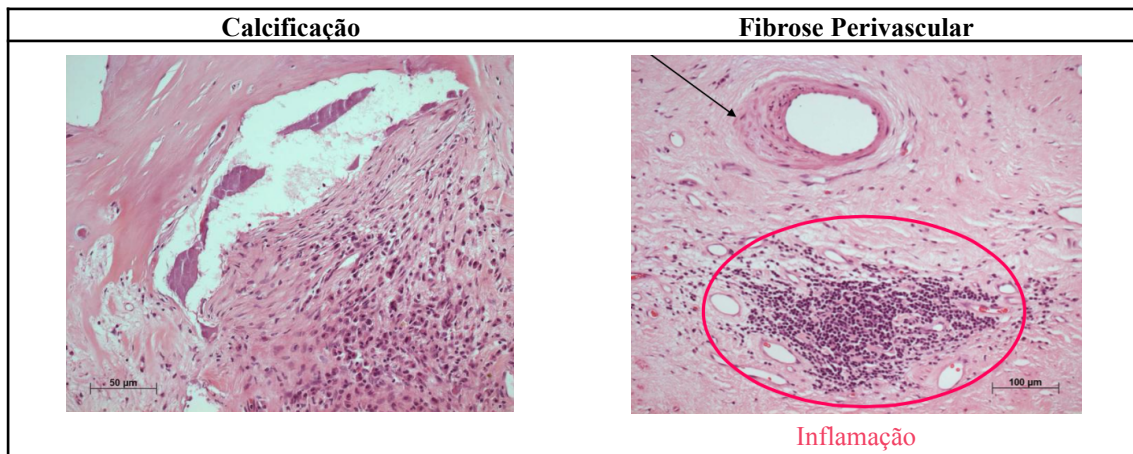
Na valvopatia aórtica reumática predominante, o cálcio aórtico demonstrou uma calcificação moderada (em comparação com o predominantemente mitral) e moderado acometimento coronariano calcífico.

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 5 – Valvas Reumáticas DRC-Exp1



Análise genética do GC-Exp1

A análise dos valores absolutos das expressões dos principais genes relacionados aos processos de fibrose, calcificação, imuno-inflamação 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 do GC-Exp1 (Figura 6).

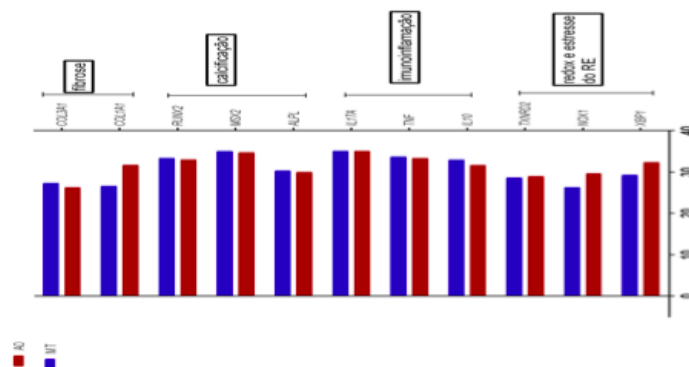


Figura 6: Análise genética do GC-Exp1. A análise gênica representa a quantificação da expressão de alguns genes dos 94 analisados das amostras normais obtidas do SVO-FMUSP. A expressão gênica das valvas mitraes está em azul e as aórticas em vermelho.

Análise genética do DCR-Exp1 (mitral e aórtico reumático)

Na Figura 7 temos dados da expressão gênica obtidas de valva aórtica e mitral doadas do mesmo indivíduo. Observa-se padrões genéticos de alguns dos genes correlacionados ao processo de imuno-inflamação distintos entre as valvas.

