



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LEONARDO PRIMO BEZERRA

GLICOPROTEÍNAS SÉRICAS LIGANTES DA LECTINA DE *DIOCLEA ALTÍSSIMA*
NO ESTUDO DE DOENÇAS PROSTÁTICAS

FORTALEZA

2014

LEONARDO PRIMO BEZERRA

GLICOPROTEÍNAS SÉRICAS LIGANTES DA LECTINA DE *DIOCLEA ALTÍSSIMA* NO
ESTUDO DE DOENÇAS PROSTÁTICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica,
do Centro de Ciências, da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.
Área de concentração: Proteômica

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo
Moreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina de
Oliveira Monteiro Moreira

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- B469g Bezerra, Leonardo Primo.
Glicoproteínas séricas ligantes da lectina de *dioclea altissima* no estudo de doenças prostáticas / Leonardo Primo Bezerra. – 2014.
101 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Proteômica.
Orientação: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira.
Coorientação: Prof. Dr. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira.
1. Próstata - Cancer. 2. Espectrometria de massa. 3. Proteômica. I. Título.

CDD 574.192

LEONARDO PRIMO BEZERRA

GLICOPROTEÍNAS SERICAS LIGANTES DA LECTINA DE *DIOCLEA ALTÍSSIMA* NO
ESTUDO DE DOENÇAS PROSTÁTICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica,
do Centro de Ciências, da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.
Área de concentração: Proteômica

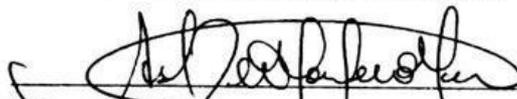
Aprovada em: 28/7/2014

BANCA EXAMINADORA



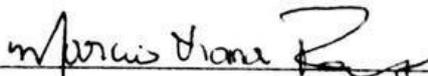
Prof. Dr. Renato Azevedo Moreira (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)



Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Frederico Bruno Mendes Batista Moreno

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Ao meu pai, Ivan Primo (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sem o qual nada disso seria possível, por sempre estar ao meu lado, ter me guiado e ajudado a superar todos os obstáculos, que não foram poucos, tornando possível a conquista de mais esta etapa na minha vida.

À minha mãe Lizieux Primo, ao meu pai Ivan Primo (*in memorian*) e ao meu irmão Rafael Primo pela construção de um lar baseado em cidadania e justiça, e por sempre me apoiarem, torceram e confiaram nas minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira, pela orientação, pelo apoio nos momentos de dificuldade, e acima de tudo por ser um amigo em quem eu posso confiar e um exemplo de profissional e ser humano, e também agradeço pela paciência e confiança depositada em mim.

À Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira, pela orientação, pelo exemplo de profissionalismo baseado em ética, moral e justiça, pela sua disponibilidade em me guiar nessa trajetória que iniciou na graduação e foi de excelente valia para minha formação pessoal, profissional e científica.

Ao Centro Integrado Regional de Oncologia – CRIO, especialmente a Dra. Cláudia Belém, ao Dr. Alexandre Sabóia, ao Dr. Galeno Taumaturgo e à querida Marcela pelo apoio no recrutamento dos pacientes.

Aos professores participantes da Banca examinadora pelas valiosas colaborações e sugestões.

À minha namorada Diva Almeida que esteve sempre comigo durante esta caminhada pela pós-graduação.

Aos amigos Raquel e Martônio que este mestrado me proporcionou conhecer, gostaria de agradecer pelas orientações e consultorias científicas, principalmente o Martônio, que sempre esteve a disposição para opinar sobre todos os assuntos pertinentes e a pesquisa.

Aos companheiros de laboratório Antônio Neto, Célio, DaLile, Felipe, Márcio, Marília e a todos que passaram pelo Núcleo de Biologia Experimental, NUBEX, da UNIFOR.

Aos amigos Thiago Jucá, Marina Lobo e Pepeu Mendes, pelo grande apoio, paciência e pela valiosa contribuição na execução deste trabalho e na minha aprendizagem neste mestrado.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

À Universidade de Fortaleza pela estrutura ofertada para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À FINEP – Financiadora de estudos e projetos, à CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à FUNCAP- Fundação Cearense ao Apoio Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro concedido ao laboratório do qual fiz parte.

"Consulte não a seus medos, mas a suas esperanças e sonhos.

Pense não sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial não usado.

Preocupa-se não com o que você tentou e falhou, mas com aquilo que ainda é possível a você fazer." (Papa São João XX2I)

RESUMO

Atualmente é crescente o número de estudos com base na alteração de perfis glicoproteômicos em diversas doenças, principalmente na busca de biomarcadores séricos para o câncer. A identificação e quantificação direta, de glicoproteínas sorológicas pouco abundantes, são difíceis, pois proteínas muito abundantes no sangue podem dificultar a identificação. Assim, ferramentas de fracionamento são necessárias para isolar, eficientemente, glicofornas proteicas aberrantes no proteoma sanguíneo. Tendo em vista a interação específica e reversível de lectinas com glicoconjugados, o uso de lectinas imobilizadas em matriz cromatográfica tem sido frequente, visando fracionar misturas complexas, envolvendo glicoproteínas, para posterior análise por espectrometria de massas. Mediante este contexto, o objetivo do presente trabalho foi investigar o uso da lectina glucose/ manose ligante de sementes de *Dioclea altíssima* (DaL) imobilizada em matriz cromatográfica Sepharose 4B® (DaL-Sepharose), no fracionamento de glicoproteínas séricas e na pesquisa de potenciais biomarcadores para o câncer de próstata (CaP). As glicoproteínas da fração retida, obtidas pela cromatografia do soro sanguíneo na matriz de DaL-Sepharose, foram identificadas e quantificadas, por espectrometria de massas, e assim, foi obtido o perfil proteico para os três grupos estudados: controle, hiperplasia prostática benigna e CaP. A identificação das proteínas diferentemente expressas entre os grupos revelou 132 glicoproteínas, destas, 29 foram unicamente identificadas no grupo com câncer de próstata ou apresentaram uma razão de ln maior que 1,2, quando comparado à quantificação no grupo controle. Após uma análise considerando a confiabilidade da identificação, estimada pelo score, e as evidências na literatura que justifiquem um possível envolvimento da proteína no câncer de próstata, destacaram-se: alfa-1-glicoproteína ácida, trombospondin-5, complemento C4 A, heptaglobina, *pregnancy zone protein*, isoforma 3 de alfa-1-antitripsina, alfa-2-glicoproteína rica em leucina e Zinc finger protein. A análise do soro sanguíneo fracionado pela matriz DaL-Sepharose, com prévia depleção de Albumina sérica humana e IgG, permitiu a identificação de alfa-1-antitripsina e a proteína IGK “únicas” no grupo com CaP e a *pregnancy zone protein* e a proteína like alfa 1 mieloma up reguladas no CaP quando comparadas ao grupo controle. A identificação destas glicoproteínas gera novas perspectivas e servem de indicativo para nortear a pesquisa e desenvolvimento de métodos de validação destes resultados para usos clínicos.

Palavras-chave: Câncer de próstata, lectina, espectrometria de massas, proteômica.

ABSTRACT

Nowadays there are an increase number of studies based on the change of glycoproteomics profiles in several diseases, especially in the search for serum biomarkers for cancer. The direct identification and quantification of serum glycoprotein of low abundance are difficult, because proteins very abundance in the blood can difficult the identification. Thus, fractionation tools are necessary to isolate efficiently changed protein glycoforms on the blood proteome. Given the specific and reversible interaction of lectins to glycoconjugates, the use of immobilized lectins on chromatographic matrix has been frequent in order to fractionate complex mixtures, involving glycoprotein for analysis for mass spectrometry. In this context, the goal of this work was to investigate the use of binding glucose/ mannose lectin from *Dioclea altissima* seed (DaL) immobilized on Sepharose chromatography matrix 4B® (DaL-Sepharose), on the fractionation of serum glycoproteins and research of potential biomarkers for prostate cancer (PC). Glycoproteins from the retained fraction obtained by chromatography of blood serum on DaL-Sepharose matrix were identified and quantified by mass spectrometry and it was obtained the protein profile to the three groups: control, benign prostatic hyperplasia and PC. The identification of differentially expressed proteins between the groups showed 132 glycoproteins, in which 29 were only identified on the group with prostate cancer or showed one reason of \ln greater than 1.2 when compared to quantification on control group. After an analysis, considering the confiability of the identification, estimated by score, and the evidences on the literature that justified a possible involvement of the protein on prostate cancer, stood out: alpha-1-acid glycoprotein, thrombospondin-5 complement C4 A, haptoglobin, pregnancy zone protein, isoform 3 of alpha 1-antitrypsin, alpha-2 glycoprotein rich in leucine and Zinc finger protein. The analysis of fractionated bood serum by DaL-Sepharose matrix with prior depletion of Human Serum Albumin and IgG allowed the identification of alpha 1-antitrypsin and the IGK protein “only” on the group with CaP and the pregnancy zone protein and protein like alfa-1 mieloma up regulated on CaP when compared to the control group. The identification of these glycoproteins generates new perspectives and suit as indicative for guiding research and validation methods development of these results for clinical uses.

Keywords: prostate cancer, lectin, mass spectrometry, proteomic

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema ilustrativo do processo de identificação de proteínas por <i>bottom-up</i>	21
Figura 2 - Isolamento da lectina das sementes de <i>Dioclea altissima</i> (DaL).....	38
Figura 3 - Perfil cromatográfico das glicoproteínas sorológicas fracionadas em matriz de <i>DaL</i> -Sepharse.	41
Figura 4 - Distribuição dos fragmentos de massa de acordo com o erro de massa exata medida em ppm, para identificação de amostras da FR em matriz de <i>DaL</i> -Sepharse.	42
Figura 5 - Distribuição que avalia qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos identificados por espectrometria de massas. Amostra da FR em matriz de <i>DaL</i> -Sepharse.	42
Figura 6 – Diagrama de Venn mostrando a distribuição das glicoproteínas fracionadas pela matriz <i>DaL</i> -Sepharse.	43
Figura 7 - Expressão diferencial para a relação controle / CaP de glicoproteínas isoladas por cromatografia em matriz de <i>DaL</i> -Sepharse.....	44
Figura 8 - Expressão diferencial para a relação HPB / controle de glicoproteínas isoladas por cromatografia em matriz de <i>DaL</i> -Sepharse.....	44
Figura 9 – Glicoproteínas da FR pela matriz de <i>DaL</i> -Sepharse, agrupadas de acordo com o processo biológico.....	45
Figura 10 - Glicoproteínas da FR pela matriz de <i>DaL</i> -Sepharse, agrupadas de acordo com a função biológica.....	46
Figura 11 - Glicoproteínas da FR pela matriz de <i>DaL</i> -Sepharse, agrupadas de acordo com a localização.....	47
Figura 12 - Expressão diferencial para a relação HPB / CaP de glicoproteínas isoladas por cromatografia em matriz de <i>DaL</i> -Sepharse.....	52
Figura 13 - Perfil cromatográfico das proteínas sorológicas fracionadas, em matriz Hi-trap Albumin IgG depletion™.....	60
Figura14 - Distribuição das proteínas e glicoproteínas identificadas no soro sanguíneo, e nas frações obtidas pela cromatografia de afinidade em matriz de Hi-trap Albumin IgG depletion™.	61
Figura 15 - Perfil cromatográfico das glicoproteínas da FI aplicadas em matriz de <i>DaL</i> -Sepharse .	63
Figura 16 - Distribuição dos fragmentos de massa de acordo com o erro de massa exata, medida em ppm, para identificação de amostras da FINR e FIR em matriz de <i>DaL</i> -Sepharse.....	64
Figura 17 - Distribuição que avalia qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos identificados por espectrometria de massas. Amostra da FINR e FIR em matriz de <i>DaL</i> -Sepharse.	64
Figura 18 - Distribuição das proteínas e glicoproteínas obtidas após depleção de albumina sérica humana e imunoglobulina G, quando fracionadas pela matriz <i>DaL</i> -Sepharse.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos sujeitos participantes do estudo.....	40
Tabela 2 – Glicoproteínas identificadas na FR em matriz de <i>DaL</i> -Sephrose, diferencialmente expressas no grupo com CaP ou observadas apenas nesse grupo.	50
Tabela 3 – Glicoproteínas identificadas na FR em matriz de <i>DaL</i> -Sephrose, diferencialmente expressas entre os grupo com CaP e HPB.....	53
Tabela 4 – Proteínas e glicoproteínas identificadas na FINR e FIR, em matriz de <i>DaL</i> -Sephrose, diferencialmente expressas no grupo com CaP ou observadas apenas nesse grupo.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Álcool desidrogenase
AFP	Alfa-fetoproteína
AFP-L3	Isoforma fucosilada de alfa-fetoproteína
alfa 1 GP ácida	alfa 1 glicoproteína ácida
Apo	Apolipoproteína
CaP	Câncer prostático
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>ConA</i>	Concanavalina A
CRIO	Centro Integrado de Oncologia do Ceará
DaL	<i>Dioclea altíssima</i>
DRC	Domínio de reconhecimento a carboidrato
DTT	Ditiotreitol
EM	Espectrometria de massas
ESI	Ionização por eletrospray
FDA	Food and Drug Administration
FI	Fração imunodepletada
FINR	Fração imunodepletada não-retida
FIR	Fração imunodepletada retida
FNR	Fração não retida
FR	Fração retida
FTICR	<i>Transform Ion-Cyclotron Resonance</i>
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento da Epiderme Humana
HCC	Carcinoma hepatocelular
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
Ig	Imunoglobulina

IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LC	Cromatografia líquida
LC-MS	Espectrometria de massas acoplada com cromatografia líquida
MAPK-7	Proteína quinase ativada por mitógeno 7
MPTs	Modificações pós-traducionais
MS ^E	Espectrometria de Massas por eletrospray
MS/MS	Espectrometria de massas em <i>tandem</i>
m/z	Razão entre massa e carga de um peptídeo ou proteína
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
PLGs	<i>Protein Lynx Global Server</i>
PSA	Antígeno Prostático Específico
PSA-st	PSA sorológico total ⁴
PZP	<i>Pregnancy zone protein</i>
Q-TOF	Analisador quadrupolo acoplado com <i>Time-of-Flight</i>
SDP	Sem doença prostática
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
TDR	Toque Digital Retal
TOF	<i>Time-of-Flight</i>
UPLC	Cromatografia líquida de ultraperformance
2D	Bidimensional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Câncer	17
2.2 Câncer de próstata	17
2.3 Proteômica	18
2.4 Proteômica no estudo de doenças	23
2.5 Glicoproteínas e o câncer.....	24
2.6 Lectinas	27
2.7 Lectina de sementes de <i>Dioclea altíssima</i> (DAL).....	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 População de estudo e aspectos éticos da pesquisa.....	31
4.2 Critério de inclusão	31
4.3 Critérios de exclusão	31
4.4 Reagentes	31
4.5 Coleta do sangue e obtenção do soro	32
4.6 Dosagem de PSA sorológico total (PSA-st) e diagnóstico patológico.....	32
4.7 Obtenção da lectina de <i>Dioclea altíssima</i> –DaL.....	32
4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	33
4.9 Preparação da matriz cromatográfica DaL-Sepharose	33
4.10 Depleção de albumina e imunoglobulina de soro sanguíneo	34
4.11 Cromatografia de afinidade em matriz cromatográfica DaL-Sepharose.....	34
4.12 Espectrometria de massas	35
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	38

5.1 Isolamento da DaL e imobilização da lectina em matriz cromatográfica	38
5.2 Caracterização dos sujeitos do estudo	39
5.3 Fracionamento e identificação de proteínas e glicoproteínas do soro sanguíneo	40
5.3.1 Glicoproteínas sorológicas isoladas em matriz DaL-Sepharose.....	40
5.3.1.1 Panorama geral do fracionamento e identificação das glicoproteínas	41
5.3.1.2 Perfil de glicoproteínas ligantes DaL-Sepharose do grupo controle.....	48
5.3.1.3 Perfil de glicoproteínas ligantes DaL-Sepharose do grupo com doença prostática.....	49
5.3.1.4 Proteínas da fase aguda da inflamação.....	54
5.3.1.5 Imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento.....	56
5.3.1.6 Proteínas com atividade quinase	56
5.3.1.7 Pregnancy Zone Protein.....	57
5.3.1.8 Processo celular.....	57
5.3.2 Glicoproteínas sorológicas isoladas pela combinação de imunodepleção e matriz DaL-Sepharose.....	59
5.3.2.1 Depleção de albumina e imunoglobulina de soro sanguíneo	60
5.3.2.2 Frações imunodepletada retida e não retida em coluna DaL-Sepharose.....	62
5.3.2.2.1 Panorama geral do fracionamento e identificação das glicoproteínas	62
5.3.2.2.2 Perfil de glicoproteínas ligantes DaL-Sepharose do grupo com doença prostática	66
5.4 Considerações finais.....	71
6 CONCLUSÃO	73
Referências.....	74
APÊNDICE A – GLICOPROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA FRAÇÃO RETIDA PELA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM MATRIZ DAL-SEPHAROSE.....	87
APÊNDICE B - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA FINR -FRAÇÃO IMUNODEPLETADA NÃO RETIDA PELA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM MATRIZ DAL-SEPHAROSE.	93
APÊNDICE C - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA FIR - FRAÇÃO IMUNODEPLETADA RETIDA PELA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM MATRIZ DAL-SEPHAROSE.....	96
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA COLETA DE AMOSTRAS NO HOSPITAL DR. EVANDRO AIRES DE MOURA	97

ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA COLETA DE
AMOSTRAS NO CENTRO INTEGRADO DE ONCOLOGIA DO ESTADO DO CEARÁ – CRIO **98**

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde estima para o ano de 2030: 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Com o aumento da incidência e da mortalidade por esta doença, surge a necessidade pela busca de biomarcadores clínicos, que possibilitem o diagnóstico através de um simples exame de sangue (ADAMCZYK et al., 2012).

A saúde do homem foi um tema abordado pelo Ministério da saúde (2008), que ganhou atenção especial com o lançamento da Política Nacional de Atenção a Saúde do Homem. Esta política estimula pesquisas relacionadas a doenças, que representam maiores agravos à saúde masculina, como por exemplo, o câncer prostático (CaP), que apresenta elevada incidência e mortalidade.

O principal marcador sorológico empregado no diagnóstico do CaP é uma glicoproteína, o antígeno prostático específico, PSA, que apesar de ser bastante utilizada, apresenta algumas limitações de sensibilidade e especificidade influenciados pela natureza heterogênea da doença (SMITH et al., 2012; HEIDENREICH et al., 2011). Atualmente é crescente o número de estudos com base na alteração de perfis glicoproteômicos em diversas doenças, principalmente na busca de vantajosos biomarcadores séricos para o câncer (YOU et al., 2010; HARBECK et al., 2014). É desejável, que estes marcadores, possam ser úteis na compreensão do mecanismo patológico da doença e na complementação dos marcadores atuais, tornando o diagnóstico mais seguro (SCHIESS et al., 2009).

A identificação e quantificação direta, de glicoproteínas sorológicas pouco abundantes, são difíceis, pois proteínas muito abundantes no sangue podem mascarar essa identificação (MORTEZAI et al., 2012; UZUN et al., 2013). Assim, ferramentas de fracionamento são necessárias para isolar, eficientemente, glicofomas proteicas aberrantes no proteoma sanguíneo (MEDVEDEV et al., 2012). Tendo em vista a interação específica e reversível de lectinas a glicoconjugados, o uso de lectinas imobilizadas em matriz cromatográfica tem sido frequente, visando fracionar misturas complexas, envolvendo glicoproteínas, para posterior análise por espectrometria de massas (CLARK; MAO, 2012).

A lectina de sementes de *Dioclea altissima* (DaL) vem sendo utilizada pelo nosso grupo de pesquisa em estudos de citotoxicidade com cultura de células de CaP, PC3M, e também na investigação de câncer em material de tecido prostático obtido por biopsia.

Mediante este contexto, o objetivo do presente trabalho foi investigar o uso da lectina de sementes de *Dioclea altissima*, DaL, imobilizada em matriz cromatográfica Sepharose 4B® (DaL-Sepharose), no fracionamento de glicoproteínas séricas e na pesquisa de potenciais biomarcadores para o câncer de próstata.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer

O câncer é um problema de saúde pública em muitas partes do mundo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). A doença geralmente está associada à dor, sofrimento e degeneração, equivalendo a uma sentença de morte, ou seja, existe a crença de que a morte por câncer é sempre dolorosa e fatigante (BOSSONI et al., 2009). De acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade, no ano de 2011, as doenças do aparelho circulatório ocuparam o primeiro lugar em causas de morte sendo a morte por neoplasia o segundo lugar (DATASUS, 2011).

2.2 Câncer de próstata

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estimou para 2014 uma incidência de 62,8 casos a cada 100 mil homens no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). As maiores incidências de câncer de próstata (CaP) são observadas em países desenvolvidos, sendo, por vezes, a neoplasia mais frequente em homens. Segundo estimativas da Sociedade Americana de Câncer, no ano de 2014 são esperados 233,0 novos casos de CaP para cada 100 mil homens nos Estados Unidos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Porém, regiões de baixa e média potência econômica, como América latina, África subsaariana e Caribe apresentam as maiores taxas de mortalidade por CaP (CENTER et al., 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

A etiologia que determina a manifestação clínica do CaP é largamente desconhecida. Contudo, idade, hereditariedade/genética e etnia são reconhecidamente fatores de riscos para o desenvolvimento da doença (HEIDENREICH et al., 2012). Além disso, estudos de imigração sugerem que fatores exógenos estão associados ao risco relativo de CaP. Por exemplo, consumo de álcool, tabagismo e dieta rica em carne vermelha e gordura de origem

animal favorece o desenvolvimento da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Porém, ainda não foi completamente estabelecido se a modificação destes fatores pode minimizar a incidência e a mortalidade por essa neoplasia.

A suspeita de CaP é investigada por dosagem de antígeno prostático específico (PSA) no sangue e avaliação física da próstata pelo Toque Digital Retal (TDR), que podem conduzir a biopsia de tecido prostático guiada por ultrassonografia transretal (BERGER, 2011). O diagnóstico definitivo depende da presença de adenocarcinoma nos espécimes histológicos de próstata obtidos pela biopsia guiada por ultrassonografia transretal (PAL et al., 2013).

As dosagens do PSA sorológico total (PSA-st) têm sensibilidade que varia entre 70 e 90%. Sob o ponto de vista prático, níveis séricos de PSA-st inferiores a 2,5ng/ mL em pacientes com TDR normal são acompanhados de riscos desprezíveis de presença de CaP. Por outro lado, se os níveis de PSA-st situarem-se entre 2,5 ng/mL e 10 ng/mL, a chance de existir neoplasia prostática varia de 23 a 40%. Quando os valores de PSA-st superam 10ng/mL, o risco de se identificar câncer na próstata é de 70% (KORKES et al., 2009; DAMBER; AUS, 2008).

O aumento da expectativa de vida e novas e eficazes formas de tratamentos podem explicar uma maior incidência, acompanhada de uma redução da mortalidade, por CaP, em países ricos (AUVINEN et al, 2010; ZHU et al., 2012; SCHRÖDER; ROOBOL, 2012). Porém, não há evidências suficientes que justifiquem a implantação de um programa de rastreamento populacional. A discussão, sobre a implantação de um programa de rastreamento, reside no fato de que as metodologias empregadas atualmente conduzem a biopsias desnecessárias, com o conseqüente aumento de custos e, eventualmente, da morbidade relacionada ao procedimento (RHODEN; AVERBECK, 2010). Neste contexto, surge a necessidade de novas formas de diagnóstico eficaz na diferenciação entre CaP e Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e na avaliação da agressividade, risco, progressão e reincidência do tumor (YOU et al., 2010).

2.3 Proteômica

As Proteínas são o reflexo de alterações celulares em diferentes órgãos e tecidos vivos, e por isso são utilizadas no estudo e diagnóstico de diversas doenças (KOČEVAR et al., 2013). O perfil de proteínas em um dado momento é alterado como um resultado da

amplificação, mutação, translocação, aumento ou diminuição da atividade transcricional de um gene em uma célula, e ainda, por modificações pós-traducionais (MPTs), como metilação, fosforilação e glicosilação (PIN et al., 2013; SCHIESS et al., 2009).

A caracterização das proteínas expressas por um determinado tecido e/ou organismo em condições determinadas define o proteoma (MARTINKOVA et al., 2009); termo utilizado pela primeira vez por Wilkins quando este ainda era tido, apenas, como complemento proteico do genoma (HUBER, 2003). A área da proteômica oferece a possibilidade de se estudar, de forma descritiva e quantitativa, o conjunto de proteínas, desde uma organela até um ecossistema (BARBOSA et al., 2012). Além disso, variações proteicas em uma população, mudanças em resposta a um ambiente, mudanças decorrente do desenvolvimento normal ou alterado, e modificações e interações com outras proteínas podem ser detectados por meio desta ciência (VALLEDOR; JORRÍN, 2011).