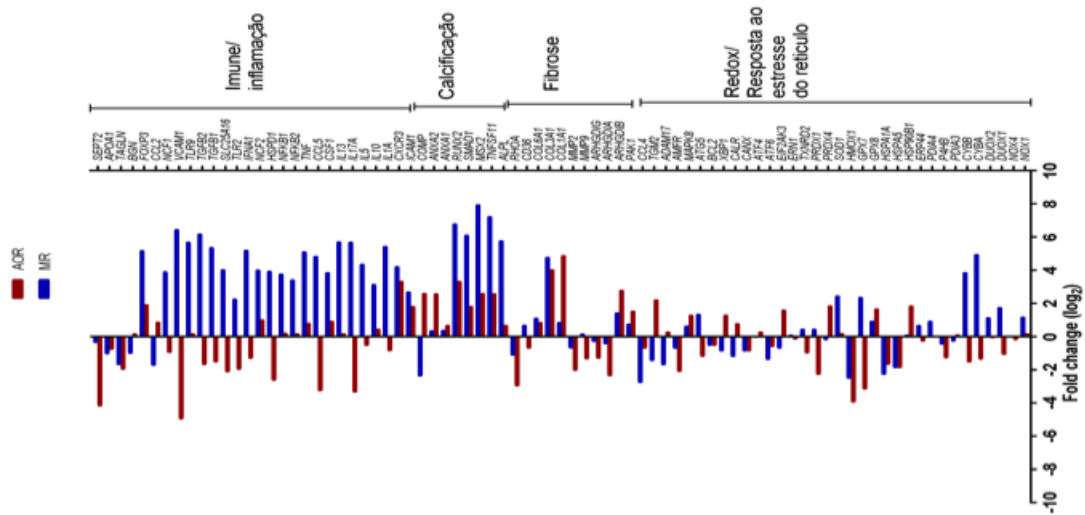


Figura 7: Análise global de expressão gênica do grupo mitral e aórtico do DRC-Exp1. A análise gênica representa a quantificação da expressão dos genes analisados das amostras. A expressão gênica das valvas mitrais está em azul e as aórticas em vermelho.

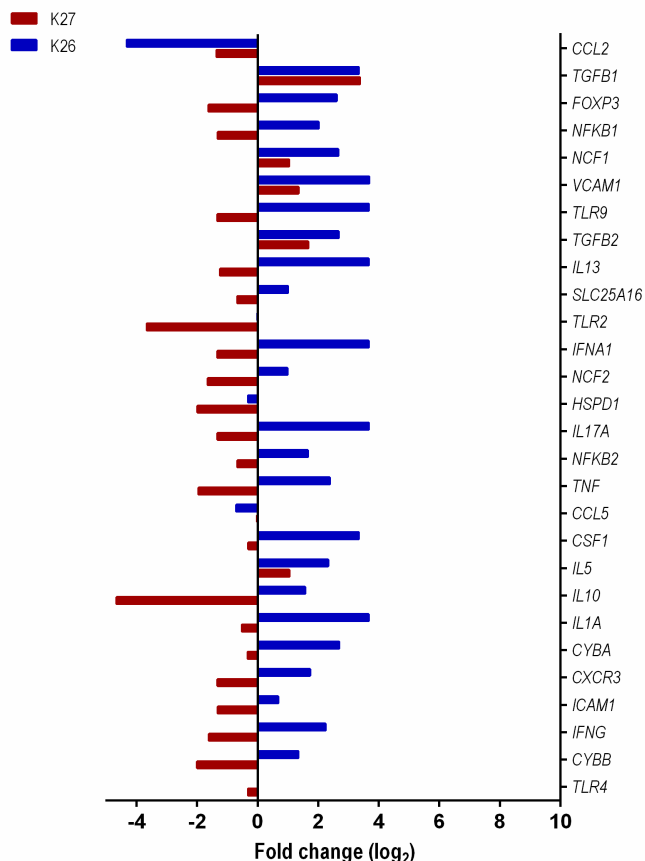


Figura 8: representação quantitativa dada em medidas de *fold-change* da expressão de genes ligados ao processo de imuno-inflamação da valva mitral e aórtica comparados ao GC-Exp1. Valva aórtica (representada em vermelho) e mitral (representada em azul) retirada do mesmo paciente reumático em mesmo momento cirúrgico evidenciando assinatura imunoinflamatória maior em valva mitral.