Concentrações elevadas de marcadores proteicos, frequentemente, só aparecem no último estágio da doença (SCHIESS et al., 2009). Por esta razão, para permitir o diagnóstico precoce de uma doença é necessário detectá-los, de forma rápida e garantida, mesmo quando apenas um baixo nível está presente na amostra do paciente (GEMEINER et al., 2009). Em geral, a eletroforese bidimensional (2D), com posterior sequenciamento de *spots*, e a espectrometria de massas (EM) são as técnicas utilizadas para identificação de proteínas, como marcadores bioquímicos, e no estudo de MPTs em diferentes condições fisiológicas e patológicas (TISSOT et al., 2009).

Na eletroforese 2D as proteínas são separadas, inicialmente, de acordo com seu ponto isoelétrico e em seguida pela sua massa molecular utilizando uma eletroforese PAGE-SDS (BARBOSA et al., 2012). Após coloração por prata ou *coomassie*, os *spots* proteicos no gel, com intensidades diferentes, podem representar biomarcadores. No passo seguinte esses *spots* são removidos, por meio de um corte no gel, para identificar as proteínas por EM (CARVALHO; DEGRAVE, 2006).

A Eletroforese 2D é um processo demorado, de alto custo, laborioso e geralmente restrito à observação de proteínas desnaturadas em uma faixa de pH entre 3,5 e 11,5 e com peso molecular variando de 7 ~ 150 kDa (FOURNIER et al., 2007; GILMORE; WASHBURN, 2010; RABILLOUD et al., 2010). Essa tecnologia também se torna inviável para estudos de proteoma em larga escala, uma vez que seria necessária a utilização de diversos géis bidimensionais para um estudo individualizado. A realização de *pools* de fluidos biológicos é uma alternativa eficiente para analisar diversos materiais biológicos de uma só

vez. Contudo, ao estudar *pools* perde-se a individualidade molecular dos pacientes (CARVALHO; DEGRAVE, 2006).

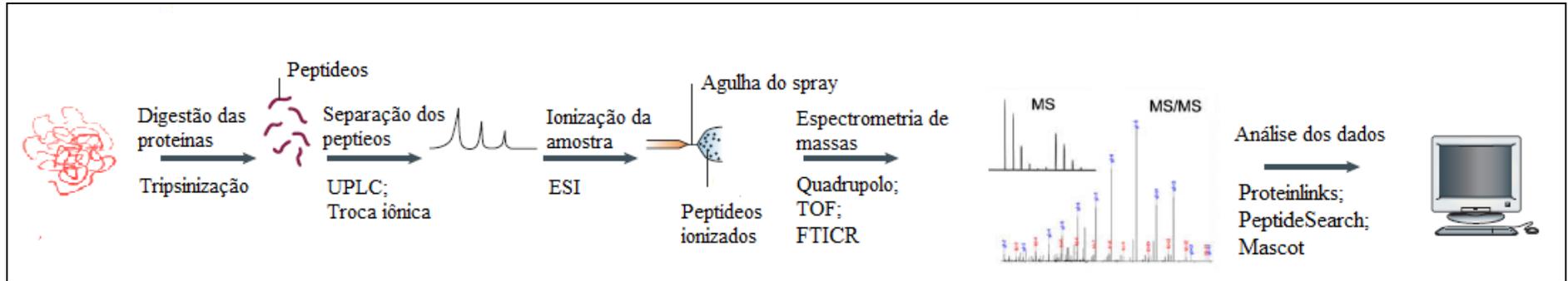
A tecnologia empregada na EM evoluiu e atualmente estão disponíveis equipamentos de maior resolução, como o Waters nanoAcquity UPLC[®] Q-TOF, acoplado a uma coluna de fase reversa, para separação de peptídeos, e dotado de fonte ionizante eletrospray (LO TURCO et al., 2010). Espectrômetros de massas desse tipo podem ser utilizados para análise de misturas complexas sem uma previa separação por eletroforese 2D, e assim apresentam melhor reprodutibilidade, menor risco de contaminação e redução de tempo na análise (GILMORE; WASHBURN, 2010).

O princípio de funcionamento de qualquer espectrômetro de massas baseia-se na detecção de íons de acordo com sua razão massa/carga (m/z), sendo m a massa em u [massa atômica unificada, chamada também de Dalton (DA)] e z a carga formal (STEEN; MANN, 2004). A essência da técnica envolve a geração de íons que são depois detectados. A sofisticação surge nos métodos que são usados para a geração desses íons e no modo de analisá-los (BARBOSA et al., 2012).

Para serem analisadas por EM, as proteínas precisam ser quebradas em peptídeos, pois a massa de uma proteína não é suficientemente discriminante para identificá-la com confiança (STEEN; MANN, 2004). Deste modo, as proteínas são digeridas por enzimas proteolíticas, geralmente, utiliza-se a tripsina que hidrolisa proteínas clivando-as, especificamente, no C-terminal da lisina e da arginina, gerando peptídeos com pelo menos dois sítios de protonação eficientes, um grupo amino N-terminal e o resíduo C-terminal básico, que são prontamente ionizados para serem detectados como íons positivos (BECKER; BERN, 2011).

Os espectrômetros de massas são constituídos por: (i) uma fonte ionização, como a ionização por eletrospray (ESI); (2) um analisador de massa que varia de simples, como *Time-of-Flight* (TOF), a mais complexo, como *Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance* (FTICR); (2i) um detector de íons e (iv) uma unidade de aquisição de dados (WASINGER; CORTHALS, 2002). Um esquema, geral, do processo de identificação de proteínas por espectrometria de massas é mostrado na figura 1.

Figura 1- Esquema ilustrativo o processo de identificação de proteínas por *bottom-up*, metodologia que consiste na separação dos peptídeos obtidos após digestão trípica de soluções proteicas complexas, seguida da análise por espectrometria de massas (MS), que pode incluir a fragmentação do íon precursor (MS/MS). O esquema ilustra a ionização por eletrospray (ESI), e cita alguns tipos de analisadores, como *Time-of-Flight*, TOF, e *Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance* (FTICR).



Fonte: adaptado de Steen; Mann (2004).

Os íons, produzidos pela fonte de ionização, são acelerados em direção ao analisador de massas para serem separados de acordo com a sua razão m/z . Os dados de EM são registrados como espectros que mostram a intensidade do íon pelo valor da sua razão m/z . Os espectros produzidos são comparados aos correspondentes fragmentos teóricos calculados a partir de sequências de proteínas provenientes de bases de dados genômicas (BATESON et al., 2011). Para obter a identidade da proteína intacta, por sua vez, o mapa de peptídeos produzidos pode ser comparado a mapas teóricos de bases de dados genômicas para identificar a proteína com maior probabilidade de gerar esse mapa (BECKER; BERN, 2011; COTTRELL, 2011).

A Espectrometria de massa em *tandem*, MS/MS, tem sido amplamente utilizada em análise proteômica, nesta técnica um peptídeo ionizado, para ser analisado, é seletivamente isolado e fragmentado para se obter um espectro MS/MS (UMMANNI et al., 2008, GOOD et al., 2011). O padrão destes íons fragmentos depende da sequência de aminoácidos do seu íon precursor, que pode ser comparado com os espectros teóricos, calculados a partir de sequências de proteínas na base de dados. Se o espectro MS/MS medido para um peptídeo mostra uma correspondência confiável com um dos espectros teórico, o peptídeo é identificado e usado para o cálculo do espectro teórico (COTTRELL, 2011; KITO; ITO, 2008).

Uma vez que a análise por MS/MS identifica peptídeos individuais, esta análise deve ser combinada com a cromatografia líquida (LC) como um passo de separação de peptídeos que precede a EM. A LC é uma técnica comumente usada, onde peptídeos são separados por cromatografia líquida de fase reversa, e posteriormente, são ionizados por ESI e introduzidos no espectrômetro de massa (MITCHELL, 2010; KITO; ITO, 2008).

Sistemas, como LC- MS/MS com fonte de ionização ESI, têm auxiliado a análise proteômica de amostras, altamente complexas, composta de um grande número de proteínas (SILVA et al., 2006). O poder de resolução destes sistemas pode ser melhorado através da utilização de separação multidimensional, com uso de troca catiônica e cromatografia líquida de fase reversa, para identificar mais proteínas em uma análise (PENG et al., 2003; LIU et al., 2004).

Outro recurso da EM é a capacidade de obter informações quantitativas na análise do proteoma. Desta forma, várias estratégias têm sido desenvolvidas para aprimorar a quantificação em estudos proteômicos comparativos (MUELLER et al., 2008). As metodologias empregadas podem ser divididos em duas categorias: uma é baseada na

marcação com isótopo estáveis e o outro é um método que não utiliza marcação com isótopos, chamada *label free* (KITO; ITO, 2008).

Os recentes avanços em proteômica estão produzindo poderosas plataformas que são úteis não apenas para detecção de proteínas, mas também para quantificação em muitos fluidos diferentes, tais como urina, sangue, fluido seminal, e também em tecidos (BATESON et al., 2011).

2.4 Proteômica no estudo de doenças

Embora o estudo de tumores por biópsias do tecido possa fornecer uma variedade de informações sobre a doença, a identificação de biomarcadores em derivados do sangue, como plasma ou soro, seria ideal; pois exigiria métodos relativamente não invasivos de coleta de amostra dos pacientes (HESSELS et al., 2005; PIN et al., 2013). Além disso, derivados do sangue contém uma diversidade de proteínas, secretadas a partir de células cancerígenas ou produzidas/suprimidas em resposta a invasão tumoral que podem ser utilizadas como biomarcadores (SCHIESS et al., 2009; TISSOT et al., 2009). A expressão aumentada / diminuída de proteínas e peptídeos em relação ao indivíduo saudável deverá ser útil como indicador de crescimento tumoral (BATESON et al., 2011).

Contudo, derivados do sangue apresentam uma grande variedade de proteínas e com isso um complexo *dynamic range* ou faixa dinâmica (DRAKE et al., 2006). A faixa dinâmica, em proteômica, refere-se à situação em que algumas proteínas são expressas em maior abundância que outras (SCHIESS et al., 2009, DRAKE et al., 2011). Por exemplo, no plasma sanguíneo aproximadamente 22 proteínas constituem mais de 99% da massa total destas moléculas, enquanto o restante, 1%, são proteínas de média e baixa abundância. Nesse grupo de proteínas pouco abundantes estão aquelas úteis no diagnóstico e prognóstico de doenças, como o câncer (AHMED et al., 2005).

A grande complexidade de proteínas presentes nas amostras biológicas tem dificultado os esforços utilizando EM na identificação de biomarcadores com relevância clínica; principalmente devido a uma supressão na ionização das proteínas pouco abundantes (DRAKE et al., 2011). Por isso, a remoção prévia da maioria das proteínas altamente abundantes mostrou melhorar a detecção de proteínas presente em quantidades relativamente inferior (YANG et al., 2006). Portanto, amostras preparadas para análise proteômica por EM devem incluir métodos de fracionamento prévios a identificação (MEDVEDEV et al., 2012).

Existem muitas metodologias de fracionamento de proteínas com base nas diferenças de peso molecular, forma, carga, ponto isoelétrico (PI), hidrofobia e afinidade por meio de interações biomoleculares específicas (REHMAN et al., 2012). A cromatografia de afinidade tornou-se um método popular usado nos estudos proteômicos, para separação de vários grupos de proteínas. Essa técnica é útil como uma ferramenta para geração de uma ampla gama de informação em estudos de interações proteína-proteína, estudo de modificações pós-traducionais ou a recuperação de um determinado alvo contido no proteoma (MEDVEDEV et al., 2012).

A cromatografia de afinidade baseada em imunodepleção é uma das ferramentas utilizadas há mais tempo para depleção de amostras complexas. Antes da era proteômica, Takase e colaboradores (1987), utilizaram esta técnica cromatográfica, com três anticorpos monoclonais distintos ligados covalentemente a uma matriz de Sepharose, para produzir um plasma deficiente de fator-V2I. Com o advento da era proteômica, a cromatografia de imunodepleção foi introduzida como metodologia importante na pesquisa do proteoma humano. Atualmente, esta técnica é largamente utilizada na pesquisa de biomarcadores em várias doenças, dentre elas o câncer, para remover proteínas muito abundantes em fluidos biológicos (MEDVEDEV et al., 2012).

2.5 Glicoproteínas e o câncer

Aproximadamente 50% de todas as proteínas humanas são glicosiladas (JANKOVIĆ, 2011). A ligação da proteína a cadeia de glicano influencia suas propriedades físico-químicas, seu dobramento, agregação, solubilidade e conseqüentemente na atuação destas proteínas glicosiladas em muitos processos biológicos (MEDVEDEV et al., 2012), incluindo, desenvolvimento, resposta imune, inflamação, divisão e regulação celular. Proteínas glicosiladas presentes na superfície e na matriz extracelular cria um ponto inicial de contato nas interações celulares (FRY et al., 2013). O reconhecimento de glicanos como mediadores importantes em processos biológicos está estimulando o crescente interesse na pesquisa com enfoque em glicoproteínas (ADAMCZYK et al., 2012).

É consolidado que células cancerígenas possuem proteínas com glicosilações alteradas, quando comparado com células normais. Além disso, alterações bioquímicas decorrentes da doença, que afetam a biossíntese de glicanos, podem ser mais evidentes do que as mudanças de proteínas relacionadas à doença. (ADAMCZYK et al., 2012). As mudanças

no padrão de glicosilação são, geralmente, resultado da alteração na atividade de enzimas, como glicosiltransferases e glicosidases. Essas alterações em glicoproteínas são evidenciadas pela presença de glicoconjugados específicos presentes na superfície de células cancerígenas (GHAZARIAN et al., 2011).

Existem vários tipos de glicosilações em glicoproteínas, com as duas mais comuns ocorrendo com a formação de glicanos *O*-ligados e *N*-ligados (KIM; MISEK, 2011). Na *N*-glicosilação, um oligossacarídeo, previamente sintetizado, é transferido para o nitrogênio da amida da cadeia lateral de uma asparagina, da proteína recentemente sintetizadas no retículo endoplasmático. Enquanto a *O*-glicosilação ocorre numa fase posterior do processamento de proteína, no aparelho de Golgi, e envolve a ligação de uma estrutura de glicano, geralmente um resíduo de *N*-acetilgalctosamina, a um resíduo de serina ou treonina no hidroxil oxigênio do aminoácido, então, outros monossacarídeos são adicionados a esse carboidrato e um oligossacarídeo é formado (CLARK; MAO, 2012).

Alterações em glicanos *N*-ligados desenvolve um importante papel na adesão celular utilizada em processos de invasão e metástase de tumores (SCHIESS et al., 2009; YANG et al., 2006; ZENG et al., 2010). A maioria das proteínas localizadas na membrana celular ou na superfície celular é secretada, e desta maneira podem ser detectadas no sangue (KOČEVAR et al., 2013).

A estrutura dos glicanos ou dos sítios de modificação glico-pós-trducional podem ser alterados durante a iniciação e progressão do câncer. Estudos glicoproteômicos fazem a análise comparativa de perfis, normal e estágios da doença, fornecendo potenciais novos biomarcadores para câncer que podem ser usados na prática médica em um cenário futuro (AHMED et al., 2005; Li, X.-H. et al., 2011; SCHWAMBORN, 2012). De fato, a maioria dos biomarcadores para câncer aprovados pela Food and Drug Administration, FDA, comumente utilizados na clínica, são glicoproteínas ou glicosilados (CLARK; MAO, 2012).

Atualmente, na prática médica são disponíveis testes com glicoproteínas para diagnóstico e monitoramento da terapia no câncer de mama (CA 15-3, CA 27-29); para o câncer de pâncreas (CA 125); no tumor de ovário (CA-125); no câncer de cólon, pâncreas e intestino (antígeno carcinoembrionário - CEA), além de outros, porém estes marcadores nunca são utilizados de forma isolada devido à carência de especificidade e sensibilidade para o câncer em particular (CLARK; MAO; 2012). Proteínas glicosiladas também são utilizadas na escolha de terapias para o câncer, um exemplo, é presença de receptor de progesterona

HER2 e o receptor de estrógeno que são alvos para o tratamento do câncer de mama (HARBECK et al., 2014; FILIPITS et al., 2011).

O PSA é uma glicoproteína presente em pequenas quantidades no sangue de pacientes com próstata saudável, mas costuma estar elevada na presença de câncer de próstata e em outras desordens prostáticas, como obesidade, prostatites ou HPB (STANGELBERGER et al., 2008). Muitos estudos são realizados para melhorar a especificidade do PSA, principalmente baseado na mensuração de diferentes subformas, mas também em alterações pós-traducionais como glicosilação (ADAMCZYK et al., 2012). Saldova et al. (2011) reportaram aumento de fucosilação e aumento da expressão de glicofomas sorológicas ligadas α 2-3 ácido siálico em CaP quando comparado com HPB. Os autores também mostraram que aumento na expressão de isoformas com maiores ramificações contendo ácido siálico está relacionado com pacientes com pior prognóstico, como doença mais agressiva e maior chance de recaída da doença.

A análise de modificações no padrão de glicosilação proteica é complexa e promissora, como observado por Knezevic et al. (2009) que reportaram a análise do plasma de 1008 indivíduos de uma linhagem definida, e correlacionaram variabilidade, hereditariedade e determinantes ambientais com variações em seus perfis de glicanos plasmáticos. A variabilidade de glicanos encontrados entre os indivíduos foi maior que o esperado, sugerindo que alterações nos níveis de glicanos de proteínas plasmáticas têm implicações importantes no desenvolvimento de futuros testes de diagnóstico. Uma publicação mais recente compara a diferença na glicosilação no plasma de 2705 pacientes e aponta a diferença na glicosilação como uma possível razão para diferentes fatores de risco para doenças entre os indivíduos (LAUC et al., 2010).

As metodologias empregadas no estudo de glicosilação envolvem a separação das glicoproteínas por cromatografia de interação hidrofílica, cromatografia líquida de alto desempenho, cromatografia de imunodepleção, eletroforese capilar, lectina afinidade e EM (ADAMCZYK et al., 2012). Um exemplo bem sucedido de glico-biomarcador é uma isoforma fucosilada de alfa-fetoproteína, a AFP-L3, que está significativamente elevada no carcinoma hepatocelular (HCC). As isoformas de alfa-fetoproteína, como AFP-3, são fracionadas de acordo com afinidade por uma lectina de *Lens culinaris* utilizando uma técnica cromatográfica que possui uma lectina imobilizada em uma matriz inerte (LEERAPUN et al., 2007).

AFP sérica é utilizada rotineiramente na monitorização de pacientes portadores de doença hepática crônica, com alto risco de desenvolvimento de HCC. Porém, AFP-L3 foi aprovado pelo FDA para detecção de HCC no início da doença, por ser considerado como um marcador mais específico. Esses achados destacam a melhoria na eficiência do diagnóstico usando glicoproteínas sorológicas para o diagnóstico de doenças (ADAMCZYK et al., 2012).

2.6 Lectinas

O início do estudo com lectinas é anterior a 1888, quando Hermann Stilmark descreveu as propriedades de aglutinação da ricina. O termo lectina é proveniente do latim *legere* que significa “escolher” ou “selecionar” (SINGH; SARATHI, 2012). Contudo, o conceito de lectina vem recebendo diversas adaptações na sua denominação com o passar do tempo, devido às descobertas que culminaram no aprofundamento e conseqüentemente no aumento da complexidade nos estudos de uma ciência que acabou ficando conhecida como lectinologia (LAM; NG, 2011).

Atualmente, uma das definições mais abrangente diz que lectinas pertencem a uma família de (glico) proteínas, sem atividade enzimática e/ou catalítica, amplamente distribuída na natureza (LIU et al., 2009), existente em vírus e em todas as formas de vida, e que são capazes de se ligar a mono e oligossacarídeos de forma reversível e com alta especificidade (ZHOU et al., 2011), além de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e/ou glicoconjugados (SHARON, 2007; LIU et al., 2009).

Durante os últimos anos, estruturas primária e terciária de lectinas foram elucidadas, e foi observado que lectinas de diversas fontes carecendo de semelhança primária compartilhavam similaridades na estrutura terciária (GHAZARIAN et al., 2011). Estudos estruturais contundentes sugerem que a atividade de ligação a carboidrato é realizada por um limitado resíduo de aminoácido designado como domínio de reconhecimento a carboidrato, DRC (SHARON, 2007). DRC de lectinas pode discriminar entre isômeros anoméricos como função de sua especificidade (SHARON; LIS 2004). Por exemplo, a lectina Concanavalina A (*ConA*) liga-se especificamente a um anômero de alfa glucose e manose, mas não o beta (LI et al., 2011).

A forma pela qual ocorre a interação lectina-carboidrato é através de interações fracas, como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van Der Waals,

semelhantes ao modelo de ajuste induzido, proposto pela ligação enzima-substrato (SINGH; SARATHI, 2012).

As lectinas compõe um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas que variam em tamanho, estrutura, organização molecular, e principalmente, em sítios de ligação a carboidratos (GERLACH et al., 2005), os quais são responsáveis pelo tipo de classificação baseada no monossacarídeo que promove a maior inibição da hemaglutinação e/ou da precipitação de glicoconjugados. Segundo a afinidade por carboidratos, as lectinas podem ser classificadas em D-glucose/D-manose ligantes, D-galactose/N-acetil-Dgalactosamina ligantes, N-acetil-D-glucosamina ligantes, L-fucose ligantes e ácido N-acetilneuramínico ligantes (GEMEINER et al., 2009). As lectinas podem também ser categorizadas de acordo com a sua estrutura em merolectinas, holectinas, quimerolectinas e superlectinas ou ser agrupadas em diferentes famílias, como lectina de leguminosa, proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2, lectinas manose-ligante de monocotiledônea e outras lectinas (LAM; NG, 2011).

As lectinas podem ser isoladas utilizando uma combinação de diferentes técnicas de purificação. Ácidos, solventes orgânicos ou sal pode ser usado para precipitar lectinas, e posteriormente, vários métodos cromatográficos, incluindo cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica e filtração em gel pode ser utilizada no isolamento da lectina (FANG; ZHANG, 2008).

A primeira lectina reconhecida, ricina, foi isolada aproximadamente há um século a partir de sementes de mamona e desde então lectinas tem sido descobertas e usadas para isolar moléculas ligadas a açúcar em sistema biológico (SINGH; SARATHI, 2012). Com a multiplicidade de lectinas disponíveis para isolar moléculas contendo açúcar, seu uso tem sido empregado em muitos estudos como reagentes para purificação e enriquecimento, e também como em combinação para identificar muitos perfis de glicoconjugados (RANGEL et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

Lectinas puras são utilizadas nas matrizes em cromatografias de afinidade e tem recebido atenção particular devido à sua potencial aplicação em análises laboratoriais e clínicas (MEDVEDEV et al. 2012). Elas são imobilizadas em suportes inertes e usadas no isolamento de compostos que contém carboidratos, tais como glicoproteínas e glicolípídeos (CLARK; MAO, 2012). O uso bem documentado da cromatografia de afinidade com lectinas imobilizadas é especialmente útil na purificação de misturas complexas de glicanos com o mesmo tamanho e carga, mas diferentes estruturas (MONZO et al., 2007).

Tem sido demonstrado que o uso de cromatografias de afinidade, utilizando matrizes contendo lectinas imobilizadas, é um método eficaz para fracionar proteínas glicosiladas, melhorando assim os estudos da expressão de glicoproteínas do proteoma do soro, pois o método permite obter frações ricas em glicoproteínas livres de albumina e de outras proteínas séricas abundantes, principalmente não-glicosiladas (DRAKE et al., 2011). Assim, o uso deste tipo de cromatografia permite a separação de todo o proteoma em dois ou mais subproteomas, baseado na glicosilação padrão, melhorando significativamente a resolução durante o processo de separação de proteínas séricas (FANG; ZHANG, 2008).

Cromatografias de afinidade com lectinas imobilizadas em suportes inertes, combinadas com identificação de proteínas por espectrometria de massas é um método consistente, reprodutível e confiável, sendo uma excelente ferramenta para estudos comparativos de soro (DRAKE et al., 2006; ZENG et al., 2010). Sua principal vantagem é que é um método simples e barato para a separação de proteínas com diferentes padrões de glicosilação (RODRÍGUES-PIÑEIRO et al., 2004).

2.7 Lectina de sementes de *Dioclea altíssima* (DAL)

A espécie *Dioclea altíssima* var. megacarpa é uma leguminosa tropical encontrada em florestas subterrâneas e terras alagadas, como no sul das Índias ocidentais, Trindade, Costa Rica, Panamá e os Estados do Amazonas, Ceará e Piauí no Brasil. Taxonomicamente, pertence a subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae, subgênero *Pachylobium*. (BRAGA, 1960)

A DAL foi primeiramente isolada por Moreira et al. (1997) a partir do extrato bruto das sementes de *Dioclea altíssima* e parcialmente caracterizada como uma lectina D-manose/D-glucose ligante, dependente de íons divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}), que em SDS-PAGE apresenta três bandas distintas com massas molares aparentes de 26, 15 e 9 kDa, respectivamente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicação da lectina de sementes de *Dioclea altissima*, *DaL*, em matriz cromatográfica Sepharose 4B® (*DaL*-Sepharose), no fracionamento de glicoproteínas séricas e na pesquisa de potenciais biomarcadores para o câncer de próstata.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o desempenho de matriz cromatográfica contendo a lectina de sementes de *Dioclea altissima* imobilizada em CNBr-Sheparose-4B® (*DaL*-Sepharose), no fracionamento, por cromatografia de afinidade, de glicoproteínas séricas de indivíduos sem doença prostática, pacientes com hiperplasia prostática benigna e pacientes com câncer de próstata;

Avaliar a necessidade de depleção prévia de albumina sérica humana (ASH) e imunoglobulina G (IgG) do soro sanguíneo na identificação de glicoproteínas séricas de indivíduos sem doença prostática, pacientes com hiperplasia prostática benigna e pacientes com câncer de próstata;

Identificar e quantificar, por espectrometria de massas, as glicoproteínas fracionadas pelas matrizes *DaL*-Sepharose, com e sem prévia depleção de ASH e IgG;

Comparar o perfil de glicoproteínas séricas, *DaL*-ligantes de indivíduos sem doença prostática, pacientes com hiperplasia prostática benigna e pacientes com câncer de próstata, a fim de sugerir possíveis candidatos a biomarcadores séricos no câncer de próstata.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População de estudo e aspectos éticos da pesquisa

A população do estudo foi recrutada no serviço ambulatorial do Centro Integrado de Oncologia do Ceará – CRIO e no Hospital Dr. Evandro Ayres de Moura (Frotinha do Antônio Bezerra), Fortaleza – Ceará. Os indivíduos foram abordados após aprovação do projeto em comitê de ética em pesquisa da Universidade de Fortaleza – Coética, sob o número de parecer 283.998 e 427/2009, em anexo.

Participaram da pesquisa os indivíduos que após serem esclarecidos sobre o propósito, riscos e benefícios da mesma concordaram de livre e espontânea vontade, em participar como sujeitos na pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Pós-Esclarecido.

4.2 Critério de inclusão

Foram incluídos indivíduos atendidos pelo serviço de urologia, com o propósito de realizar triagem para o câncer de próstata, que inclui indivíduos que são ou não encaminhados a biopsia de tecido prostático, e também pacientes com diagnóstico de câncer de próstata.

4.3 Critérios de exclusão

Após a análise dos prontuários e avaliação clínica e laboratorial, os pacientes foram distribuídos em grupos. Foram excluídos indivíduos que não possuíam diagnóstico conclusivo, com doença prostática diferente de câncer de próstata ou hiperplasia prostática Benigna, com alguma neoplasia associada, e ainda quem já havia iniciado alguma forma de tratamento para o tumor.

4.4 Reagentes

Foram utilizadas sementes de *Dioclea altissima* var. megacarpa, coletadas na região metropolitana de Fortaleza no estado do Ceará e cuja exsicata encontrava-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Coomassie Brilhante Blue G-250, acrilamida, bis-acrilamida foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil. Ditioneitol (DTT), ácido etileno diaminotetracético (EDTA), ácido trifluoracético (TFA) iodoacetamida, dodecil sulfato de sódio (SDS) e a matriz de Sepharose™ 4B ativada com brometo de cianogênio foram obtidos da GE HealthCare do Brasil. RapiGest SF®, álcool desidrogenase e a enzima tripsina foram obtidos da Waters. Os demais reagentes utilizados, de grau analítico, foram obtidos, comercialmente, de diferentes fornecedores.

4.5 Coleta do sangue e obtenção do soro

O sangue foi coletado por punção venosa periférica, em tubos BD SST 2 Advance® (Vacutainer) com gel separador contendo ativador de coágulo e vácuo pré-definido para aspiração de 5,0 mL, de acordo com as recomendações adotadas pela Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (ANDRIOLO et al., 2012) e da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial; em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 15 minutos (Centrifuga Eppendorf 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e então o sobrenadante, soro, transferido para microtubos (Eppendorf).

As amostras de soro foram codificadas, para evitar qualquer interferência consciente ou não nos resultados, e armazenados em ultrafrizer (-70 ° C) até o momento do uso.

4.6 Dosagem de PSA sorológico total (PSA-st) e diagnóstico patológico

O PSA-st foi mensurado pelo método quimioluminescente no AxSYM analyzer (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). O diagnóstico de CaP e HPB foi baseado na análise histopatológica do tecido prostático. A mensuração de PSA-st e o resultado histopatológico foram de responsabilidade do NUBEX e do CRIO, respectivamente.

4.7 Obtenção da lectina de *Dioclea altissima* –DaL

A DaL foi obtida de sementes de *Dioclea altissima* segundo metodologia descrita por Moreira (1997), com modificações. Resumidamente, as sementes foram lavadas em água corrente e hipoclorito de sódio (2,5 de cloro ativo), destegumentadas e, após secagem à temperatura ambiente, os cotilédones foram triturados e pulverizados em moinho de lâminas.

O pó resultante (farinha) obtido foi submetido a extração com solução de NaCl 0,15 M, por 3 horas sob agitação contínua, e então centrifugado a 10 000 x g por 30 minutos, a 4 °C e o sobrenadante denominado de Extrato Total.

Ao Extrato Total foi adicionada solução de CaCl₂ e MnCl₂, em quantidade suficiente para atingir uma concentração final de 5 mM, o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas e o sobrenadante submetido a cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G50 equilibrada com solução de NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ e MnCl₂ 5 mM. Após eluição do material não retido, com a solução de equilíbrio, a lectina foi eluída com tampão glicina-HCl, 0,15 M pH 2,6 em NaCl 0,15 M. A lectina pura foi dialisada contra H₂O destilada (1:50 v/v), com trocas de 4 em 4 horas por 48 horas e liofilizada.

A *DaL* foi avaliada quanto a atividade por ensaio de hemaglutinação de acordo com metodologia descrita por (MOREIRA; PERRONE, 1977).

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A pureza da lectina foi avaliada segundo o perfil eletroforético. Desta maneira, a fração retida em matriz Sephadex-G50 foi analisada segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). O material submetido foi dissolvido em tampão de amostra Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, acrescido de SDS 4% e Coomassie Brilliant Blue G-250 0,01% e centrifugadas a 10.000 x g, por 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (HOEFER SE 250, GE HealthCare, Uppsala, Suécia), sendo os géis submetidos a uma voltagem de 200 V e amperagem de 20 mA. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue. Como marcador de massa molecular foi utilizado o kit LMW-SDS (GE HealthCare, Uppsala, Suécia). A análise do perfil eletroforético foi baseada na clara visualização e distinção das bandas proteicas formadas.

4.9 Preparação da matriz cromatográfica DaL-Sepharose

A DaL foi ligada covalentemente a matriz de Sepharose™ 4B ativada com brometo de cianogênio. Conforme instruções do fabricante GE health care, a matriz, em pó, foi lavada com solução de HCl 1 mM para preservar os grupos reacionais, seguida de uma lavagem com tampão de acoplamento (NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 contendo NaCl 0,5 M) para elevar e manter o

pH básico. Posteriormente, a DaL em presença do açúcar ligante (D-manose, 0,2M em NaCl 0,5) foi dissolvida no tampão de acoplamento e a mistura foi incubada com a matriz a temperatura ambiente e leve agitação por uma hora. Para remoção do excesso de DaL, a matriz de DaL-Sepharose foi lavada com tampão de acoplamento. Em seguida, a DaL-Sepharose foi deixada em contato com o tampão *Tris*-HCl 0,1M pH 8 por 2 horas, para remoção dos grupos reacionais remanescentes. Por último, a *DaL*-Sepharose foi lavada com três ciclos de alternância de pH, e cada ciclo constituiu na lavagem com ácido acético 0,1M pH 4 contendo NaCl 0,5 M seguida pela lavagem com *Tris*-HCl 0,1 M pH 8 em NaCl 0,5 M.

A DaL-Sepharose em NaCl 0,15 M foi transferida para a coluna XK16 (GE healthCare) e alimentada a um fluxo de 0,3mL/min. Após o empacotamento da matriz os adaptadores da coluna foram ajustados e o sistema estava pronto para o uso. O volume final de matriz foi estimado em 5 mL após ser calculado com base na altura e diâmetro da coluna.

4.10 Depleção de albumina e imunoglobulina de soro sanguíneo

Albumina sérica humana (ASH) e Imunoglobulina G (IgG) foram removidas do soro sanguíneo por cromatografia de afinidade realizada em coluna Hi-trap Albumin IgG depletion™ (GE Healthcare) acoplada ao sistema automatizado de FPLC ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare).

Inicialmente, as amostras de soro sanguíneo foram descongeladas, centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 8 °C e filtradas em membrana 0,22 µM (Vertipure™ PVDF syringe filters, Veritical). Em seguida as amostras foram injetadas no sistema. 150 µL de amostra foram aplicadas a matriz previamente equilibrada com 5 mL de tampão *Tris*-HCl 20 mM pH 7,4 em NaCl 0,15 M a um fluxo constante de 1 mL/min. Em seguida a matriz foi eluída com 8 mL do mesmo tampão de equilíbrio. O material retido foi eluído com 7 mL de tampão Glicina-HCl 0,1 M pH 2,6 em NaCl 0,15 M, nas mesmas condições, com eluição das proteínas acompanhada por absorbância a 280 e 216 nm.

A cromatografia de afinidade para remoção de ASH e IgG foi realizada três vezes para cada amostra e com isso foi obtido, aproximadamente, 3 mL de soro sanguíneo livre de ASH e IgG que foram reunidos e concentrados em speed vácuo até um volume final de 1 mL.

4.11 Cromatografia de afinidade em matriz cromatográfica DaL-Sepharose

A fração de soro sanguíneo livre de ASH e IgG foi submetida a cromatografia de afinidade em matriz de *DaL*-Sephacrose acoplada a um sistema de FPLC ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare). As amostras (fração de soro sanguíneo livre de ASH e IgG) foram descongeladas, centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 8 °C e filtradas em membrana 0,22 µM (Vertipure™ PVDF syringe filters, Veritical). Em seguida as amostras manualmente e individualmente foram injetadas ao sistema. A matriz foi alimentada com 17,5 mL de tampão A (Tris-HCl 20mM pH 7,4 em NaCl 0,15M com Ca²⁺ Mn²⁺ 5 mM) a um fluxo constante de 1mL/min até a injeção de 500 µL de amostra, quando prosseguiu a lavagem da matriz com 25 mL de tampão A seguida de 20 mL de tampão B (Manose 0,2 M e Tris-HCl 20mM pH 7,4 em NaCl 0,15 M), nas mesmas condições, com eluição das proteínas acompanhada por absorbância a 280 e 260nm.

Amostra de soro sanguíneo total foi submetida à cromatografia de afinidade em matriz de *DaL*-Sephacrose. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min, a 8 °C, filtradas em membrana Vertipure™ PVDF 0,22 µM (syringe filters, Veritical) e aplicadas individualmente à coluna. A matriz foi alimentada com tampão Tris-HCl 20mM pH 7,4 em NaCl 0,15M com Ca²⁺ Mn²⁺ 5 mM até a detecção de absorbância zero, então o tampão Tris-HCl 20mM pH 7,4 em NaCl 0,15 M contendo Manose 0,2 M foi aplicado a matriz para eluição da fração de glicoproteínas pelas quais a lectina imobilizada tem afinidade. As cromatografias foram realizadas a um fluxo constante de 0,5 mL/min mantido por bomba peristáltica Pump P-1® (Amersham Biosciences), com coletas de 2 mL por tubo, enquanto a eluição das proteínas foi acompanhada por absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Ultrospec 1100 pro® (Amersham Biosciences).

As frações cromatográficas foram concentradas e dialisadas utilizando o sistema de filtro Centricom 10 (MILLIPORE, Centrifugal Filter Devices), segundo recomendações do fabricante. Posteriormente, o teor proteico foi quantificado por dropVue (GE HealthCare) através da avaliação utilizando o método protein mg/mL.

4.12 Espectrometria de massas

As amostras contendo 50 µg de proteína foram submetidas ao processo de digestão com tripsina. O processo teve início com a adição de 60 µL de NH₄HCO₃ 50 mM e 25 µL da solução de RapiGest SF® 0,2% (Waters, Co.) em microtubo (Eppendorff) contendo as glicoproteínas. Após agitação vigorosa em vórtex por 1 minuto, foi incubado a 80°C por 15

minutos e na sequência, centrifugado a 12.000 x g, 6 °C por 60 segundos, em seguida foi adicionado 2,5 µL de DTT 10 mM, agitado vigorosamente em vórtex por 1 minuto e incubado a 60°C por 30 minutos. Após este período, o microtubo foi retirado do bloco de aquecimento, resfriado a temperatura ambiente e novamente centrifugado a 12.000 x g, 6 °C, por 60 segundos. Na sequência, foi adicionado 2,5 µL Iodoacetamida 300 mM, agitado vigorosamente em vórtex por 1 minuto e deixado em repouso, sob proteção da luz, à temperatura ambiente, durante 30 minutos, em seguida, foram adicionados 10 µL da solução de Tripsina Promega® (Waters, Co.), agitado vigorosamente durante 1 minuto em vórtex e incubado a 37 °C, por 12 horas. Dando continuidade ao processo de digestão, no dia seguinte, foram adicionados 10 µL de ácido trifluoracético 5%, agitado vigorosamente por 1 minuto em vórtex e em seguida as amostras foram, novamente, incubadas a 37°C, durante 90 minutos e então centrifugadas a 18.500 x g, 6 °C, por 60 minutos. O sobrenadante foi transferido para *vial*, onde foi adicionado 5 µL de padrão interno, álcool desidrogenase (ADH) 50fmol, número de acesso P00330 no SwissProt, (Waters, Co.) e 85 µL da solução Acetonitrila 3% com ácido fórmico 0,1%. As concentrações finais de glicoproteínas e ADH ficaram estimadas em 250 ng/µL e 25 fmol/µL, respectivamente e o volume final no microtubo em 200 µL.

Os experimentos quantitativo e qualitativo das amostras digeridas foram realizados em espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters, Co.), acoplado a uma coluna de fase reversa nanoACQUITY C18 UPLC BEH com 1,7 µm, 100 mm × 10 centímetros, em conjunto com a pré-coluna SCX 5 mm, 180 milímetros x 23 milímetros. A cromatografia de fase reversa dos peptídeos foi realizada com um gradiente de 0 até 40 % (v/v) de acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico, mantido a um fluxo de 600nL/min por 100 minutos

Para todas as medições, o espectrômetro de massas foi operado no modo de 'V', com uma potência de resolução de pelo menos 10.000. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização por electrospray no modo ESI(+) através da fonte NanoLockSpray. O canal de coleta da amostra analisada foi fechado a cada 30s para passagem do íon de referência. O espectrômetro de massa foi calibrado com uma solução de GFP (200 fmol / ml) injetado através do spray de referência da fonte NanoLockSpray. O íon duplamente carregado ($[M + 2H]^{2+}$) foi usado para a calibração de um ponto inicial (L_{teff}), e a fragmentação iônica de GFP em MS / MS foi usada para obter a calibração final do equipamento.

Dados de varredura independente (MS^E) foram realizados com um espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK), programado para alternar automaticamente entre MS padrão (3 eV) e elevar energia de colisão MS^E (12-50 eV) na célula de colisão com

gás argônio. A célula de colisão foi ajustada para 1 eV, usando um tempo de varredura de 1,0 s, para as acelerações de alta e baixa energia de colisão, com tempo de voo (TOF-oa) MSE de m/z 50-3000. A RF offset (perfil de MS) foi ajustada de forma que os dados de LC / MS foram efetivamente adquiridos de m/z 300-3000, o que garantiu que qualquer m/z menor que 300 surtem de dissociações na célula de colisão.

Para um processamento de espectros e busca no banco de dados adequados, foi utilizado o pacote *Protein Lynx Global Server* (PLGs) v.2.4. contendo o programa *Expression*^E v.2.4. O banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot 57.1 foi utilizado e as condições de pesquisa foram baseadas na taxonomia [Humano (*Homo sapiens*)].

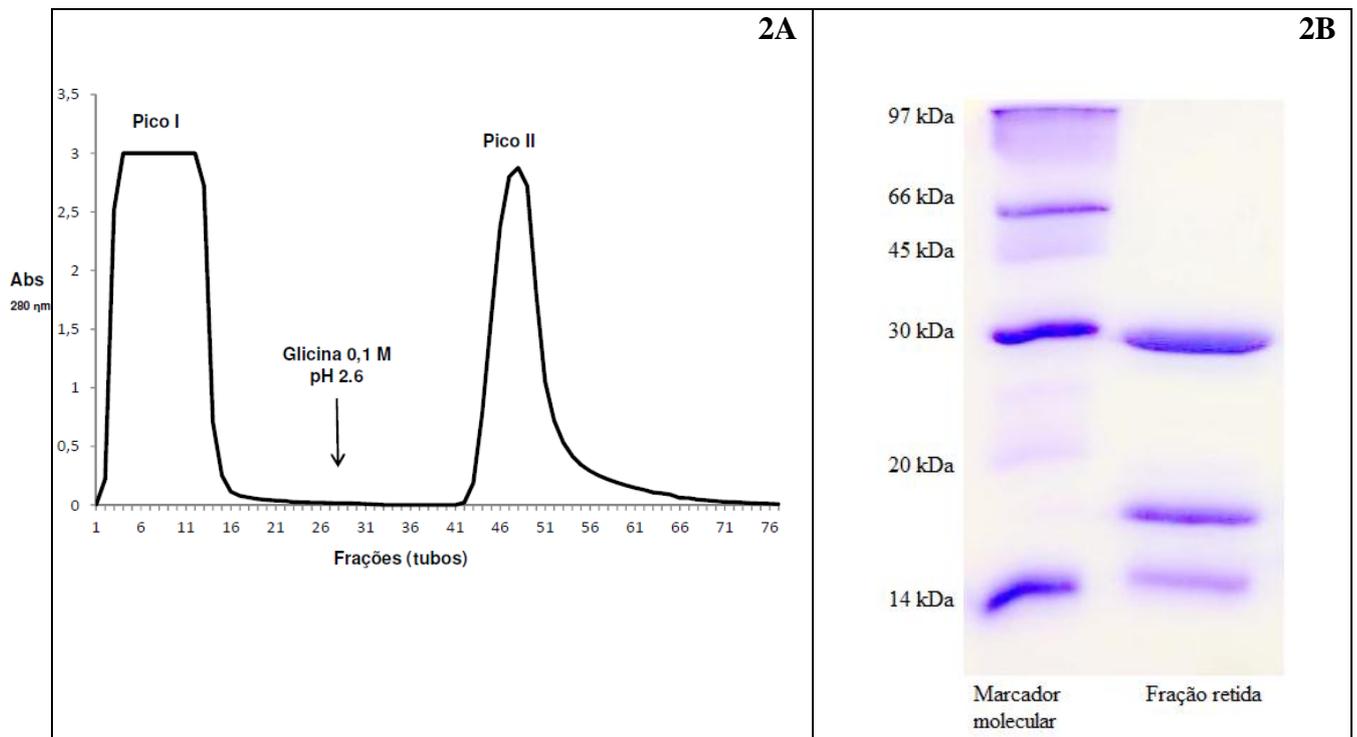
As proteínas identificadas foram organizadas pelo PLGs em uma lista que corresponde a uma proteína única para ambas as condições (estudo ou grupo controle), e uma razão logarítmica entre os diferentes grupos foi plotada em um gráfico de dispersão para visualizar diferenças entre os grupos.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Isolamento da DaL e imobilização da lectina em matriz cromatográfica

O Extrato Total de sementes de *Dioclea altissima* foi submetido à cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex-G50, com a obtenção de dois picos cromatográficos (figura 2A). A fração não retida (pico 1) contém as proteínas que não possuem afinidade com a matriz cromatográfica, enquanto a *DaL*, lectina ligante a manose e glucose que interagiu com a matriz, foi obtida na fração retida (pico 2). A atividade hemaglutinante contra hemácias humanas do tipo sanguíneo O foi observada para o pico 2, sendo esta atividade interpretada como indicativo da presença da lectina em questão.

Figura 2 - Isolamento da lectina das sementes de *Dioclea altissima* (DaL). 2A - Perfil cromatográfico em coluna de Sephadex G50. 2B - Perfil eletroforético da fração retida, em coluna de sephadex G50, em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), revelando a presença das três bandas características da DaL.



Fonte: produção própria.

O pico 2, obtido da cromatografia de afinidade em Sepharose-G50, foi submetido à eletroforese PAGE-SDS para constatação da pureza. No gel de poliacrilamida podemos

observar bandas com massas moleculares aparentes em torno de 26, 15 e 9 kDa (figura 2B). Tal perfil corresponde ao mencionado na literatura para DaL (MOREIRA et al., 1997).

A DaL foi primeiramente isolada e purificada por uma combinação de precipitação salina com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex G-50® por Moreira et al. (1997). Contudo, neste estudo, o isolamento e a purificação da *DaL* foi realizado aplicando o extrato total diretamente na matriz de Sephadex G-50® (Sigma), sem precipitação prévia com sulfato de amônio. Com a eliminação desta etapa o processo foi menos laborioso, sem prejuízo do rendimento. A cromatografia de afinidade, sem previa precipitação salina do extrato total de sementes, também foi utilizada como passo metodológico no isolamento e purificação de outras lectinas do gênero *Dioclea* (RANGEL et al., 2011; CAVADA et al. 1996).

A lectina, após diálise e liofilização, foi ligada covalentemente a uma matriz de sepharose™ 4B ativada com brometo de cianogênio. A reação ocorreu na presença de solução contendo manose, para proteger os sítios de ligação a carboidratos da lectina. A quantidade de DaL imobilizada foi estimada por absorvância em 280 nm, e as verificações foram realizadas, inicialmente, da solução contendo a lectina, e após a imobilização, quando o excesso de ligante que foi removido da coluna por lavagem com tampão. O resultado sugere que, aproximadamente, 70% de lectina utilizada foram ligadas covalentemente à coluna, correspondendo a 180 mg de DaL por mL de matriz cromatográfica.

5.2 Caracterização dos sujeitos do estudo

Os sujeitos da pesquisa foram recrutados, de acordo com os critérios de inclusão, no serviço ambulatorial do CRIO e no Hospital Dr. Evandro Ayres de Moura. Após avaliação dos critérios de exclusão eles foram distribuídos em grupos (tabela 1). Indivíduos que gozavam de bom estado de saúde e boas condições nutricionais, além de não apresentar doença prostática, foram agrupados com a denominação Controle (N=9). A média de idade para os indivíduos desse grupo foi de 54,4 anos e os valores de PSA-st não foram superior a 2,3 ng/ mL, com mediana de 0,5.

Tabela 1 - Caracterização dos sujeitos participantes do estudo.

Grupo	Número de indivíduos	Diagnóstico	Idade		PSA-st (ng/mL)
			Média de idade	Desvio Padrão	Mediana
Controle	9	Ausência de doença prostática	55,4	5,6	0,5 (0,06- 2,30)
HPB	11	Hiperplasia prostática benigna	70,3	9,5	5,9 (0,77 - 7,12)
CaP	9	Câncer de próstata	73,2	8,2	100 (19 - 274)

O diagnóstico dos pacientes foi concluído com o estudo histopatológico do tecido prostático, e desta forma os sujeitos foram divididos em: pacientes com Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e Câncer de Próstata (CaP). Entre os indivíduos com HPB (N=11) a média de idade foi de 70,3 anos com mediana de PSA-st 5,9 ng/mL; no grupo de sujeitos com CaP (N=9) a média de idade foi de 73,2 anos e a mediana de PSA-st 100 ng/mL.

A decisão por incluir apenas os pacientes que não haviam iniciado nenhuma forma de tratamento, para a neoplasia, permitiu a seleção de uma população mais restrita, pois era necessário abordar estes pacientes logo no início da doença. Contudo, a seleção mais criteriosa garante um menor número vícios aos resultados. Além disso, incluímos um grupo de pacientes composto por indivíduos com HPB. Segundo Siwy e colaboradores (2011), para a pesquisa de biomarcadores adequados, controles positivos e negativos devem ser definidos. A escolha de controles é muitas vezes não trivial, por exemplo, para definição de biomarcadores específicos, para uma doença em estudo, controles com estágio fisiológicos relacionados ou semelhantes devem ser incluídos.