Conclusão e perspectivas

1. Valvas reumáticas mitrais exibiram maior expressão de genes ligados à calcificação, e imuno-inflamação em relação a valvas reumáticas aórticas. Houve, também, predominância de genes relacionados a redox, embora com menor expressão.
2. É provável que esse perfil genético influencie no processo patológico de imuno-inflamação e de reparação, determinando evoluções distintas nas lesões reumáticas mitrais e aórticas, sendo, particularmente, mais sustentado e intenso na valva mitral.
3. Os padrões protéicos e genômicos são distintos na doença valvar reumática comparado a controles normais.
4. A análise histopatológica, genômica e proteômica nos permite concluir que a fisiopatogenia da doença valvar reumática é complexa e envolve múltiplos

mecanismos de autoimunidade, inflamação e reparação com predominância na valva mitral.

5. Compreender as complexas redes regulatórias, bem como as variações imunoinflamatórias, pode nos ajudar a combater eficientemente a doença cardíaca reumática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cassidy JT, Petty RE. Textbook of pediatric rheumatology. 5ª ed. Philadelphia, Elsevier, 2005:614-629.
2. Oliveira SKF, Azevedo ECL. Reumatologia Pediátrica, 2ª ed., Rio de Janeiro, Editora Revinter, 2001:365-400.
3. WHO. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO Expert Consultation. Geneva, 29 October-1 November 2001. Geneva: World Health Organization, 2004.
4. Carapetis JR. The current evidence for the burden of group A streptococcal diseases. WHO/FCH/CAH/05.07. Geneva: World Health Organization, 2005.
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 2009;85(5):438-42.
7. Guilherme L, Faé KC, F. Higa F, et al. Towards a vaccine against rheumatic fever. Clin Dev Immunol 2006;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;124:783-801.
10. Narin N, Kutukçuler N, Ozyurek R, Bakiler AR, Parlar A, Arcasoy M. Lymphocyte subsets and plasma IL-1 a, IL-2 and TNF-a concentrations in acute rheumatic fever and chronic rheumatic heart disease. Clin Immunol Immunopathol. 1995;77(2):172-6.
12. Goldberg AC, Kalil J, Kotb M, Mehra N, Saruhan- DiresKenel G, Barbalho TP,, et al. HLA in medicine. In genetic diversity of HLA functional and medical implications. In: Charron D, editor. 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, et al. Echocardiographic screening for rheumatic heart disease. Bull World Health Organ 2008;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;278:173-4
16. Linke, A., Adams, V., Schulze, P.C., Erbs, S. and Gielen, S., et al. (2005) Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: Increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation*, 111, 1763-1770. [doi:10.1161/01.CIR.0000165503.08661.E5](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000165503.08661.E5)
17. Cristina Polidori, M., Pratico, D., Savino, K., Rokach, J., Stahl, W. and Mecocci, P. (2004) Increased F2 iso- prostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *Journal of Cardiac Failure*, 10, 334-338. [doi:10.1016/j.cardfail.2003.11.004](https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2003.11.004)
18. de Champlain, J., Wu, R., Girouard, H., et al. (2004) Oxidative stress in hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 26, 593-601.
19. Rizzo, M., Kotur-Stevuljevic, J., et al. (2009) Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress. *Translational Research*, 153, 217-223. [doi:10.1016/j.trsl.2009.01.008](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2009.01.008)
20. Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 20963-20966.
21. Tribble, D.L. (1999) Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: Emphasis on vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *Circulation*, 99, 591-595. [doi:10.1161/01.CIR.99.4.591](https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.4.591)
22. Shao et al, 2010
23. Liberman et al 2013;
24. Leopold, 2015)
25. Veasy, L. G. & Tani, L. Y. A new look at acute rheumatic mitral regurgitation. *Cardiol. Young* 15, 568–577 (2005).
26. Griffiths HR. Is the generation of neo-antigenic determinants by free radicals central to the development of autoimmune rheumatoid disease? *Autoimmun Rev* 7: 544-549, 2008.
27. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, and Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature* 466: 68-76, 2010.
28. Giovannetti A, Pierdominici M, Di Iorio A, Cianci R, Murdaca G, Puppo F, Pandolfi F, and Paganelli R. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr Pharm Des* 14: 253-268, 2008.