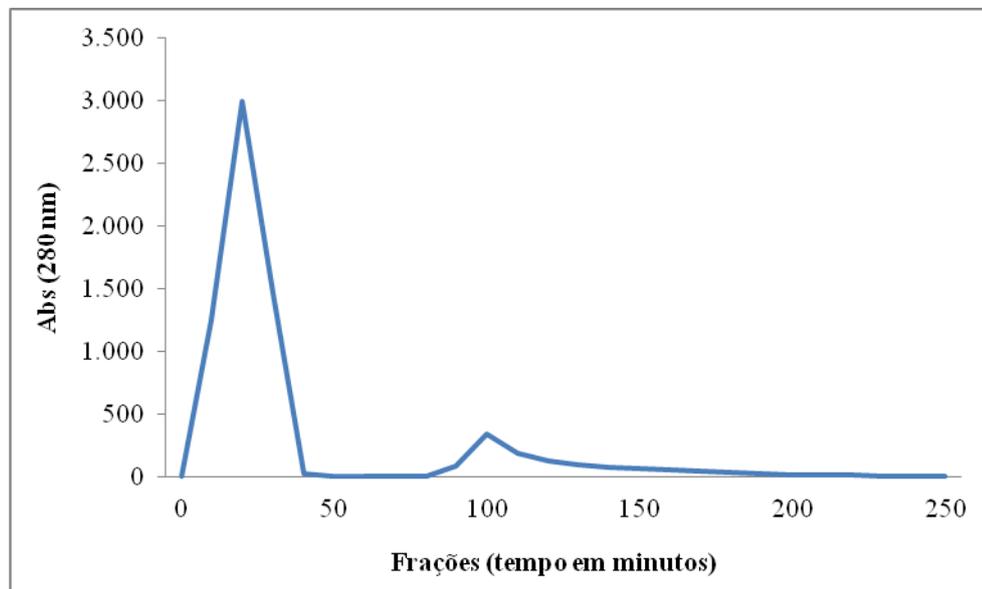
5.3 Fracionamento e identificação de proteínas e glicoproteínas do soro sanguíneo

5.3.1 Glicoproteínas sorológicas isoladas em matriz DaL-Sepharose

5.3.1.1 Panorama geral do fracionamento e identificação das glicoproteínas

Uma representação do perfil cromatográfico obtido, para as amostras de soro, quando aplicada em matriz de DaL-Sepharose, pode ser observada na figura 3. O cromatograma apresenta dois picos, o pico 1 ou fração não retida (FNR), composto por proteínas que não ficaram adsorvidas a matriz, e um pico 2 ou fração retida (FR), representada por glicoproteínas que interagiram com a lectina presente na matriz cromatográfica. As diferenças entre o perfil cromatográfico para pacientes de grupos diferentes não foi significativamente maior quando comparado com pacientes do mesmo grupo.

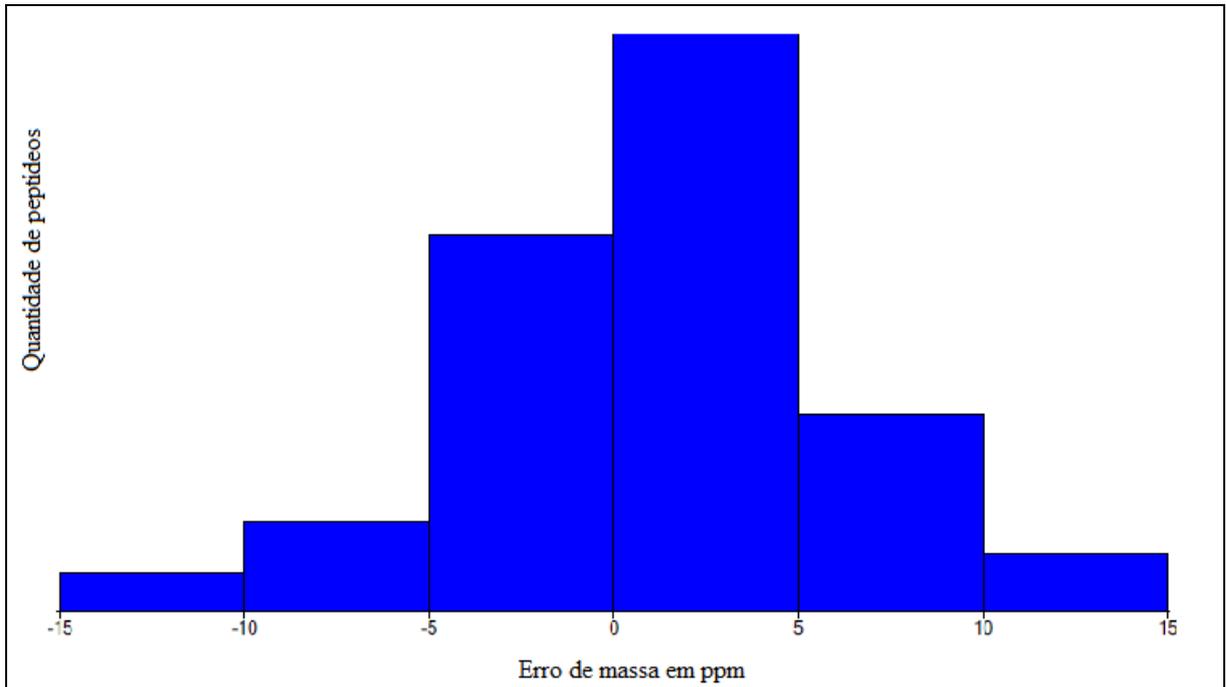
Figura 3 - Perfil cromatográfico das glicoproteínas sorológicas fracionadas em matriz de *DaL*-Sepharose.



Fonte: produção própria

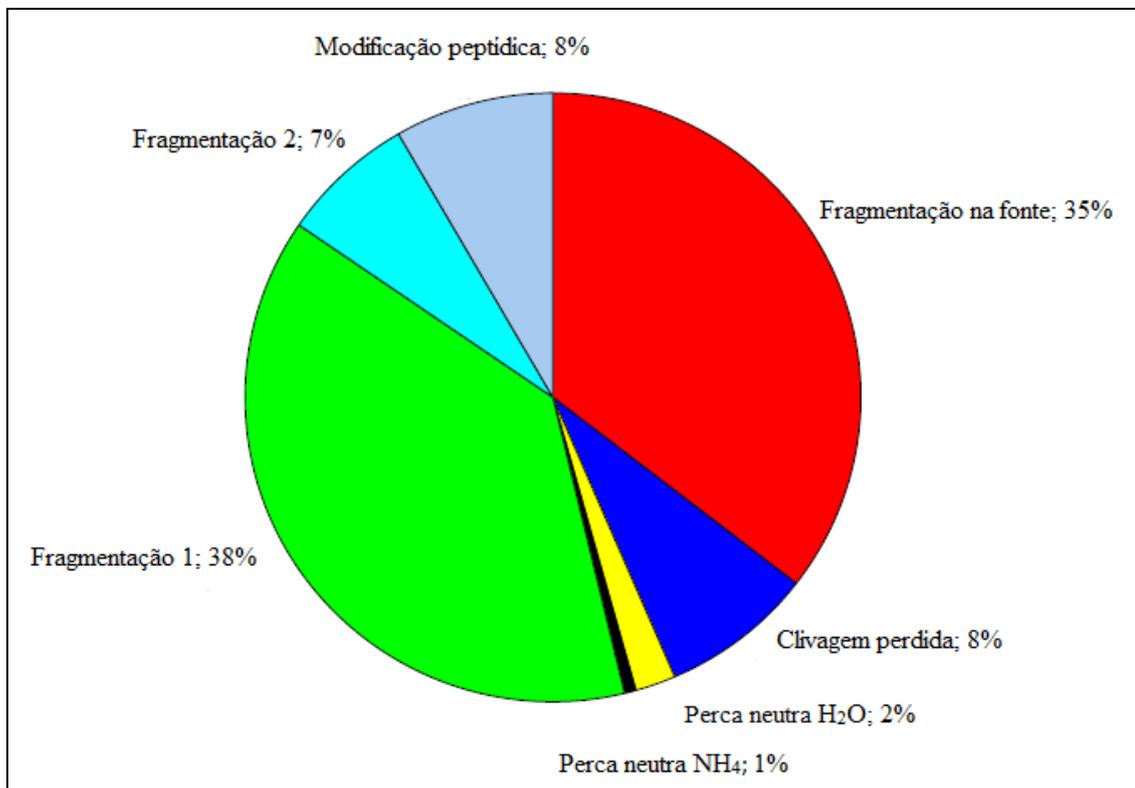
A FR proveniente da cromatografia de soro total foi analisada por EM após diálise e concentração. Para identificação das proteínas foi utilizado um espectrômetro de massas nanoUPLC-MS com aquisição MS^E. As amostras foram analisadas em triplicata nas mesmas condições. No total foram identificados, 49.701 peptídeos com um erro de massa de 4 ppm, que corresponde a 65,16 % do total de peptídeos identificados, e mais de 90% dos peptídeos com um erro de massa menor que 15 ppm (figura 4). Quanto à qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos, 35 % foram fragmentados na fonte, enquanto 8 % correspondem à clivagem perdida (figura 5).

Figura 4 - Distribuição dos fragmentos de massa e massa exata medida em ppm, para identificação de amostras da FR em matriz de *DaL*-Sephrose.



Fonte: produção própria

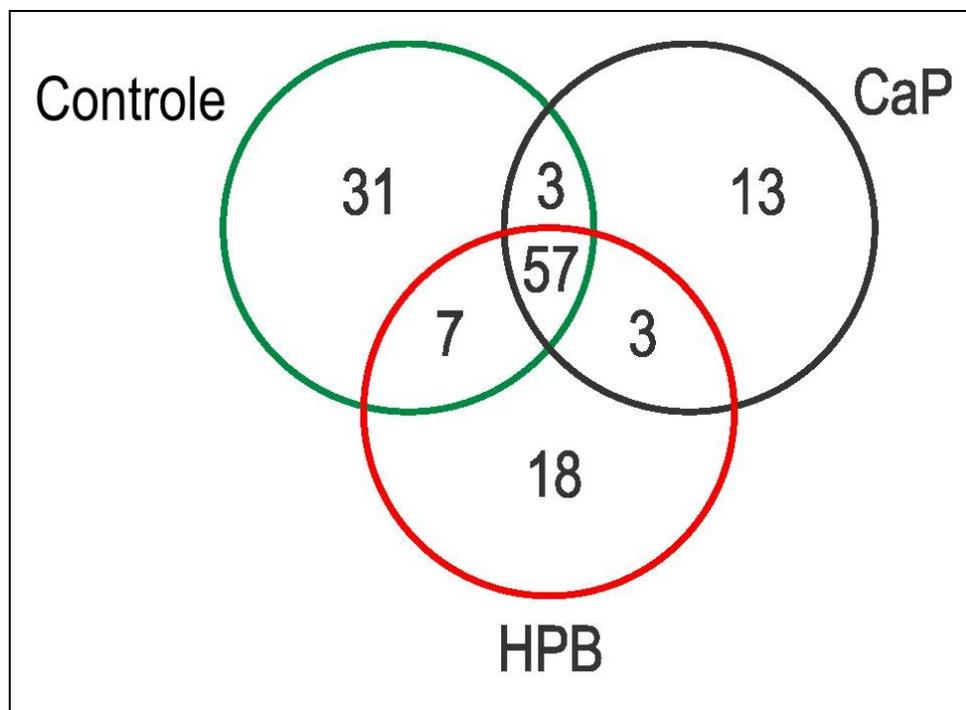
Figura 5 - Distribuição que avalia a fragmentação e digestão dos peptídeos identificados por espectrometria de massas. Amostra da FR em matriz de *DaL*-Sephrose.



Fonte: produção própria.

De maneira geral, foram identificadas 196 glicoproteínas com uma cobertura de sequencia maior que 80 %. Para identificação das proteínas diferentemente expressas entre os grupos foi utilizando o sistema de quantificação Expression High Definition Proteomics (Waters, UK). Após análise restaram 132 glicoproteínas (APÊNDICE A), destas, 57 foram observadas nos três grupos, 3 no grupo controle e no CaP, 3 em CaP e HPB, e 7 no HPB e controle. As glicoproteínas observadas em apenas um grupo foram denominadas únicas, e podemos observar 31 no grupo Controle, 18 no grupo HPB e 13 no grupo CaP (figura 6).

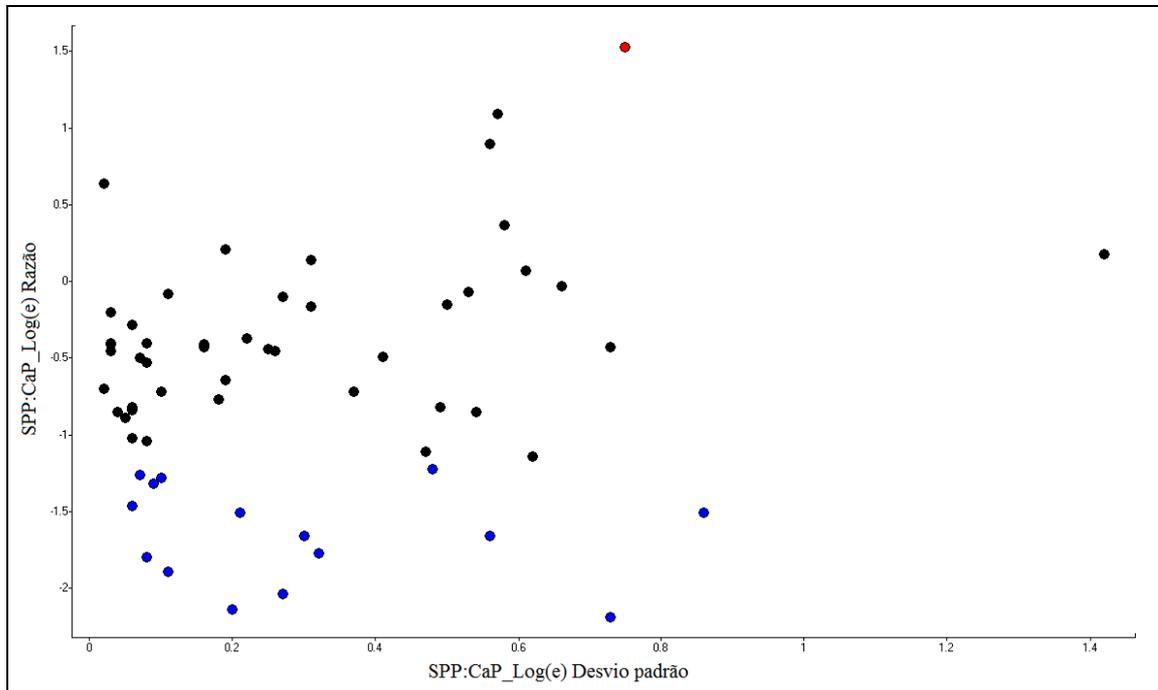
Figura 6 – Diagrama de Venn mostrando a distribuição das glicoproteínas fracionadas pela matriz *Dal*-Sephrose. SDP: sem doença prostática; HPB: hiperplasia prostática benigna; CaP: câncer de próstata.



Fonte: produção própria.

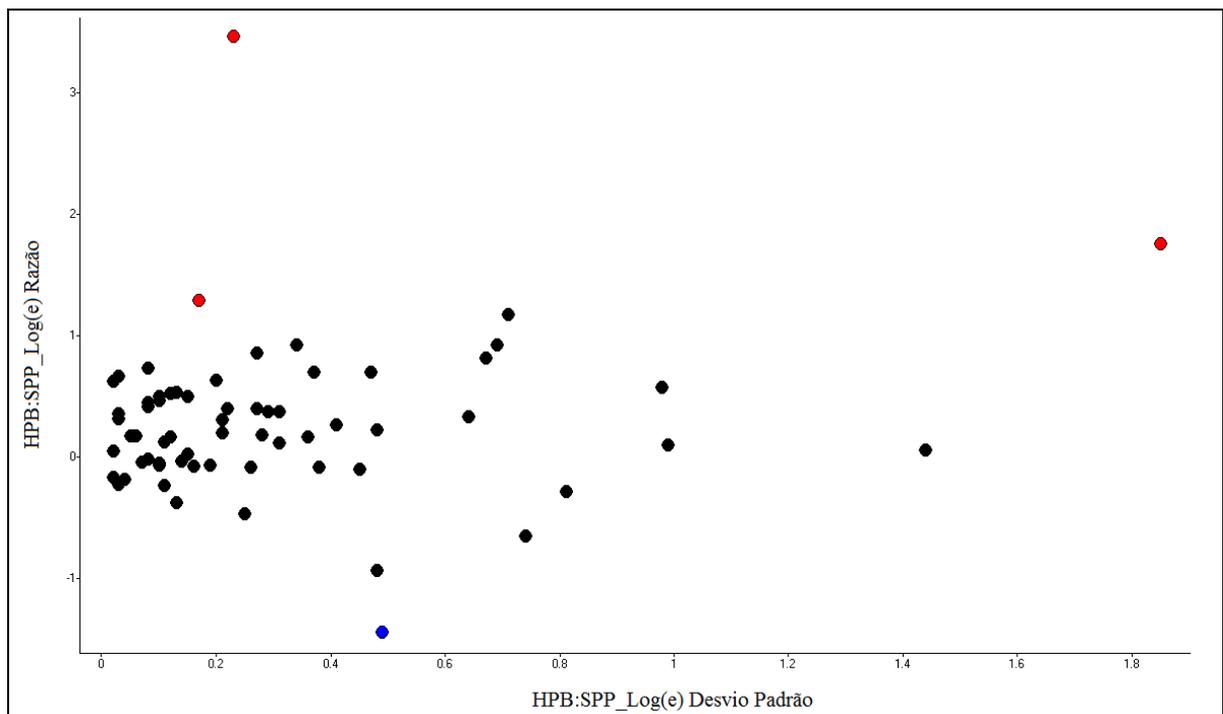
As proteínas com expressão diferencial que apresentaram uma razão de ln maior que 1,2 foram considerados *up* ou *down* reguladas em relação a doença em estudo. Como podemos observar na figura 7, quando comparados a razão entre Controle e CaP, é possível identificar 1 proteína down e 15 up regulada no câncer, e para a razão entre HPB e controle (figura 8) o número de glicoproteínas up é 3 e down é 1 no HPB.

Figura 7 - Expressão diferencial de glicoproteínas isoladas por cromatografia em matriz de *DaL*-Sephrose. Demonstração entre a razão ln maior que 1,2 para a relação controle / CaP . Glicoproteínas *up* reguladas são marcadas na cor vermelha enquanto as *down* reguladas são representadas pela cor azul.



Fonte: produção própria.

Figura 8 - Expressão diferencial de glicoproteínas isoladas por cromatografia em matriz de *DaL*-Sephrose. Demonstração entre a razão ln maior que 1,2 para a relação HPB / controle. Glicoproteínas *up* reguladas são marcadas na cor vermelha enquanto as *down* reguladas são representadas pela cor azul.

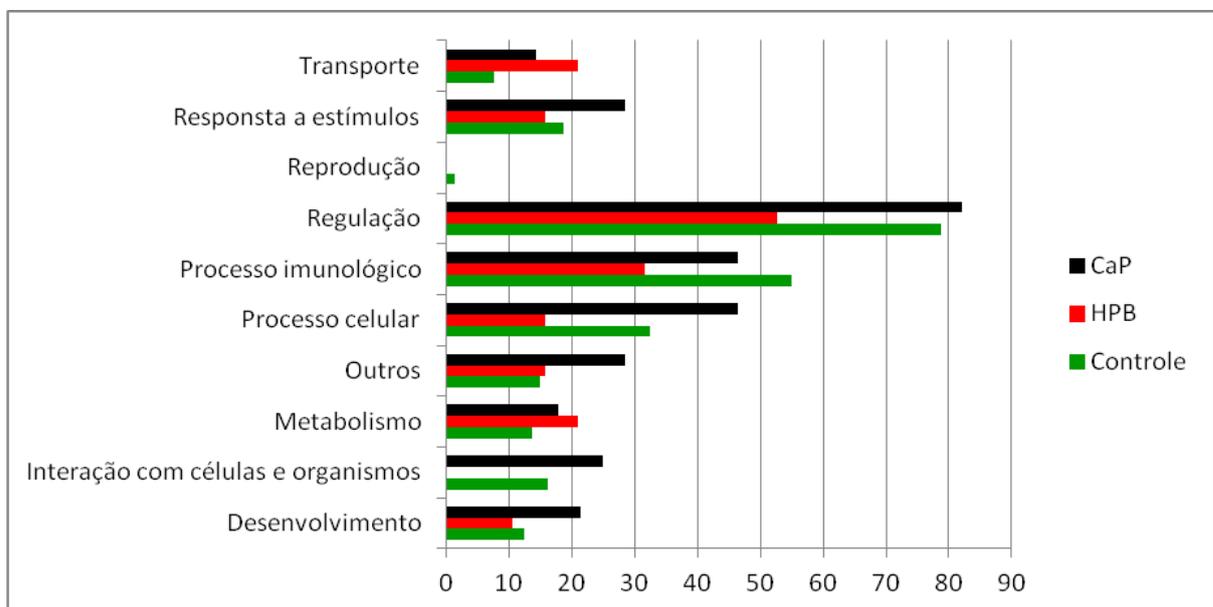


Fonte: produção própria

Nos grupos com doença prostática, HPB e CaP, foram consideradas as proteínas “únicas”, assim como *up* e *down* para estas condições, enquanto o grupo controle foi composto por proteínas “únicas” somadas às demais proteínas que não cumpriram o critério estabelecido para serem consideradas *up* ou *down* reguladas. Desta forma, as glicoproteínas foram catalogadas de acordo com sua função molecular, processo biológico e localização, para cada grupo de estudo. A classificação foi realizada utilizando UNIPROT como banco de dados, e para melhor apresentação dos dados, os valores absolutos foram expressos na forma de porcentagem.

Em relação ao processo biológico, no grupo controle, 12,5 % foi relacionada ao desenvolvimento, 16,25 % a interação com células e organismos, 13,75 % ao metabolismo, 32,5 % a processos celulares, 55 % a processo imunológico, 78,75 % a regulação, 1,25 % reprodução, 18,75 % a resposta a estímulos, 7,5 % a transporte e 15 % a outros processos biológicos (figura 9).

Figura 9 – Glicoproteínas da fração retida pela matriz de *DaL*-Sephrose (FR), agrupadas de acordo com o processo biológico, após serem classificadas de acordo com o grupo de estudo a qual pertencem.

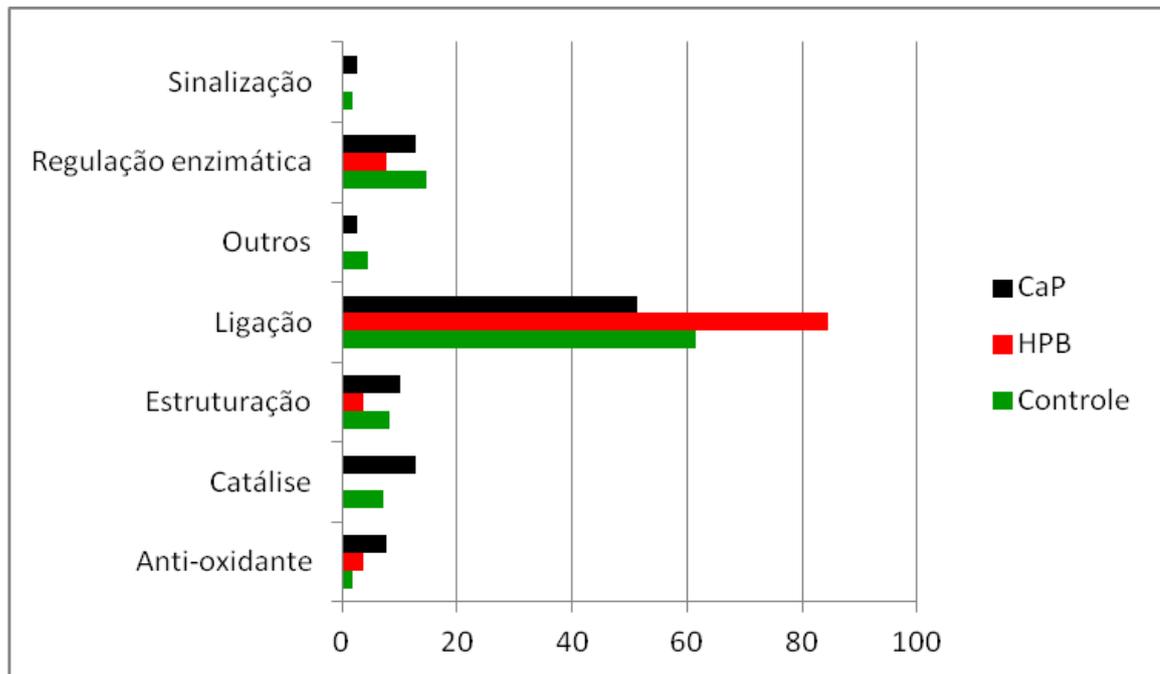


Fonte: produção própria.

Na distribuição baseada na função molecular, para o grupo controle, temos que 1,8 % das glicoproteínas desempenhavam ação antioxidante, 7,33 % catálise, 8,25 % estruturação,

61,5 % ligação, 14,7 % regulação enzimática, 1,8 % sinalização e 4,6 % executavam outras funções (figura 10).

Figura 10 - Glicoproteínas da FR pela matriz de *DaL*-Sepharse, agrupadas de acordo com a função biológica, após serem classificadas de acordo com o grupo de estudo a qual pertencem.



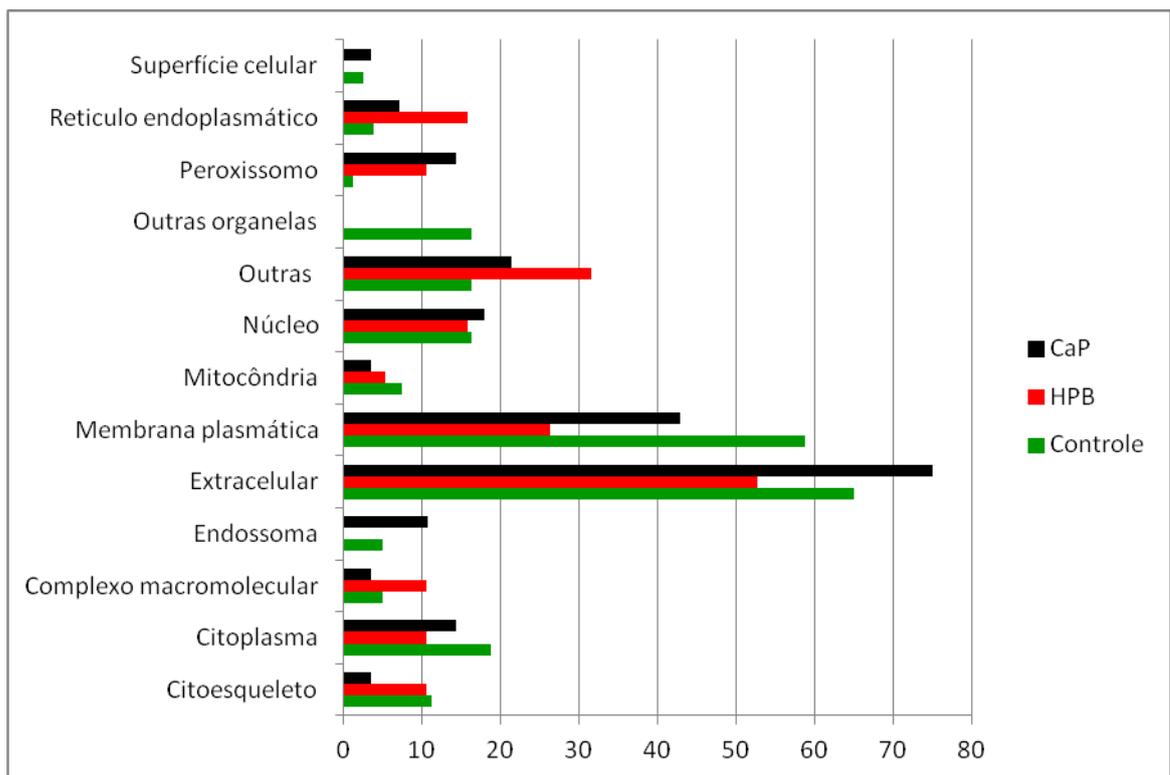
Fonte: produção própria.

Em uma análise comparativa geral entre as três condições estudadas (Figura 9 e 10), podemos observar discreto aumento na diversidade de funções moleculares e processos biológicos no grupo controle. É sutil uma maior porcentagem de glicoproteínas relacionadas ao metabolismo e transporte, no HPB, porém não há divergência em termos de valores absolutos. Com relação à expressividade de proteínas relacionadas a processo imunológico, estas, apresentam redução no grupo com CaP e uma maior redução no HPB quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, com relação ao desenvolvimento, interação com células e organismos, processo celular e resposta estímulos o valor percentual de glicoproteínas é consideravelmente maior no CaP em relação ao grupo controle. Na distribuição das glicoproteínas quanto à função molecular podemos observar uma relativa diminuição percentual nas glicoproteínas referentes à estruturação no grupo com doença prostática benigna.

Para a fração de glicoproteínas sorológicas estudadas, podemos dizer que estes valores são consistentes com alterações esperadas no câncer e na hiperplasia da próstata. Tendo em vista que no câncer há aumento da sinalização, desenvolvimento, e interação com outras células por causa de atividades como angiogênese e também perda da estrutura celular e tecidual (ALVAREZ-CUBERO et al., 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

A figura 11 representa a distribuição das glicoproteínas, identificadas para cada grupo, de acordo com a localização. O comportamento mais predominante foi o extracelular, uma vez que as glicoproteínas foram isoladas da corrente sanguínea, mais precisamente no soro, sendo identificadas 52 glicoproteínas nesta classificação, o que corresponde a 65 % de todas as glicoproteínas no grupo controle.

Figura 11 - Glicoproteínas da FR pela matriz de *DaL*-Sepharose, agrupadas de acordo com a localização, após serem classificadas de acordo com o grupo de estudo a qual pertencem.



Fonte: produção própria.

Ao observarmos as colunas (figura 11) para o retículo endoplasmático, peroxissomo e endossoma percebe-se um ligeiro aumento percentual das glicoproteínas nestas localizações subcelulares nos grupos com HPB e / ou CaP, e redução de proteínas do citoesqueleto e

membrana plasmática no grupo com CaP, o que pode reforçar a perda da estrutura celular e tecidual.

Além de mudanças em proteínas que são produzidas na célula e exportadas para o soro sanguíneo, a invasão tumoral e a destruição da arquitetura do tecido causam o extravasamento de proteínas, que normalmente são intracelulares, para tecidos linfáticos, sangue e outros fluidos corporais (PIN et al., 2013). A escolha de soro ou plasma sanguíneo na elaboração de um teste laboratorial confere uma coleta de material pouco invasiva, rápida e de baixo custo (KOČEVAR et al., 2013).

5.3.1.2 Perfil de glicoproteínas ligantes DaL-Sepharose do grupo controle

Metodologias para enriquecimento de glicoproteínas tem sido empregadas antes da identificação por EM em estudos proteômicos (DRAKE et al., 2011). Uma estratégia bastante utilizada é a cromatografia de lectina-afinidade, uma forma de cromatografia em que a lectina está imobilizada em uma matriz inerte, e assim, as glicoproteínas são adsorvidas pela afinidade com a lectina (CLARK; MAO, 2012). Desta forma, a cromatografia de lectina-afinidade é útil para o isolamento de uma quantidade extremamente seletiva de glicoproteínas, como subgrupos glicoproteômicos de amostras de soro sanguíneo.

A busca no banco de dados UNIPROT mostrou que a fração cromatográfica, FR, era rica em glicoproteínas com resíduos de N-acetilglucosamina e/ou manose ligados covalentemente, através de seus carbonos anoméricos, por meio de ligações glicosídicas, ao nitrogênio do grupamento amida dos resíduos de asparagina, ou seja, N-glicoproteínas. Como exemplo, a fração C3 do complemento, hemopexina, alfa 1 glicoproteína ácida e alfa 2 macroglobulina.

Um estudo conduzido por Rodríguez-Piñeiro et al. (2004), avaliou a expressão de proteínas, através do processamento de amostra de soro de indivíduos saudáveis, por cromatografia de afinidade em matriz de ConA imobilizada. A ConA é lectina da subtribo *Diocleinae* e que, portanto apresenta comportamento semelhante à lectina de *Dioclea altissima*, no que diz respeito à especificidade de ligação por carboidrato, ou seja, ambas lectinas pertencentes ao grupo das glucoses/manoses ligantes.

Rodríguez-Piñeiro et al. (2004) mostraram que proteínas não glicosiladas ou predominantemente o-glicosiladas também não foram identificadas na fração retida pela matriz, o que corroboram os resultados apresentados no nosso estudo. Contudo, a presença de

albumina na FR é contraditória com o princípio da especificidade do método utilizado. A presença de ligações não específicas devido à formação de complexos com outras glicoproteínas pode ser apontada como justificativa para a presença de resquícios de albumina.

Como já discutido anteriormente as glicoproteínas, isoladas por matriz *DaL-Sepharose*, estão relacionadas a diversos processos biológicos e muitas funções moleculares (figura 9 e 10). Entre as glicoproteínas que participavam de processos associados à resposta imune, as principais representantes foram as imunoglobulinas, seguida de proteínas do sistema complemento.

Algumas proteínas de transporte foram identificadas, como hemopexina, responsável por “capturar” o heme liberado ou perdido pelo *turnover* das hemoglobinas e proteger o organismo contra os danos que a oxidação do heme poderia provocar . Além disso, quatro apolipoproteínas (B 100, C 2I, E e J), importantes no estudo do metabolismo de lipídeos puderam ser isoladas com o uso dessa metodologia.

5.3.1.3 Perfil de glicoproteínas ligantes DaL-Sepharose do grupo com doença prostática

Após distribuição das glicoproteínas por grupo, listamos aquelas relacionadas ao CaP, na tabela 3, onde podemos observar a relação de glicoproteínas encontradas em situação de expressão diferencial, em comparação com um grupo controle e também proteínas “únicas” para o CaP.

Tabela 2 – Glicoproteínas identificadas na FR em matriz de *DaL*-Sepharose, diferencialmente expressas no grupo com CaP ou observadas apenas nesse grupo.

Acesso	Descrição	Escore	Identificação	Razão CaP: Controle	Razão Ln CaP:Controle
A1AT_HUMAN	Alfa 1 antitripsina (isofroma 3)	1497,67	Up	5,26	1,66
A1AG1_HUMAN	Alfa 1 glicoproteína ácida	668,12	Up	7,69	2,04
A2GL_HUMAN	Alfa 2 glicoproteína rica em leucina	2364,4	"Única"		
ANGT_HUMAN	Angiotensinogênio	566,58	Up	3,33	1,22
CD14_HUMAN	Antígeno de diferenciação de monócito CD14	1754,19	Up	5,26	1,66
APOA1_HUMAN	Apolipoproteína A I	311,37	"Única"		
CO7_HUMAN	Complemento C7	1158,38	Up	3,57	1,28
CO4A_HUMAN	Complemento C4 A	5344,54	Up	4,35	1,46
GP143_HUMAN	Receptor acoplado a proteína G	133,75	"Única"		
HPT_HUMAN	Haptoglobina	1323,77	Up	3,70	1,32
HPTR_HUMAN	Haptoglobina (isoforma 2)	340,11	Up	9,09	2,19
LHX2_HUMAN	<i>Homeobox protein LH -2</i>	171,93	"Única"		
LAC7_HUMAN	Ig cadeia lambda 7 região C	24789,88	Up	4,55	1,51
IGHG3_HUMAN	Ig cadeia gamma 3 região C	19515,06	Up	5,88	1,8
IGHG4_HUMAN	Ig cadeia gamma 4 região C	11835,45	Up	8,33	2,14
KV302_HUMAN	Ig cadeia kappa V região 2I SIE	3107,26	Up	4,55	1,51

Continua

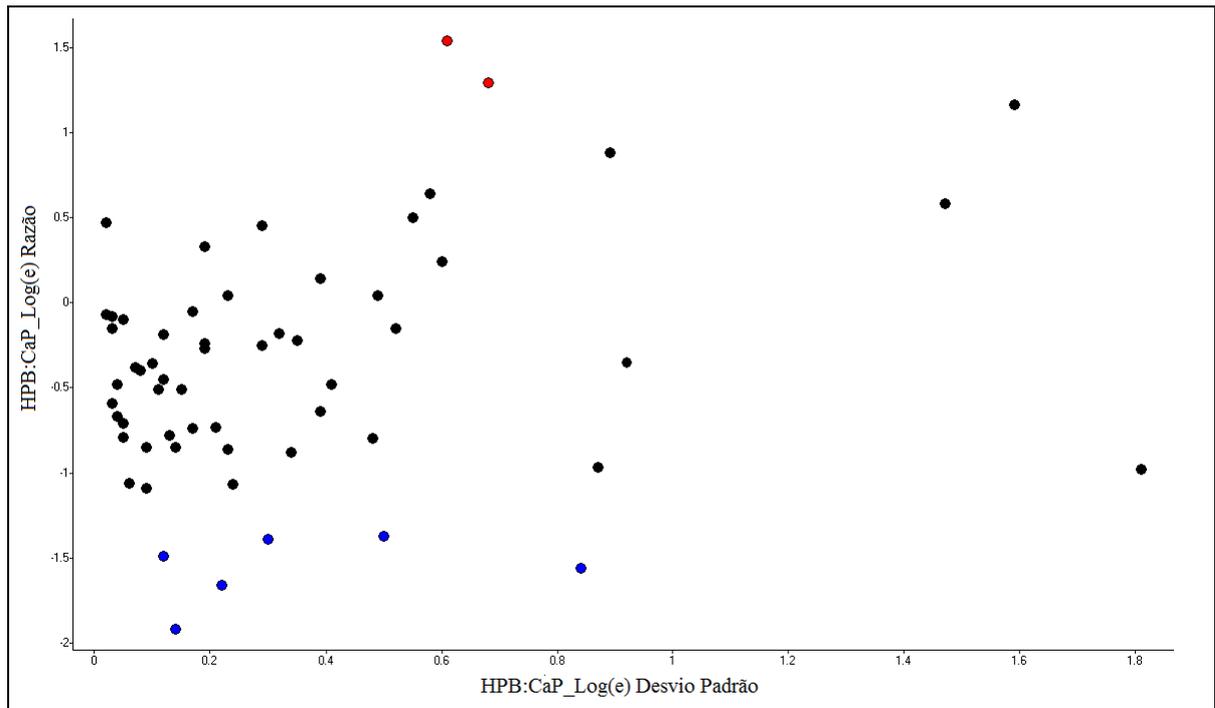
Tabela 2 – Glicoproteínas identificadas na FR em matriz de *DaL*-Sephrose, diferencialmente expressas no grupo com CaP ou observadas apenas nesse grupo.

Acesso	Descrição	Escore	Identificação	Razão CaP: Controle	Razão Ln_CaP:Controle
LV204_HUMAN	Ig cadeia lambda V região 2 TRO	1435,65	Down	0,22	1,53
HV206_HUMAN	Ig cadeia pesada V região 2 WAH	200,72	"Única"		
HV316_HUMAN	Ig cadeia pesada V região 2I TEI	3536,97	Up	5,88	1,77
IGHA2_HUMAN	Ig cadeia alfa 2 região C	17777,93	Up	3,57	1,26
ODPB_HUMAN	Piruvato desidrogenase E1	199,76	"Única"		
PZP_HUMAN	<i>Pregnancy zone protein PZP</i> (isoforma 2)	5574,48	Up	6,67	1,89
MAST4_HUMAN	Proteína quinase serina-treonina 4	239,14	"Única"		
KI20B_HUMAN	Proteína semelhante a quinase	221,37	"Única"		
TNR5_HUMAN	Receptor do fator de necrose tumoral CD 40	147,95	"Única"		
M3K7_HUMAN	Proteína quinase ativada por mitógeno 7 (MAPK-7)	169,81	"Única"		
COMP_HUMAN	Trombospondina-5	136,34	"Única"		
ZN488_HUMAN	<i>Zinc finger protein</i>	367,96	"Única"		

Conclusão

Na figura 12 apresentamos glicoproteínas diferencialmente expressas entre HPB e CaP, listadas na tabela 4.

Figura 12 - Expressão diferencial de glicoproteínas isoladas por cromatografia em matriz de *DaL*-Sephrose. Demonstração entre a razão \ln maior que 1,2 para a relação HPB / CaP . Glicoproteínas *up* reguladas são marcadas na cor vermelha enquanto as *down* reguladas são representadas pela cor azul.



Fonte: Produção própria.

Tabela 3 – Glicoproteínas identificadas na FR em matriz de *Dal*-Sephrose, diferencialmente expressas entre os grupo com CaP e HPB.

Acesso	Descrição	Escore	Identificação	Razão CaP:HPB	Razão ln_CaP:HPB
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein PZP (isoforma 2)	5574,48	Up	6,6	1,92
A1AG1_HUMAN	Alfa 1 glicoproteína ácida	668,12	Up	5,3	1,66
CD14_HUMAN	Receptor do antígeno de diferenciação de monócito CD14	1754,19	Up	4,8	1,56
IGHA2_HUMAN	Ig cadia alfa 2 região C	17777,93	Up	4,3	1,49
LAC7_HUMAN	Ig cadeia lambda 7 região C	24789,88	Up	4	1,39
HV318_HUMAN	Ig cadeia pesada V região 2I TUR	2609,53	Up	4	1,37
HPTR_HUMAN	Haptoglobina (isoforma 2)	340,11	Down	0,27	-1,29
KV204_HUMAN	Ig cadeia kappa V região 2 TEW	4454,65	Down	0,21	-1,54

5.3.1.4 Proteínas da fase aguda da inflamação

Várias proteínas da fase aguda da inflamação, incluindo, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, heptaglobina e amiloide A sérica tem sido avaliadas como marcador em homens com CaP (KUVIBIDILA; RAYFORD, 2006; PLATZ et al., 2004)). Em nosso trabalho identificamos alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida e heptaglobina aumentada em pacientes com CaP quando comparado ao grupo controle, contudo amiloide A sérica foi identificada apenas no HPB.

A heptaglobina mostrou-se 3,7 vezes mais elevada no CaP quanto comparado com o valor relativo para o grupo controle. Para a isoforma 2 de heptaglobina a razão absoluta de CaP:Controle foi 9,10, enquanto a razão HPB:CaP foi 3,63, ou seja, a isoforma de heptaglobina estava elevada no grupo com CaP e muito mais elevada no grupo com HPB quando comparados ao grupo controle. A heptaglobina é produzida pelo fígado e desempenha um papel importante na modulação de diversos aspectos da fase aguda da inflamação, atua como antioxidante e possui atividade antibacteriana (NARISADA et al., 2008).

A cadeia β de heptaglobina, proveniente da clivagem da heptaglobina, foi avaliada com um biomarcador para CaP em estudos conduzido por Saito et al. (2008) após análise do soro sanguíneo de pacientes com CaP precoce, HPB e diferente tipos de câncer urogenital, por *Western blotting* e EM. Os pesquisadores concluíram que a cadeia β de heptaglobina apresenta elevada sensibilidade e especificidade e pode ser útil como complementação do PSA na investigação do CaP precoce (SATIO et al., 2008). Assim, podemos deduzir que, se a cadeia β de heptaglobina esta aumenta em decorrência do CaP, o seu precursor também poderá estar aumentado nesta mesma condição.

A heptaglobina é uma molécula com potencial para sofrer modificação no padrão de glicosilação em decorrência de doenças. Isoformas de heptaglobina estão ligadas a doenças cardiovasculares, renais e câncer hepático, pâncreas, intestino, colón, ovário e mama (NARISADA et al. 2008; SALDOVA et al., 2008; AHMED et al., 2005; HAMRITA et al., 2009; YU et al., 2005; XING et al., 1996; ANG et al., 2006) . Recentemente, Kazuno et al. (2011) encontraram um diferente padrão de fucosilação na heptaglobina relacionado ao CaP, em uma investigação utilizando uma lectina de *Sambucus nigra*, SNA-1.

No grupo com CaP a alfa-1-antitripsina foi 5,26 vezes maior quando comparado ao quantificado no grupo controle. Esta protease pertence à família das inibidoras de serina, e seus níveis sanguíneos podem aumentar, 3 a 4 vezes, em resposta à inflamação ou infecção

(JANCIAUSKIENE et al., 2011), assim com em algumas doenças, inclusive CaP (KUVIBIDILA; RAYFORD, 2006).

O mecanismo específico que leva ao aumento de alfa-1-antitripsina em CaP é desconhecido, contudo, pesquisadores especulam que citosinas pró-inflamatórias modulem a expressão gênica de proteínas da fase aguda da inflamação, com alfa-1-antitripsina (JANCIAUSKIENE, 2001). Além disso, o fígado não é o único produtor de alfa-1-antitripsina, de acordo com a literatura, monócitos e certos tipos de tumores (mama, pulmão e colón) produzem e secretam alfa-1-antitripsina (JANCIAUSKIENE et al., 2011). Por isso, como no câncer de próstata a infiltração de células mononucleares é comum, existe a possibilidade do aumento de alfa-1-antitripsina ser de origem não-hepática e estar diretamente vinculado a doença (KUVIBIDILA; RAYFORD, 2006).

Outra proteína da fase aguda, alfa-1-glicoproteína ácida (alfa 1 GP ácida), é altamente glicosilada e está aumentada em vários estágios patológicos, como infecção, queimaduras, doença inflamatória e câncer (IMRE et al., 2008). Em nosso trabalho, foi identificada nos grupos com doença prostática (HPB e CaP), contudo, foi 5,26 vezes mais elevada no grupo com CaP quando comparado com HPB e 7,69 maior em relação ao controle.

A alfa-1-glicoproteína ácida possui a capacidade de proteger as células da apoptose, efeito demonstrado na hepatite, quando a alfa 1 GP ácida pode inibir apoptose, quando induzida pelo fator de necrose tumoral (KUVIBIDILA; RAYFORD, 2006). A ação anti-apotótica sugere uma ligação direta entre a glicoproteína e a neoplasia, e assim, eleva a nossa atenção sobre esta molécula e seu potencial como indicador do CaP.

Uma das mais interessantes características da alfa 1 GP ácida é o padrão de glicosilação, que pode ser modificado durante as doenças (MIRANDA-RIBERA et al., 2010). Por exemplo, glicanos com resíduos terminais de GlcNAc foram detectados em carcinoma de colo retal. Além disso, as glicofomas de alfa 1 GP ácida, expressas no câncer, exibem uma variedade de atividades imunomoduladoras em monócitos, onde os efeitos de glicofomas individuais diferem significativamente, e duas glicofomas no mesmo paciente podem, às vezes, ter atividades opostas (CECILIANI; POCACQUA, 2007).

Tal heterogeneidade influenciando tanto na função desta proteína, somado as achados encontrados no nosso trabalho sugerem que o perfil de glicosilação desta proteína seja investigado no CaP, tendo como principio a seletividade da *DaL*.

5.3.1.5 Imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento

Quanto às proteínas relacionadas ao sistema imune, foi identificado o antígeno de diferenciação de monócito, oito cadeias de imunoglobulinas e duas proteínas do sistema complemento unicamente ou diferencialmente quantificados no grupo com CaP. Os fragmentos de imunoglobulinas variaram entre cadeias leves e pesadas de diferentes regiões de anticorpos, como IgG e IgA, sendo que, apenas um fragmento de Ig foi *down* regulado quando comparado com o grupo controle.

As proteínas do sistema complemento C4 A e C7, foram *up* reguladas no CaP, sendo C4 A 4,35 vezes superior ao quantificado no grupo controle. A proteína C4 A é proveniente da fragmentação de C4, e historicamente as duas proteínas, C4 e C4 A, são diferencialmente expressas no CaP. Estudos peptidômicos com soro e plasma seminal demonstraram C4 A *up* regulada em indivíduos com CaP quando comparados a indivíduos saudáveis (VILLANUEVA et al., 2006; RAI et al., 2005).

O aumento dos níveis sanguíneos de C4 e C4 A foi correlacionado com prognóstico ruim de pacientes com doença renal e de pacientes adenocarcinoma de pâncreas (MORONI et al. 2000; LIN et al., 2006). Rosenzweig et al. (2009) desenvolveram um estudo proteômico com 104 pacientes que realizaram prostatectomia radical, comparando os participantes com CaP recorrente e os indivíduos sem doença prostática, após cinco anos de remoção da próstata. Ao final do estudo, C4 A mostrou-se *up* regulada no soro sanguíneo do grupo de indivíduos que apresentou CaP recorrente.

5.3.1.6 Proteínas com atividade quinase

As proteínas quinase são a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e sinalização da transcrição (SILVA et al., 2009). A proteína quinase ativada por mitógeno 7 (MAPK- 7), quinase serina treonina 4 e uma proteína tipo quinase foram identificadas, em nosso trabalho, apenas no grupo com câncer.

Embora os mecanismos completos envolvendo o desenvolvimento e a progressão do CaP não são totalmente compreendidos, alguns deles incluem a família MAPK (GIL-ARAÚJO et al., 2014). Em condições normais, quando um fator de crescimento se liga a um receptor de membrana, este evento ativa mensageiros intracelulares que culminam em uma cascata de reações, com ativação de proteínas quinase, inclusive MAPK (KIM; CHOI, 2010).

Desta forma, a MAPK migra para o núcleo celular, onde fosforila um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, iniciando, assim, a proliferação celular (SILVA et al., 2009). MAPK alteradas em tumores, mantém a fosforilação, levando a uma ativação permanente dos sinais de transcrição (DHILLON et al., 2007). Tais alterações podem ser causadas devido à amplificação gênica de MAPK, causando um estado permanentemente ativado, o que conduz a sinalização constitutiva, levando ao crescimento celular exacerbado e ao câncer (GIL-ARAUJO et al., 2014; DHILLON et al., 2007).

A discussão e o aprofundamento sobre estas proteínas tornam-se bastante interessante devido o envolvimento com a doença, justificando o seu uso como meio para compreensão da doença, desenvolvimento de terapia assistida e incrementar o diagnóstico e o prognóstico do CaP.

5.3.1.7 *Pregnancy Zone Protein*

As cromatografias de afinidade em matriz de *DaL*-Sepharose permitiram, também, o isolamento e a identificação de uma proteína conhecida como PZP, do inglês *pregnancy zone protein*. A quantificação desta glicoproteína revelou uma razão CaP:Controle 6,67, sua quantificação também mostrou-se aumentada no CaP quando comparado ao grupo com HPB. Segundo o UNIPRT (2014), a PZP é capaz de inibir quatro classes de protease, por um peculiar mecanismo de inibição irreversível da enzima. A PZP tem uma extensão de peptídeo, chamado "região isco", que contém os locais de clivagem específicos para diferentes proteases. Quando uma proteinase cliva a "região isco", uma alteração conformacional induz a proteína reter a proteinase. A enzima ligada covalentemente a PZP permanece ativa contra substratos de baixo peso molecular, mas pouco ativa contra substratos de elevado peso molecular.

5.3.1.8 *Processo celular*

Outras proteínas identificadas em nossa pesquisa desempenham atividades biológicas relativamente distintas, mas, de alguma maneira, estão envolvidas em um processo celular. Por exemplo, a alfa-2-glicoproteína rica em leucina, presente somente no grupo com CaP, participa da diferenciação das células do tecido adiposo marrom (UNIPROT, 2014). Contudo as funções fisiológicas desta proteína não são bem conhecidas, mas aumento dos níveis

séricos desta proteína foi reportado em várias doenças, inclusive no CaP (SHIRAI et al., 2009; PIN et al., 2013; REHMAN et al., 2012).

Um estudo conduzido por Rehman (2012) avaliou amostras de soro de quatro grupos de pacientes divididos pelo diagnóstico histopatológico, em: HPB, CaP localizado, não localizado e metastático. Os resultados da EM geraram um mapeamento das proteínas expressas diferencialmente sobre a progressão do câncer de próstata, onde observamos a alfa-2-glicoproteína rica em leucina, *up* regulada, nos grupos com doença progressiva e metástase.

Níveis de angiotensinogênio, na FR pela matriz de *DaL*-Sepharose, foram encontrados 4 vezes mais elevado no CaP quando comparado ao controle. O angiotensinogênio participa como substrato, em um importante mecanismo de controle da pressão arterial, sistema renina-angiotensina-aldosterona, onde o angiotensinogênio é convertido em angiotensina I pela enzima renina (SHAMAA et al., 2013). A renina é encontrada em uma grande faixa de tecidos endócrinos, incluindo, células epiteliais da glândula prostática normal e em linhagem de células malignas da próstata, LNCaP (KUMAR et al., 2014). Além disso, outras evidências vinculam mediadores do sistema renina-angiotensina-aldosteronano ao crescimento da próstata normal e no desenvolvimento de uma variedade de doenças prostática, incluindo a HPB e CaP (CHOW et al., 2009). Porém, no nosso estudo verificamos alterações de angiotensinogênio apenas no CaP quando comparado com o grupo controle.

O Zn é o segundo metal mais abundante no corpo humano, servindo como um cofator para ação de muitas enzimas. Na próstata, o zinco é acumulado em níveis até 10 vezes maior do que em outros órgãos (SARAFANOV et al., 2008). Estudo com cultura de células de LNCaP e PC-3 demonstrou o envolvimento de proteínas, participantes do metabolismo e processamento de metais pesados, particularmente zinco, na homeostase do tecido prostático, indicando diferença no processamento do zinco em tecidos com malignidade (HASUMI et al., 2003).

Em nosso estudo, proteínas de ligação ao zinco não foram observadas no grupo controle. Porém, no grupo com CaP, identificamos duas proteínas de ligação ao zinco, com escore acima de 100, são elas: zinc finger 488 e LIM homeobox. Resultado semelhante foi proposto por Lin et al. (2009) que identificaram outras isoformas de zinc finger, 223 e 563, aumentadas em cultura de células PC-3 e HPR-123.

Outras proteínas, identificadas apenas no CaP, são piruvato desidrogenase E1, receptor acoplado a proteína G, trombospondina-5 e apolipoproteína A1. Contudo, não há

evidências na literatura que vinculam piruvato desidrogenase E1, receptor acoplado a proteína G ao CaP, ou mesmo o câncer.

As trombospondina, 1 e 2, são potentes inibidoras da angiogênese, e a redução destas proteínas é favorável ao crescimento tumoral, por meio da modulação da angiogênese, em diversos tipos de tumores (JIA; WAXMAN, 2013; MATOS et al., 2013). Contudo, a trombospondina-5, também conhecida como proteína oligomérica da matriz da cartilagem, tem atividade anti-apoptótica, sendo a apoptose essencial para eliminação de células malignas, além disso, a trombospondina-5 está envolvida na remodelagem óssea (UNIPROT, 2014).

Malik et al. (2005) relataram uma isoforma de apolipoproteína A 2 superexpressa em pacientes com carcinoma prostático. Sabidamente, o metabolismo de lipídeos está modificado em diversos tipos de câncer, inclusive no CaP, além disso, apolipoproteínas participam de diversos processos inflamatórios. Porém, a apolipoproteína A I é um anti-inflamatório natural, componente do HDL, uma lipoproteína de alta densidade chamada de “bom colesterol”, e não há estudos que correlacionem a concentração de apolipoproteína I ao câncer.

Embora não existindo referências que justifiquem a apolipoproteína A I, presente apenas no grupo com CaP, em nosso estudo, é possível que esta glicoproteína tenha sofrido modificações no padrão de glicosilação. Pois, em nosso trabalho estudamos uma população sub-glicoproteômica específica, e tais glicoproteínas foram selecionadas pela afinidade com a *DaL*, sendo a especificidade da lectina capaz de distinguir alguma possível glicofórmula proteica alterada.

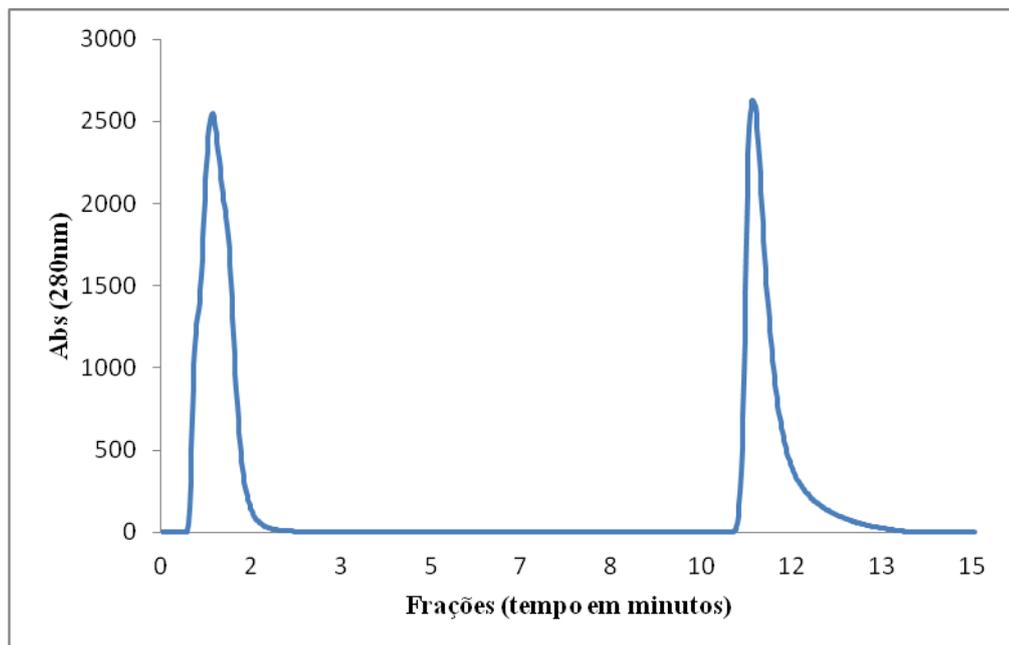
5.3.2 Glicoproteínas sorológicas isoladas pela combinação de imunodepleção e matriz DaL-Sepharose

As glicoproteínas do soro sanguíneo foram fracionadas por cromatografia de afinidade, com este propósito foi utilizada uma matriz para remoção de grandes quantidades de albumina sérica humana (ASH) e imunoglobulina G (IgG) e uma matriz com lectina imobilizada. A fração livre de ASH e IgG, denominada Fração Imunodepletada (FI), foi obtida por cromatografia de afinidade a partir do soro total. Em seguida, a FI foi submetida à cromatografia em matriz de *DaL*-Sepharose para obtenção de dois picos cromatográficos, sendo o pico 1 a Fração Imunodepletada Não Retida (FINR) e o pico 2 ou Fração Imunodepletada Retida (FIR).

5.3.2.1 Depleção de albumina e imunoglobulina de soro sanguíneo

As amostras de soro sanguíneo foram descongeladas, centrifugadas, filtradas e submetidas à cromatografia de afinidade para depleção de ASH e IgG utilizando a matriz Hi-trap Albumin IgG depletion™ (GE Healthcare). A figura 13 ilustra o perfil cromatográfico para uma amostra de soro sanguíneo de um indivíduo sem doença prostática (Controle). Posteriormente, a identificação por EM de massas revelou a presença de 101 proteínas, destas, 71 estavam presentes no soro sanguíneo, 80 no pico I, que corresponde à fração imunodepletada (FI) e 21 proteínas no pico 2. Entre as proteínas retidas na matriz, 8 estavam presentes nas três amostras analisadas, 10 no soro e 3 proteínas foram identificadas apenas nesta fração cromatográfica, figura 14.

Figura 13 - Perfil cromatográfico das proteínas sorológicas fracionadas, em matriz Hi-trap Albumin IgG depletion™, para depleção de ASH e IgG.

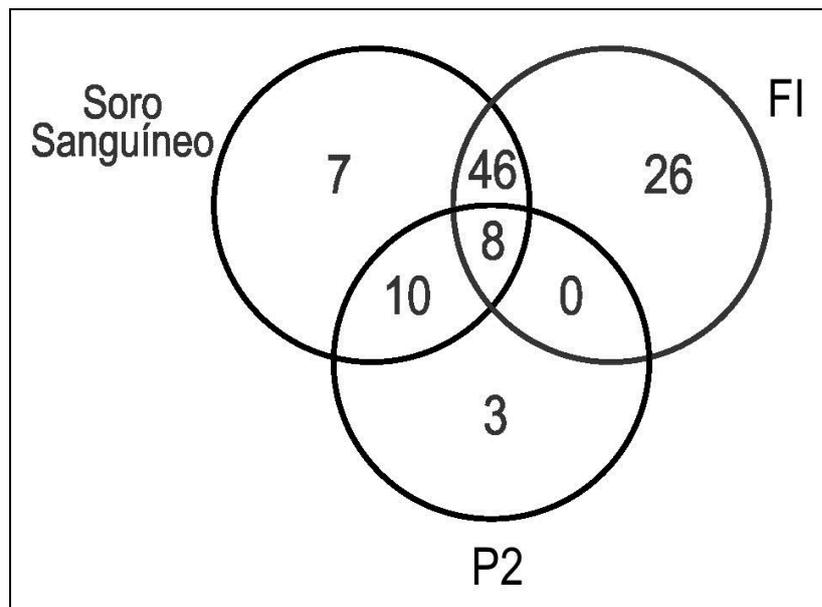


Produção própria.

No diagrama de Vemm (figura 14) podemos analisar os resultados da depleção, a partir do conjunto constituído por proteínas na FI e P2. A albumina sérica e cadeias de IgG foram identificadas apenas no pico 2, mostrando que foi possível utilizar a coluna injetando a capacidade máxima de amostra, sem comprometer o rendimento, pela saturação da coluna.

Além disso, ASH e IgG, duas isoformas de DENN e uma hidroxilase mitocondrial foram identificadas apenas na fração P2.

Figura14 - Diagrama mostrando a distribuição das proteínas e glicoproteínas identificadas no soro sanguíneo, e nas frações obtidas pela cromatografia de afinidade para depleção de ASH e IgG .PI: fração livre de albumina sérica humana e imunoglobulina G, fração imunodepletada, P2: fração retida pela matriz de Hi-trap Albumin IgG depletion™.



Fonte: Produção própria.

As proteínas presentes na FI e no pico 2 correspondem a cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas, pois a matriz utilizada apresenta eficiência para remover apenas IgG, como as demais imunoglobulinas podem compartilhar algumas porções da cadeia, é possível ter a presença destas cadeias nas distintas frações.

Ao analisar o diagrama de Venn na figura 14, podemos observamos 54 glicoproteínas em ambas as amostras, soro e FI, mas 26 proteínas foram identificadas apenas após a depleção, na fração FI. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato de ter sido possível identificar um número maior de proteínas após eliminação de algumas mais abundantes, como no caso a albumina, que estava mascarando o sinal de outras tantas, presentes em menores concentrações. Consequentemente um número menor de proteínas menos abundantes foi identificado na presença de albumina, como se observou soro sanguíneo, rico em albumina.

Albumina e imunoglobulinas juntas representam mais de 75% de todas as proteínas presentes no plasma humano (MORTEZAI et al., 2012). A remoção destas proteínas aumenta a capacidade analítica em um fator de 3-9 e melhora significativamente a detecção de proteínas pouco abundantes. Por isso, ASH e imunoglobulinas são os principais alvos de depleção em estudos proteômicos que buscam identificação de biomarcadores (BRGLES et al., 2011). Com este propósito, várias colunas cromatográficas foram desenvolvidas e estão disponíveis comercialmente. Os métodos comumente utilizados nestas colunas, incluem, resina a base de corantes ou anticorpos recombinantes para depleção albumina e proteína A e G para a depleção de imunoglobulina (DI GIROLAMO et al., 2011; URBAS et al., 2009).

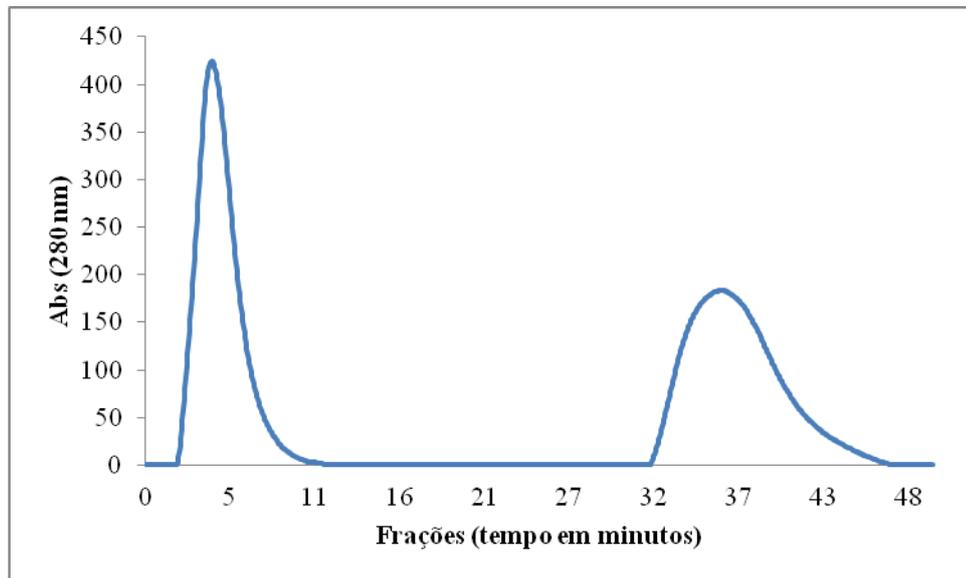
Govorukhina et al. (2003) avaliaram a depleção de ASH e imunoglobulinas como ferramenta preliminar a identificação por espectrometria de massas de um biomarcador para câncer, o antígeno de carcinoma de células escamosas (SCCA 1). Para isso o soro sanguíneo de um paciente com câncer cervical foi depletado, e como controle foi utilizado soro sanguíneo total de um doador saudável, com adição de SCCA 1 recombinante. O SCCA 1 foi detectado apenas no soro depletado, e com isso os pesquisadores mostraram que a cromatografia de imunoafinidade é uma alternativa viável e poderosa para depleção de proteínas muito abundantes no soro humano, e por isso, esta etapa metodológica constitui um importante passo na preparação de amostras para o estudo de biomarcadores.

5.3.2.2 Frações imunodepletada retida e não retida em coluna DaL-Sepharose

5.3.2.2.1 Panorama geral do fracionamento e identificação das glicoproteínas

A Fração Imunodepletada (FI) proveniente do soro total foi aplicada a coluna de DaL-Sepharose com a obtenção de duas frações, como mostra a Figura 15, onde observamos duas frações, a FINR, eluída com tampão de equilíbrio, e a FIR, obtida após lavagem da matriz com tampão de equilíbrio contendo D-manose 0,2 M. As diferenças entre o perfil cromatográfico para pacientes de grupos diferentes não foi significativamente maior quando comparado com pacientes do mesmo grupo.

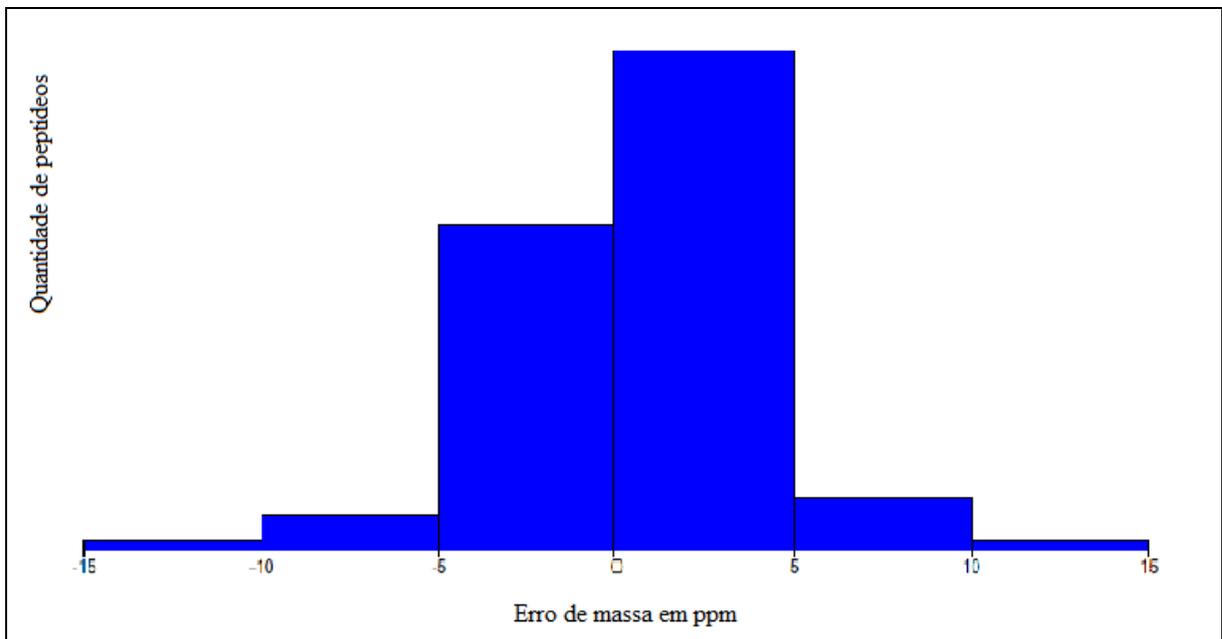
Figura 15 - Perfil cromatográfico das glicoproteínas da FI aplicadas em matriz de *DaL*-Sephrose .



Fonte: produção própria.

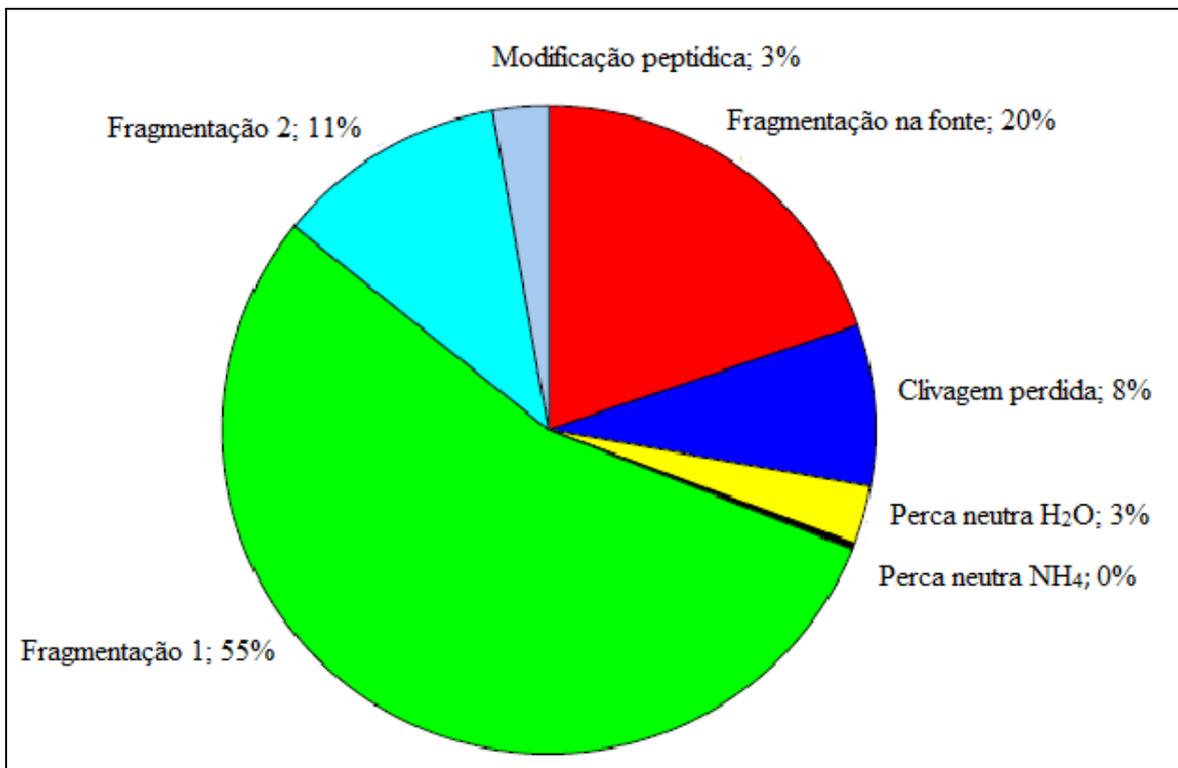
A FINR e a FIR foram analisada por EM após diálise e concentração. Para identificação das proteínas diferentemente expressas entre os grupos foi utilizado um espectrômetro de massas nanoUPLC-MS com aquisição MS^E . As amostras foram analisadas em quadruplicata por ESI-MS/MS nas mesmas condições. No total, foram identificados 54.522 peptídeos com um erro de massa de 5 ppm, que corresponde a 85 % do total de peptídeos identificados e mais de 90 % dos peptídeos com um erro de massa menor que 10 ppm (figura 16). Quanto à qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos, 23 % dos peptídeos foram fragmentados na fonte, enquanto 8% correspondem à clivagem perdida (figura 17).

Figura 16 - Distribuição do erro massas de massa exata, medida em ppm, para identificação de amostras da FINR e FIR em matriz de *DaL*-Sepharse.



Fonte: produção própria

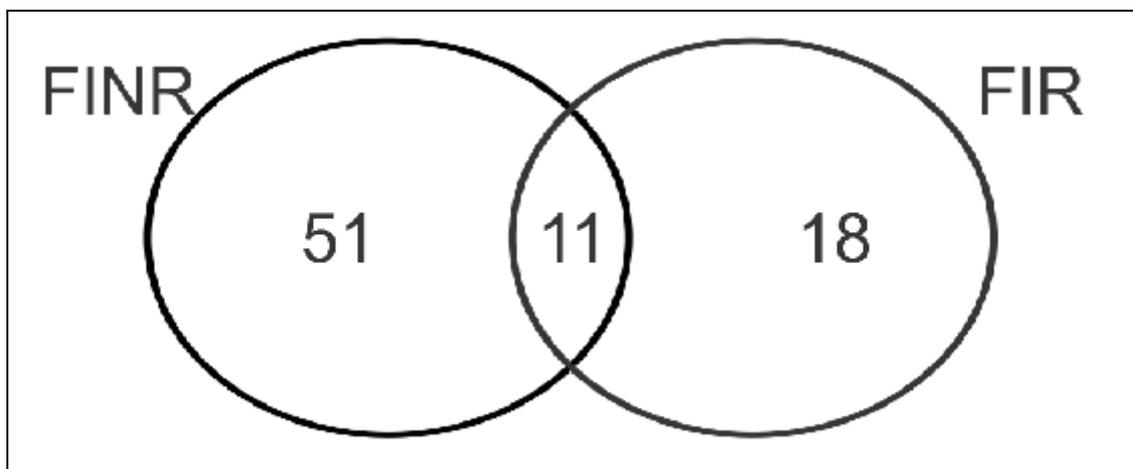
Figura 17 - Distribuição que avalia qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos identificados por espectrometria de massas. Amostra da FINR e FIR em matriz de *DaL*-Sepharse.



Fonte: produção própria.

Coletivamente, foram identificadas 105 proteínas com uma cobertura de sequência maior que 75%. Para identificação das proteínas diferentemente expressas entre os grupos foi utilizando o método de quantificação Expression High Definition Proteomics (Waters, UK). Após análise restaram 80 glicoproteínas, das quais, 51 proteínas foram identificadas apenas na FINR (APÊNDICE B), 18 unicamente na FIR (APÊNDICE C) e 11 estavam presentes nas duas frações, conforme podemos observar no diagrama de Venn na figura 18.

Figura 18 - Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas e glicoproteínas obtidas após depleção de albumina sérica humana e imunoglobulina G, quando fracionadas pela matriz DaL-Sepharose.



Fonte: Produção própria.

O conteúdo proteico, da FINR, de pacientes e controle, era composto por glicoproteínas e proteínas não glicosiladas, cuja matriz DaL-Sepharose não exibiu afinidade, conforme exemplificado pela presença de afamin, antitrombina 2I, lumiscam e as demais proteínas nessa fração. Em relação à FIR podemos observar uma série de glicoproteínas, que em sua maioria, possuem pelo menos um sítio *N*-glicosilado com um carboidrato que a matriz DaL-Sepharose exibiu afinidade.

Houve ainda um grupo constituído por 11 proteínas e/ou glicoproteínas presentes em ambas as frações, as quais, provavelmente, foram identificadas devido à formação de complexos com outras glicoproteínas ou imunoglobulinas, fazendo com que elas fossem identificadas indiretamente, ou ainda, pelo fato de uma mesma proteína possuir um ou mais

padrão de glicosilação, fazendo com que algumas glicoproteínas fossem retidas nas duas frações.

Após a identificação das proteínas, com o intuito de enriquecer os dados, foi utilizada a abordagem de quantificação *label free*. A metodologia consistiu na adição de um padrão interno, para isso utilizamos uma solução de peptídeos da proteína álcool desidrogenase. Além disso, paralelamente, quantificamos as proteínas pela escolha de uma *house keeping*, e o resultado dos dois processamentos mostrou diferenças insignificantes, demonstrando a exatidão dos resultados.

Até o momento, a maioria das análises proteômicas é realizada, utilizando métodos de quantificação, que fazem uso de marcação das proteínas / peptídeos com isótopos radioativos (MITCHELL, 2010). Essas metodologias demandam demorado tempo na preparação da amostra e são relativamente caras (SILVA et al., 2006). Recentemente, vários estudos têm sido realizados, aplicando a quantificação *label free*, para estimar a proporção de uma proteína em uma amostra. (KITO; ITO, 2008; BECKER; BERN, 2011).

A quantificação *label free* requer comparação dos peptídeos, provenientes da digestão proteolítica, idênticos em cada uma das condições, para determinar, com precisão, as proporções relativas das proteínas de interesse particular (OELJEKLAUS et al., 2009). Muitos destes métodos baseiam-se na intensidade dos picos, determinada pelas proporções da área do pico de peptídeos idênticos entre as diferentes condições, e na frequência da identificação, determinada pela razão entre a contagem de espectros e o número de peptídeos para a proteína em questão (SILVA et al., 2006; BECKER; BERN, 2011).

Megger et al. (2014) realizaram um estudo para comparação de quantificação proteômica *label free* e duas metodologias que utilizam marcação pela incorporação de isobáricos. Os autores foram capazes de mostrar que a abordagem *label free*, de longe, supera os métodos, TMT e iTRAQ, em relação à cobertura do proteoma de diversas linhagens celulares, com até três vezes mais proteínas identificados apresentando uma excelente reprodutibilidade em medições repetidas.

5.3.2.2.2 Perfil de glicoproteínas ligantes DaL-Sepharose do grupo com doença prostática

As proteínas diferencialmente quantificadas entre os grupos foram consideradas, *up* ou *down* reguladas, quando apresentaram uma razão de ln maior que 1,2 e denominada

“única” a proteína identificada apenas em um grupo. Na tabela 4 reportamos as proteínas identificadas na FINR com expressão diferencial entre os grupos.

Tabela 4 – Proteínas e glicoproteínas identificadas na FINR e FIR, em matriz de *DaL*-Sepharose, diferencialmente expressas no grupo com CaP ou observadas apenas nesse grupo.

Fração imunodepletada não-retida - FINR					
Acesso	Descrição	Escore	Identificação	Razão CaP: Controle	Razão Ln CaP:Controle
APOA1_HUMAN	Apolipoproteína A I	31403.57	Down	0,30	1,19
FETUA_HUMAN	<i>Alpha 2 HS glycoprotein</i>	2031.19	Down	0,26	1,33
APOA4_HUMAN	Apolipoproteína A IV	579.56	Down	0,25	1,4
Q6MZX9_HUMAN	Proteína putativa não-caracterizada	2541.21	Down	0,05	3,03
Q6ZVX0_HUMAN	Proteína similar a <i>Tro alpha1 H myeloma</i>	2535.96	Não identificada no grupo controle		
Q6J1Z7_HUMAN	Fragmento beta de hemoglobina	12482.19	Não identificada no grupo controle		
Q5FWF9_HUMAN	IGL protein	3727.94	Não identificada no grupo controle		
Q0KKI6_HUMAN	Fragmento da cadeia <i>light</i> de Imunoglobulina	20718.47	Não identificada no grupo controle		
Fração imunodepletada retida - FIR					
PZP_HUMAN	<i>Pregnancy zone protein</i>	3992.98	Up	3,571429	0.59
Q6ZVX0_HUMAN	Proteína similar a <i>Tro alpha1 H myeloma</i>	838.65	Up	6,666667	0.67
Q6P5S8_HUMAN	<i>IGK protein</i>	2482.68	"Única"		
A1AT_HUMAN	Alfa 1 antitripsina	1369.75	"Única"		

O fato de algumas proteínas terem sido identificadas na FINR não torna sua detecção menos importante do que as proteínas identificadas na FIR pela matriz *DaL*-Sephrose, pois graças ao processo de fracionamento que promove a depleção de algumas proteínas, é que foi possível identificar proteínas pouco abundantes contidas na FINR.

A alfa-2-HS glicoproteína, apolipoproteína A IV e uma proteína putativa foram *down* reguladas no grupo com CaP quando comparadas ao valor relativo no grupo controle. Estas glicoproteínas foram identificadas apenas na FINR. A apolipoproteína A IV participa do metabolismo, provavelmente, facilitando e/ou mediando a absorção, transporte e utilização de lipídeos, sendo as concentrações sanguíneas de apolipoproteína A IV associadas à presença de algumas doenças (DENG et al., 2012; WANG et al., 2013).

Recentemente, um estudo proteômico avaliou amostras de soro de quatro grupos de pacientes com doença prostática; HPB e CaP localizado, não localizado e metastático. Entre as glicoproteínas diferencialmente expressas podemos observar a cadeia beta de alfa-2-HS glicoproteína elevada no CaP localizado e em menor intensidade no CaP metastático, enquanto a apolipoproteína A IV foi *up* regulada no grupo com metástase (REHMAN et al., 2012).

A divergência entre os nossos resultados e o encontrado por Rehman e colaboradores (2012), sugere uma desconfiança a respeito das proteínas em questão. Contudo, vale salientar que o estudo desenvolvido por Rehman et al. (2012) não utilizou uma população sem doença prostática, como controle negativo. Além disso, populações diferentes, ou mesmo indivíduos diferentes, podem apresentar um comportamento proteômico heterogêneo (LU et al., 2013; KAZUNO et al., 2011).

A proteína IGL, a cadeia *light* de imunoglobulina e o fragmento da cadeia beta de hemoglobina foram identificadas nos grupos com HPB e CaP na FINR. A diferença de quantificação das proteínas na relação CaP:HPB não foi significativa.

Após o fracionamento da FI em matriz de *DaL*-Sephrose duas glicoproteínas foram identificadas apenas na FIR, IGK observada apenas no grupo com CaP e PZP com uma relação CaP:Controle de 3,57.

A PZP é uma protease, já descrita anteriormente neste trabalho. Recentemente, um estudo identificou o aumento de PZP em pacientes com doença de *Alzheimer* pré-sintomática em comparação com controles, sendo esta diferença mais significativa em mulheres (IJSELSTIJN et al., 2011). Contudo, na literatura há poucas informações sobre os processos biológicos que participa esta glicoproteína.

Estudos utilizando com Multi-lectinas imobilizadas em matriz, na prospecção de biomarcadores em câncer de mama, identificaram PZP, apenas na fração retida pela matriz (FRY et al., 2013; YANG et al., 2006). Dentre as lectinas imobilizadas na matriz, estava presente a lectina de ConA, uma lectina glucose/manose ligante, especificidade também apresentada pela *DaL*. Esses estudos corroboram com nossos resultados, pois, após processos de fracionamento utilizados em nosso estudo, apenas identificamos PZP na FIR e na FR. Desta forma, podemos reforçar a hipótese que a cromatografia de afinidade em matriz de *DaL*-Sephrose é uma ferramenta eficaz no enriquecimento de glicoproteínas, em amostra de soro sanguíneo, para posterior identificação por metodologias como EM.

Na figura 18 observamos algumas proteínas identificadas em duas frações cromatográficas, FINR e FIR. Como já discutido anteriormente a possibilidade das glicoproteínas estarem presentes nas duas frações diz respeito à formação de complexos com outras glicoproteínas ou imunoglobulinas (MORTEZAI et al., 2012), ou ainda, pelo fato de uma mesma proteína possuir um ou mais padrão de glicosilação, fazendo com que algumas glicoproteínas fossem retidas nas duas frações (PIN et al., 2013).

Sabe-se que se o padrão de glicosilação de uma determinada proteína pode mudar durante algum processo biológico, geralmente patológico, conforme se observa com algumas glicoproteínas que são utilizadas como biomarcadores de câncer e outras doenças (ADAMCZYK et al., 2012; GHAZARIAN et al., 2011; CLARK; MAO, 2012). Então, é de se esperar que a afinidade da lectina pela mesma glicoproteína também mude, conseqüentemente, o perfil de proteínas identificadas em uma determinada fração também será alterado. Por isso, lectinas imobilizadas, na forma de matriz cromatográfica, podem ser usadas como ferramentas biotecnológicas úteis no monitoramento de mudanças no padrão de glicosilação de proteínas em amostras biológicas (DRAKE et al., 2011; KUMADA et al., 2012; LEERAPUN et al., 2007).

A apolipoproteína A I foi *down* regulada no grupo com CaP quando comparado ao controle, na FINR, todavia na FIR não houve diferença significativa entre os grupos. Essa glicoproteína foi identificada no estudo quando feito sem imunodepleção, como reportado anteriormente, a apolipoproteína A I foi identificada na FR apenas no grupo com CaP.

A proteína *like* alfa 1 mieloma identificada na FINR foi observada apenas no grupo com CaP e HPB, mas sem diferença significativa entre os grupos. Porém, na FIR a proteína *like* alfa 1 mieloma foi identificada nos três grupos, sendo *up* regulada nos grupos com doença prostática, HPB e CaP. Esse resultado sugerem que a redução da complexidade da amostra

facilitou a identificação da proteína no grupo controle na FIR, pois possivelmente ela estava presente também no FINR, ou possivelmente uma modificação na glicosilação ou diferentes padrões de glicosilação resultaram no comportamento desta glicoproteína nas frações analisadas.

A alfa 1 antitripsina não apresentou diferença significativa quanto a sua expressão entre os grupos na FINR, contudo, na FIR, foi identificada apenas no grupo com CaP, outro fato, que, também, pode sugerir mudança de glicosilação na proteína, criando uma isoforma aumentada no CaP.

5.4 Considerações finais

Neste trabalho foi utilizado uma matriz cromatográfica com *DaL* para capturar uma subpopulação glicoproteômica, do soro sanguíneo. Em um segundo momento, adicionamos um passo cromatográfico prévio, a depleção de IgG e ASH, para obtenção de uma FI. O intuito de empregar uma FI foi melhor os resultados, pela redução da complexidade de glicoproteínas aplicadas a coluna de *DaL*-Sephrose.

A cromatografia de uma FI do soro sanguíneo em matriz *DaL*-Sephrose gerou um resultado diferente, quando, na mesma matriz, foi aplicado soro total. Porém, infelizmente, não foi possível confrontar as divergências, visto que, foram utilizadas amostras de sangue de doadores diferente, e o método cromatográfico, realizado para a amostra sem depleção, foi semi-automatizado, enquanto as cromatografias da FI foram realizadas em um sistema de FPLC ÄKTApurifier 10 (GE HealthCare).

As glicoproteínas da FR, obtidas pela cromatografia do soro sanguíneo na matriz de *DaL*-Sephrose, foram identificadas e quantificadas, por espectrometria de massas, e assim, obtivemos o perfil proteico para os três grupos estudados, controle, HPB e CaP. A identificação das proteínas diferentemente expressas entre os grupos revelou 132 glicoproteínas, destas, 29 foram unicamente identificadas no CaP ou apresentaram uma razão de ln maior que 1,2, quando comparado a quantificação no grupo controle. Após uma análise considerando a confiabilidade da identificação, estimada pelo score, e as evidências na literatura que justifiquem um possível envolvimento da proteína no CaP, destacaram-se: alfa-1-glicoproteína ácida, trombospondin-5, complemento C4 A, heptaglobina, *pregnancy zone protein*, isoforma 3 de alfa-1-antitripsina, alfa-2-glicoproteína rica em leucina e *Zinc finger protein*.

Quando a FI do soro sanguíneo foi aplicada a matriz *DaL*-Sepharose permitiu a obtenção de duas frações: FINR e FIR. Na primeira, composta por glicoproteínas que não interagiram com a lectina, foi possível identificar, a apolipoproteína A I e A IV, alfa-2-HS glicoproteína e uma proteína putativa *down* reguladas no grupo com CaP em relação ao valor no grupo controle, ainda nesta fração, foram identificadas a proteína like alfa 1 mieloma, hemoglobina beta, proteína IGL e um fragmento da cadeia *light* de imunoglobulina, apenas nos grupos com CaP e HPB. Na fração FIR identificamos a alfa-1-antitripsina e a proteína IGK “únicas” no grupo com CaP e a *pregnancy zone protein* e a proteína like alfa 1 mieloma *up* reguladas no CaP quando comparadas ao grupo controle.

Abordagens utilizando lectinas em métodos para enriquecimento de glicoproteínas, em amostras complexas, aparecem com maior frequência na literatura. Embora diferentes métodos comerciais estejam disponíveis para reduzir a complexidade do plasma, estas técnicas têm como desvantagens: custo elevado, instrumentação dispendiosa e capacidade para limitado volume da amostra, o que gera pequeno volume de amostra para a próxima análise, a alternativa seria a repetição do método, que eleva a demora nas etapas de pré-análise e a propensão a variações intra- e interamostra (UZUN et al., 2013).

Capturar as proteínas glicosiladas de uma fração específica do proteoma sanguíneo permite a identificação de candidatos a biomarcadores que podem ser importantes em estudos futuros (CLARK; MAO, 2012). Haja vista que, estudos proteômicos permitem aumentar perspectiva de novos biomarcadores, pois, são úteis como indicativos e norteio para pesquisa de genes e desenvolvimento de métodos de validação (PIN et al., 2013). A aplicação de métodos de validação, em estudos com uma população maior, poderá nos dizer o valor preditivo de uma determinada proteína, ou de um padrão de proteínas, como um biomarcador para o CaP.

Biomarcadores são muito importantes para determinar a suscetibilidade a uma doença, auxiliar no diagnóstico, no prognóstico, e também, informar o efeito particular da ação de uma droga sobre o indivíduo, e desta forma auxiliar na escolha e na elaboração de uma terapia personalizada (FRANGOGIANNIS, 2012; MISCHAK, 2010; PIN et al., 2013). A descoberta de novos biomarcadores auxilia o desenvolvimento de testes com maior sensibilidade e especificidade que possa permitir um diagnóstico eficiente e um tratamento de doenças mais agressivas e, concomitantemente, reduzir a possibilidade de recaída da doença.

6 CONCLUSÃO

A lectina de sementes de *Dioclea altissima*, quando imobilizada em matriz de Sepharose 4B®, foi hábil para separar proteínas sorológicas em duas frações. A identificação, por espectrometria de massas, da fração retida, revelou a presença de centenas de glicoproteínas. A quantificação das glicoproteínas diferentemente expressas entre os grupos revelou, proteínas com um possível envolvimento da proteína no CaP, como, alfa-1-glicoproteína ácida, trombospondín-5, complemento C4 A, heptaglobina, *pregnancy zone protein*, isoforma 3 de alfa-1-antitripsina, alfa-2-glicoproteína rica em leucina e *Zinc finger protein*.

A remoção previa de albumina sérica humana e imunoglobulina G apresentou melhores resultados para os parâmetros como qualidade da fragmentação dos peptídeos e erro de massa, que avaliam qualidade da identificação por espectrometria de massas. Na FINR, composta por glicoproteínas que não interagiram com a lectina, foi possível identificar, a apolipoproteína A I e A IV, alfa-2-HS glicoproteína e uma proteína putativa *down* reguladas no grupo com CaP em relação ao valor no grupo controle, ainda nesta fração, foram identificadas a proteína like alfa 1 mieloma, hemoglobina beta, proteína IGL e um fragmento da cadeia *light* de imunoglobulina, apenas nos grupos com CaP e HPB. Na fração FIR identificamos a alfa-1-antitripsina e a proteína IGK “únicas” no grupo com CaP e a *pregnancy zone protein* e a proteína like alfa 1 mieloma *up* reguladas no CaP quando comparadas ao grupo controle.

Referências

ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P. M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1820, n. 9, p. 1347–53, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178561>>. Acesso em: 11/11/2013.

AHMED, N.; OLIVA, K. T.; BARKER, G.; et al. Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers of ovarian cancer. **Proteomics**, v. 5, n. 17, p. 4625–36, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16220531>>. Acesso em: 21/5/2014.

ALVAREZ-CUBERO, M. J.; SAIZ, M.; MARTINEZ-GONZALEZ, L. J.; et al. Genetic analysis of the principal genes related to prostate cancer: a review. **Urologic oncology**, v. 31, n. 8, p. 1419–29, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23141781>>. Acesso em: 1/5/2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures. In: American Cancer Society (Ed.); v. 64, p.1–70, 2014. Atlante. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3942402&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

ANDRIOLO, A.; BALLARATI, C. A. F.; MELO, M. R.; SUMITA, N. M. **Diretriz para a Gestão e Garantia da Qualidade de testes laboratoriais remotos (tlr)**. 1^a edição ed. Barueri, 2012.

ANG, I. L.; POON, T. C. W.; LAI, P. B. S.; et al. Study of Serum Haptoglobin and Its Glycoforms in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma : A Glycoproteomic Approach research articles. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 1, p. 2691–2700, 2006.

AUVINEN, A.; DE KONING, H. J.; COEBERGH, J.-W. Foreword: meeting the challenge of prostate cancer. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 46, n. 17, p. 3037–9, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047584>>. Acesso em: 1/5/2014.

BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; et al. Proteômica : metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Rev Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012.

BATESON, H.; SALEEM, S.; LOADMAN, P. M.; SUTTON, C. W. Use of matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry in cancer research. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 64, n. 3, p. 197–206, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21549846>>. Acesso em: 1/5/2014.

BECKER, C. H.; BERN, M. Recent developments in quantitative proteomics. **Mutation research**, v. 722, n. 2, p. 171–82, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2980806&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/11/2013.

BERGER, M. Câncer de próstata: rastrear ou não rastrear? **Revista HCPA**, v. 31, n. 3, p. 393–394, 2011.

BOSSONI, R.; STUMM, E.; HILDEBRAND, L. Câncer e morte, um dilema para pacientes e familiares. **Revista Contexto & Saúde**, v. 9, n. 17, p. 13–21, 2009.

BRIGLES, M.; CLIFTON, J.; WALSH, R.; et al. Selectivity of monolithic supports under overloading conditions and their use for separation of human plasma and isolation of low abundance proteins. **Journal of chromatography. A**, v. 1218, n. 17, p. 2389–95, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3074050&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24/5/2014.

CARVALHO, P. C.; DEGRAVE, W. M. Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 6, p. 431–436, 2006.

CAVADA, B. S.; RAMOS, M. V.; FRANÇA, E.; et al. PURIFICATION AN PARTIAL CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM *Dioclea virgata* Benth SEEDS. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, n. 1, p. 37–42, 1996.

CECILIANI, F.; POCACQUA, V. The Acute Phase Protein 1-Acid Glycoprotein : A Model for Altered Gly- cosylation During Diseases. **Current Protein and Peptide Science**, v. 8, n. 1, p. 91–108, 2007.

CENTER, M. M.; JEMAL, A.; LORTET-TIEULENT, J.; et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. **European urology**, v. 61, n. 6, p. 1079–92, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424666>>. Acesso em: 1/5/2014.

CHOW, L.; REZMANN, L.; CATT, K. J.; et al. Role of the renin-angiotensin system in prostate cancer. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 302, n. 2, p. 219–29, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824067>>. Acesso em: 1/5/2014.

CLARK, D.; MAO, L. Cancer biomarker discovery: lectin-based strategies targeting glycoproteins. **Disease markers**, v. 33, n. 1, p. 1–10, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3810786&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24/5/2014.

COTTRELL, J. S. Protein identification using MS/MS data. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1842–51, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21635977>>. Acesso em: 1/5/2014.

DAMBER, J.-E.; AUS, G. Prostate cancer. **Lancet**, v. 371, n. 9625, p. 1710–21, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486743>>. .

DATASUS. Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIM. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10>>. Acesso em: 13/5/2014.

DENG, X.; MORRIS, J.; DRESSMEN, J.; et al. The structure of dimeric apolipoprotein A-IV and its mechanism of self-association. **Structure (London, England : 1993)**, v. 20, n. 5, p. 767–79, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3354570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24/5/2014.

DHILLON, A S.; HAGAN, S.; RATH, O.; KOLCH, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279–90, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496922>>. Acesso em: 28/4/2014.

DRAKE, P. M.; SCHILLING, B.; NILES, R. K.; et al. A lectin affinity workflow targeting glycosite-specific, cancer-related carbohydrate structures in trypsin-digested human plasma. **Analytical biochemistry**, v. 408, n. 1, p. 71–85, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3205961&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/5/2014.

DRAKE, R. R.; SCHWEGLER, E. E.; MALIK, G.; et al. Lectin capture strategies combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 5, n. 10, p. 1957–67, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760258>>. Acesso em: 1/5/2014.

FANG, X.; ZHANG, W.-W. Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. **Journal of proteomics**, v. 71, n. 3, p. 284–303, 2008.

FILIPITS, M.; RUDAS, M.; JAKESZ, R.; et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 18, p. 6012–20, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21807638>>. Acesso em: 17/6/2014.

FOURNIER, M. L.; GILMORE, J. M.; MARTIN-BROWN, S. A; WASHBURN, M. P. Multidimensional separations-based shotgun proteomics. **Chemical reviews**, v. 107, n. 8, p. 3654–86, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17649983>>. .

FRY, S. A; SINCLAIR, J.; TIMMS, J. F.; LEATHEM, A. J.; DWEK, M. V. A targeted glycoproteomic approach identifies cadherin-5 as a novel biomarker of metastatic breast cancer. **Cancer letters**, v. 328, n. 2, p. 335–44, 2013. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079531>>. Acesso em: 1/5/2014.

GEMEINER, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TKÁC, J.; et al. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 1–15, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703130>>. Acesso em: 7/5/2014.

GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K.-H. N-acetyl-D-galactosamine/N-acetyl-D-glucosamine--recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 43, n. 2, p. 223–32, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15681152>>. Acesso em: 12/5/2014.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236–47, 2011. Elsevier. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3027850&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/4/2014.

GIL-ARAUJO, B.; TOLEDO LOBO, M.-V.; GUTIÉRREZ-SALMERÓN, M.; et al. Dual specificity phosphatase 1 expression inversely correlates with NF- κ B activity and expression in prostate cancer and promotes apoptosis through a p38 MAPK dependent mechanism. **Molecular oncology**, v. 8, n. 1, p. 27–38, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080497>>. Acesso em: 1/5/2014.

GILMORE, J. M.; WASHBURN, M. P. Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 11, p. 2078–91, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20797458>>. Acesso em: 1/5/2014.

DI GIROLAMO, F.; RIGHETTI, P. G.; D'AMATO, A.; CHUNG, M. C. M. Cibacron Blue and proteomics: the mystery of the platoon missing in action. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 12, p. 2856–65, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787892>>. Acesso em: 24/5/2014.

GOOD, J. A. D.; SKOUFIAS, D. A.; KOZIELSKI, F. Elucidating the functionality of kinesins: an overview of small molecule inhibitors. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 22, n. 9, p. 935–45, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001111>>. Acesso em: 1/5/2014.

GOVORUKHINA, N. I.; KEIZER-GUNNINK, A.; ZEE, A. G. J. VAN DER; JONG, S. DE. Simple preparation of human serum for the analysis of tumor markers Comparison of different approaches for albumin and γ -globulin depletion. **Journal of chromatography. A**, v. 1009, n. 1, p. 171–178, 2003.

HAMRITA, B.; CHAHED, K.; TRIMECHE, M.; et al. Proteomics-based identification of alpha1-antitrypsin and haptoglobin precursors as novel serum markers in infiltrating ductal breast carcinomas. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 404, n. 2, p. 111–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19306859>>. Acesso em: 12/5/2014.

HARBECK, N.; SOTLAR, K.; WUERSTLEIN, R.; DOISNEAU-SIXOU, S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: today and tomorrow. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 3, p. 434–44, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24138841>>. Acesso em: 29/4/2014.

HASUMI, M.; SUZUKI, K.; MATSUI, H.; et al. Regulation of metallothionein and zinc transporter expression in human prostate cancer cells and tissues. **Cancer Letters**, v. 200, n. 2, p. 187–195, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383503004415>>. Acesso em: 22/5/2014.

HEIDENREICH, A.; BELLMUNT, J.; BOLLA, M.; et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part I: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. **Actas Urológicas**

Espanólas (English Edition), v. 35, n. 9, p. 501–514, 2011. AEU. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2173578611000795>>. Acesso em: 1/5/2014.

HESSELS, D.; RITTENHOUSE, H. G.; SCHALKEN, J. A. Molecular Diagnostics in Prostate Cancer. **EAU Update Series**, v. 3, n. 4, p. 200–213, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570912405000462>>. Acesso em: 1/5/2014.

HUBER, L. A. Is proteomics heading in the wrong direction? **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 1, p. 74–80, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511871>>. .

IJSSELSTIJN, L.; DEKKER, L. J. M.; STINGL, C.; et al. Serum levels of pregnancy zone protein are elevated in presymptomatic Alzheimer's disease. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 11, p. 4902–10, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21879768>>. .

IMRE, T.; KREMMER, T.; HÉBERGER, K.; et al. Mass spectrometric and linear discriminant analysis of N-glycans of human serum alpha-1-acid glycoprotein in cancer patients and healthy individuals. **Journal of proteomics**, v. 71, n. 2, p. 186–97, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617146>>. Acesso em: 1/5/2014.

JANCIAUSKIENE, S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1535, n. 3, p. 221–35, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278163>>. .

JANCIAUSKIENE, S. M.; BALS, R.; KOCZULLA, R.; et al. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. **Respiratory medicine**, v. 105, n. 8, p. 1129–39, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21367592>>. Acesso em: 1/5/2014.

JANKOVIĆ, M. Glycans as Biomarkers: Status and Perspectives. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 213–223, 2011. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/jomb.2011.30.issue-3/v10011-011-0023-5/v10011-011-0023-5.xml>>. Acesso em: 1/5/2014.

JIA, L.; WAXMAN, D. J. Thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor enhance responsiveness of KM12 colon tumor to metronomic cyclophosphamide but have disparate effects on tumor metastasis. **Cancer letters**, v. 330, n. 2, p. 241–9, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3563872&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/5/2014.

KAZUNO, S.; FUJIMURA, T.; ARAI, T.; et al. Multi-sequential surface plasmon resonance analysis of haptoglobin-lectin complex in sera of patients with malignant and benign prostate diseases. **Analytical biochemistry**, v. 419, n. 2, p. 241–9, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907698>>. Acesso em: 1/5/2014.

KIM, E. H.; MISEK, D. E. Glycoproteomics-based identification of cancer biomarkers. **International journal of proteomics**, v. 2011, p. 601937, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3195811&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/5/2014.

KIM, E. K.; CHOI, E.-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1802, n. 4, p. 396–405, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20079433>>. Acesso em: 1/5/2014.

KITO, K.; ITO, T. Mass spectrometry-based approaches toward absolute quantitative proteomics. **Current genomics**, v. 9, n. 4, p. 263–74, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2682933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

KNEZEVIC, A.; POLASEK, O.; GORNIK, O.; et al. Variability , Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome Variability , Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 1, p. 694–701, 2009.

KOČEVAR, N.; HUDLER, P.; KOMEL, R. The progress of proteomic approaches in searching for cancer biomarkers. **New biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 319–26, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23165098>>. Acesso em: 17/11/2013.

KORKES, F.; KA, S.; MO, G.; et al. Biópsias prostáticas contendo neoplasia intraepitelial e proliferação acinar atípica : o que fazer ? **Einstein**, v. 7, n. 4, p. 411–414, 2009.

KUMADA, Y.; OHIGASHI, Y.; EMORI, Y.; et al. Improved lectin ELISA for glycosylation analysis of biomarkers using PS-tag-fused single-chain Fv. **Journal of immunological methods**, v. 385, n. 1-2, p. 15–22, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22884622>>. Acesso em: 1/5/2014.

KUMAR, A.; SARDE, S. J.; BHANDARI, A. Revising angiotensinogen from phylogenetic and genetic variants perspectives. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 446, n. 2, p. 504–18, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631685>>. Acesso em: 9/5/2014.

KUVIBIDILA, S.; RAYFORD, W. Correlation between serum prostate-specific antigen and alpha-1-antitrypsin in men without and with prostate cancer. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 147, n. 4, p. 174–81, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16581345>>. Acesso em: 1/5/2014.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45–55, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3016214&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29/4/2014.

LAUC, G.; ESSAFI, A.; HUFFMAN, J. E.; et al. Genomics meets glycomics-the first GWAS study of human N-Glycome identifies HNF1 α as a master regulator of plasma protein fucosylation. **PLoS genetics**, v. 6, n. 12, p. e1001256, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3009678&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/4/2014.

LEERAPUN, A.; SURAVARAPU, S. V; BIDA, J. P.; et al. The utility of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population. **Clinical gastroenterology and hepatology : the**

official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association, v. 5, n. 3, p. 394–402; quiz 267, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1931510&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/5/2014.

LI, W.; YU, J.; XU, H.; BAO, J. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 414, n. 2, p. 282–6, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951850>>. Acesso em: 29/4/2014.

LI, X.-H.; LI, C.; XIAO, Z.-Q. Proteomics for identifying mechanisms and biomarkers of drug resistance in cancer. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 12, p. 2642–9, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21964283>>. Acesso em: 1/5/2014.

LIN, S.-F.; WEI, H.; MAEDER, D.; FRANKLIN, R. B.; FENG, P. Profiling of zinc-altered gene expression in human prostate normal vs. cancer cells: a time course study. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 20, n. 12, p. 1000–12, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2821158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/5/2014.

LIN, Y.; GOEDEGEBUURE, P. S.; TAN, M. C. B.; et al. Proteins Associated with Disease and Clinical Course in Pancreas Cancer : A Proteomic Analysis of Plasma in Surgical Patients research articles. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 1, p. 2169–2176, 2006.

LIU, B.; PENG, H.; YAO, Q.; et al. Bioinformatics analyses of the mannose-binding lectins from *Polygonatum cyrtoneura*, *Ophiopogon japonicus* and *Liparis novosa* with antiproliferative and apoptosis-inducing activities. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 16, n. 6-7, p. 601–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200699>>. Acesso em: 12/5/2014.

LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics proteolytic digestion and liquid chromatography in com-. , v. 76, n. 14, p. 4193–4201, 2004.

LU, C.-H.; LIN, S.-T.; CHOU, H.-C.; LEE, Y.-R.; CHAN, H.-L. Proteomic analysis of retinopathy-related plasma biomarkers in diabetic patients. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 529, n. 2, p. 146–56, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220024>>. Acesso em: 1/5/2014.

MALIK, G.; WARD, M. D.; GUPTA, S. K.; et al. Serum Levels of an Isoform of Apolipoprotein A-II as a Potential Marker for Prostate Cancer Serum Levels of an Isoform of Apolipoprotein A-II as a Potential Marker for Prostate Cancer. , p. 1073–1085, 2005.

MARTINKOVA, J.; GADHER, S. J.; HAJDUCH, M.; KOVAROVA, H. Challenges in cancer research and multifaceted approaches for cancer biomarker quest. **FEBS letters**, v. 583, n. 11, p. 1772–84, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327356>>. Acesso em: 1/5/2014.

MATOS, A R.; COUTINHO-CAMILLO, C. M.; THULER, L. C. S.; et al. Expression analysis of thrombospondin 2 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia.

Experimental and molecular pathology, v. 94, n. 3, p. 438–44, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470460>>. Acesso em: 1/5/2014.

MEDVEDEV, A.; KOPYLOV, A.; BUNEEVA, O.; ZGODA, V.; ARCHAKOV, A. Affinity-based proteomic profiling: problems and achievements. **Proteomics**, v. 12, n. 4-5, p. 621–37, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22246677>>. Acesso em: 8/11/2013.

MEGGER, D. A.; POTT, L. L.; AHRENS, M.; et al. Comparison of label-free and label-based strategies for proteome analysis of hepatoma cell lines. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1844, n. 5, p. 967–76, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23954498>>. Acesso em: 24/5/2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

MIRANDA-RIBERA, A.; LECCHI, C.; BRONZO, V.; et al. Down-regulatory effect of alpha 1-acid glycoprotein on bovine neutrophil degranulation. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 33, n. 4, p. 291–306, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167758>>. Acesso em: 21/5/2014.

MITCHELL, P. Improvements in technology are making proteomics research less descriptive and more analytic, but the field has yet to deliver on its aspirations. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 665–670, 2010.

MONZO, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 423–432, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993607000350>>. Acesso em: 12/5/2014.

MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A. C. O.; HORTA, A. C. G.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DIOCLEA ALTISSIMA VAR. MEGACARPA SEED LECTIN. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 139–144, 1997.

MOREIRA, R. D. A.; PERRONE, J. C. Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant physiology**, v. 59, n. 5, p. 783–7, 1977. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=543296&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MORONI, M.; PORTA, C.; AMICI, M. DE; et al. Eosinophils and C4 predict clinical failure of combination immunotherapy with very low dose subcutaneous interleukin-2 and interferon in renal cell carcinoma patients. **Haematologica**, v. 85, n. 3, p. 298–303, 2000.

MORTEZAI, N.; WAGENER, C.; BUCK, F. Combining lectin affinity chromatography and immunodepletion - A novel method for the enrichment of disease-specific glycoproteins in human plasma. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 56, n. 2, p. 254–9, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209749>>. Acesso em: 2/5/2014.

MUELLER, L. N.; BRUSNIAK, M.; MANI, D. R.; AEBERSOLD, R. An Assessment of Software Solutions for the Analysis of Mass Spectrometry Based Quantitative Proteomics Data reviews. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 1, p. 51–61, 2008.

NARISADA, M.; KAWAMOTO, S.; KUWAMOTO, K.; et al. Identification of an inducible factor secreted by pancreatic cancer cell lines that stimulates the production of fucosylated haptoglobin in hepatoma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 377, n. 3, p. 792–6, 2008. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951869>>. Acesso em: 1/5/2014.

OELJEKLAUS, S.; MEYER, H. E.; WARSCHEID, B. New dimensions in the study of protein complexes using quantitative mass spectrometry. **FEBS letters**, v. 583, n. 11, p. 1674–83, 2009. Federation of European Biochemical Societies. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376113>>. Acesso em: 1/5/2014.

PAL, R. P.; MAITRA, N. U.; MELLON, J. K.; KHAN, M. A. Defining prostate cancer risk before prostate biopsy. **Urologic oncology**, v. 31, n. 8, p. 1408–18, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22795499>>. Acesso em: 1/5/2014.

PENG, J.; ELIAS, J. E.; THOREEN, C. C.; LICKLIDER, L. J.; GYGI, S. P. Evaluation of Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC / LC - MS / MS) for Large-Scale Protein Analysis : The Yeast Proteome research articles. **Journal of proteome research**, v. 43, n. 2, p. 43–50, 2003.

PIN, E.; FREDOLINI, C.; PETRICOIN, E. F. The role of proteomics in prostate cancer research: biomarker discovery and validation. **Clinical biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 524–38, 2013. The Canadian Society of Clinical Chemists. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266295>>. Acesso em: 27/11/2013.

PLATZ, E. A.; DE MARZO, A. M.; ERLINGER, T. P.; et al. No association between pre-diagnostic plasma C-reactive protein concentration and subsequent prostate cancer. **The Prostate**, v. 59, n. 4, p. 393–400, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15065087>>. Acesso em: 21/5/2014.

RABILLOUD, T.; CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 11, p. 2064–77, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20685252>>. Acesso em: 28/4/2014.

RAI, A. J.; GELFAND, C. A.; HAYWOOD, B. C.; et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. **Proteomics**, v. 5, n. 13, p. 3262–77, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16052621>>. Acesso em: 12/5/2014.

RANGEL, T. B. A.; ASSREUY, A. M. S.; PIRES, A. D. F.; et al. Crystallization and characterization of an inflammatory lectin purified from the seeds of *Dioclea wilsonii*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 6, p. 5087–103, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21694673>>. Acesso em: 1/5/2014.

REHMAN, I.; EVANS, C. A.; GLEN, A.; et al. iTRAQ identification of candidate serum biomarkers associated with metastatic progression of human prostate cancer. **PLoS one**, v. 7, n. 2, p. e30885, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3280251&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/5/2014.

RHODEN, E. L.; AVERBECK, M. A. Localized prostate cancer. **Revista da AMRIGS**, v. 54, n. 1, p. 92–99, 2010.

RODRÍGUEZ-PIÑEIRO, A. M.; AYUDE, D.; RODRÍGUEZ-BERROCAL, F. J.; PÁEZ DE LA CADENA, M. Concanavalin A chromatography coupled to two-dimensional gel electrophoresis improves protein expression studies of the serum proteome. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 803, n. 2, p. 337–43, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15063345>>. Acesso em: 1/5/2014.

ROSENZWEIG, C. N.; ZHANG, Z.; SUN, X.; et al. Predicting prostate cancer biochemical recurrence using a panel of serum proteomic biomarkers. **The Journal of urology**, v. 181, n. 3, p. 1407–14, 2009. American Urological Association. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19157448>>. Acesso em: 1/5/2014.

SAITO, S.; MURAYAMA, Y.; PAN, Y.; et al. Haptoglobin-beta chain defined by monoclonal antibody RM2 as a novel serum marker for prostate cancer. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 123, n. 3, p. 633–40, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18464263>>. Acesso em: 1/5/2014.

SALDOVA, R.; FAN, Y.; FITZPATRICK, J. M.; WATSON, R. W. G.; RUDD, P. M. Core fucosylation and alpha2-3 sialylation in serum N-glycome is significantly increased in prostate cancer comparing to benign prostate hyperplasia. **Glycobiology**, v. 21, n. 2, p. 195–205, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20861084>>. Acesso em: 1/5/2014.

SALDOVA, R.; WORMALD, M. R.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M. Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis. **Disease markers**, v. 25, n. 4-5, p. 219–32, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3827796&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

SARAFANOV, A. G.; TODOROV, T. I.; KAJDACSZY-BALLA, A.; et al. Analysis of iron, zinc, selenium and cadmium in paraffin-embedded prostate tissue specimens using inductively coupled plasma mass-spectrometry. **Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 22, n. 4, p. 305–14, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013358>>. Acesso em: 22/5/2014.

SCHIESS, R.; WOLLSCHIED, B.; AEBERSOLD, R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. **Molecular oncology**, v. 3, n. 1, p. 33–44, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2753590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18/11/2013.

SCHRÖDER, F. H.; ROOBOL, M. J. Prostate cancer epidemic in sight? **European urology**, v. 61, n. 6, p. 1093–5, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22464308>>. Acesso em: 1/5/2014.

SCHWAMBORN, K. Imaging mass spectrometry in biomarker discovery and validation. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 16, p. 4990–8, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749859>>. Acesso em: 28/4/2014.

SHAMAA, M. M.; FOUAD, H.; HAROUN, M.; HASSANEIN, M.; HAY, M. A. A. Association between the Angiotensinogen (AGT) gene (M235T) polymorphism and Essential Hypertension in Egyptian patients. **The Egyptian Heart Journal**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2013. The Egyptian Heart Journal. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1110260813000951>>. Acesso em: 22/5/2014.

SHARON, N. Reflections: Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules Nathan Sharon. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753–2764, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R–62R, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229195>>. Acesso em: 2/5/2014.

SHIRAI, R.; HIRANO, F.; OHKURA, N.; IKEDA, K.; INOUE, S. Up-regulation of the expression of leucine-rich alpha(2)-glycoprotein in hepatocytes by the mediators of acute-phase response. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 382, n. 4, p. 776–9, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19324010>>. Acesso em: 1/5/2014.

SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; BICCA, R.; ALENCASTRO, D.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453–462, 2009.

SILVA, J. C.; GORENSTEIN, M. V.; LI, G.-Z.; VISSERS, J. P. C.; GEROMANOS, S. J. Absolute Quantification of Proteins by LCMSE. **Molecular & Cellular Proteomics** 5.1, v. 5, n. 1, p. 144–156, 2006.

SINGH, H.; SARATHI, S. P. Insight of Lectins- A review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 3, n. 4, p. 1–9, 2012.

SIWY, J.; VLAHOU, A.; ZIMMERLI, L. U.; ZÜRBIG, P.; SCHIFFER, E. Clinical proteomics: current techniques and potential applications in the elderly. **Maturitas**, v. 68, n. 3, p. 233–44, 2011. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21112166>>. Acesso em: 1/5/2014.

SMITH, R. A.; COKKINIDES, V.; BRAWLEY, O. W. Cancer Screening in the United States , 2012 A Review of Current American Cancer Society Guidelines and Current Issues in Cancer Screening. , v. 62, n. 2, p. 129–142, 2012.

STANGELBERGER, A.; WALDERT, M.; DJAVAN, B. Prostate cancer in elderly men. **Reviews in urology**, v. 10, n. 2, p. 111–9, 2008. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2483315&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 9, p. 699–711, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15340378>>. Acesso em: 28/4/2014.

TISSOT, B.; NORTH, S. J.; CERONI, A.; et al. Glycoproteomics: past, present and future. **FEBS letters**, v. 583, n. 11, p. 1728–35, 2009. Federation of European Biochemical Societies. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2753369&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/11/2013.

LO TURCO, E. G.; SOUZA, G. H. M. F.; GARCIA, J. S.; et al. Effect of endometriosis on the protein expression pattern of follicular fluid from patients submitted to controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 25, n. 7, p. 1755–66, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20427520>>. Acesso em: 1/5/2014.

UMMANNI, R.; JUNKER, H.; ZIMMERMANN, U.; et al. Prohibitin identified by proteomic analysis of prostate biopsies distinguishes hyperplasia and cancer. **Cancer letters**, v. 266, n. 2, p. 171–85, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18384941>>. Acesso em: 1/5/2014.

URBAS, L.; BRNE, P.; GABOR, B.; et al. Depletion of high-abundance proteins from human plasma using a combination of an affinity and pseudo-affinity column. **Journal of chromatography. A**, v. 1216, n. 13, p. 2689–94, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010473>>. Acesso em: 24/5/2014.

UZUN, L.; ARMUTCU, C.; BIÇEN, Ö.; et al. Simultaneous depletion of immunoglobulin G and albumin from human plasma using novel monolithic cryogel columns. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 112, p. 1–8, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23928053>>. Acesso em: 1/5/2014.

VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 1, p. 1–18, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656082>>. Acesso em: 27/11/2013.

VILLANUEVA, J.; SHAFFER, D. R.; PHILIP, J.; et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 271–284, 2006.

WANG, F.; PEARSON, K. J.; DAVIDSON, W. S.; TSO, P. Specific sequences in N termini of apolipoprotein A-IV modulate its anorectic effect. **Physiology & behavior**, v. 120, p. 136–42, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23911688>>. Acesso em: 24/5/2014.

WASINGER, V. C.; CORTHALS, G. L. Proteomic tools for biomedicine. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 771, n. 1-2, p. 33–48, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015991>>. .

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report 2008. In: P. Boyle; B. Levin (Eds.); p.1–500, 2008. Lyon.

XING, P. X.; YOUNG, G. P.; HO, D.; et al. A new approach to fecal occult blood testing based on the detection of haptoglobin. **Cancer**, v. 78, n. 1, p. 48–56, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8646726>>. .

YANG, Z.; HARRIS, L. E.; PALMER-TOY, D. E.; HANCOCK, W. S. Multilectin affinity chromatography for characterization of multiple glycoprotein biomarker candidates in serum from breast cancer patients. **Clinical chemistry**, v. 52, n. 10, p. 1897–905, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16916992>>. Acesso em: 1/5/2014.

YOU, J.; COZZI, P.; WALSH, B.; et al. Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 73, n. 1, p. 10–22, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19328712>>. Acesso em: 1/5/2014.

YU, K. H.; RUSTGI, A. K.; BLAIR, I. A. Characterization of Proteins in Human Pancreatic Cancer Serum Using Differential Gel Electrophoresis and Tandem Mass Spectrometry research articles. **Journal of proteome research**, v. 4, n. 1, p. 1742–1751, 2005.

ZENG, Z.; HINCAPIE, M.; HAAB, B. B.; et al. The development of an integrated platform to identify breast cancer glycoproteome changes in human serum. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 19, p. 3307–15, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782370>>. Acesso em: 1/5/2014.

ZHANG, Y.; TANG, X.; YAO, L.; et al. Lectin capture strategy for effective analysis of cell secretome. **Proteomics**, v. 12, n. 1, p. 32–6, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22065611>>. Acesso em: 1/5/2014.

ZHOU, J.; HU, Y.; LIN, Y.; LIU, H.; XIE, P. Preparation and application of a partially degradable gel in mass spectrometry-based proteomic analysis. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 879, n. 28, p. 2957–62, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920827>>. Acesso em: 1/5/2014.

ZHU, X.; ALBERTSEN, P. C.; ANDRIOLE, G. L.; et al. Risk-based prostate cancer screening. **European urology**, v. 61, n. 4, p. 652–61, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134009>>. Acesso em: 1/5/2014.

APÊNDICE A – GLICOPROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA FRAÇÃO RETIDA PELA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM MATRIZ DAL-SEPHAROSE.

Acesso	Descrição	Escore	"Única"	Razão Controle:CaP	Razão HPB:CaP	Razão HPB:Controle
ZN488_HUMAN	Zinc finger protein 488	368	CaP			
A2GL_HUMAN	Leucine rich alpha 2 glycoprotein	2364	CaP			
LHX2_HUMAN	LIM homeobox protein Lhx2	172	CaP			
TNR5_HUMAN	Isoform 2 of Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5	148	CaP			
KI20B_HUMAN	Isoform 4 of Kinesin like protein KIF20B	221	CaP			
MAST4_HUMAN	Isoform 3 of Microtubule associated serine threonine protein kinase 4	239	CaP			
ODPB_HUMAN	Isoform 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta mitochondrial	200	CaP			
M3K7_HUMAN	Isoform 1A of Mitogen activated protein kinase kinase kinase 7	170	CaP			
HV206_HUMAN	Ig heavy chain V 2 region WAH	201	CaP			
GP143_HUMAN	G protein coupled receptor 143	134	CaP			
DPOLA_HUMAN	DNA polymerase alpha catalytic subunit	55	CaP			
COMP_HUMAN	Cartilage oligomeric matrix protein	136	CaP			
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A I	311	CaP			
VTNC_HUMAN	Vitronectin	195	Controle			
GLPK3_HUMAN	Putative glycerol kinase 3	200	Controle			
PSA7_HUMAN	Proteasome subunit alpha type 7	329	Controle			
PAX9_HUMAN	Paired box protein Pax 9	150	Controle			

NRK_HUMAN	Nik related protein kinase	148	Controle			
MYH2_HUMAN	Myosin 2	165	Controle			
MYH11_HUMAN	Myosin 11	71	Controle			
MYH1_HUMAN	Myosin 1	136	Controle			
MTFR1_HUMAN	Mitochondrial fission regulator 1	197	Controle			
K1C10_HUMAN	Keratin type I cytoskeletal 10	209	Controle			
KPTN_HUMAN	Kaptin	165	Controle			
PTPRD_HUMAN	Isoform Fetal brain of Receptor type tyrosine protein phosphatase delta OS Homo sapiens GN PTPRD	271	Controle			
SYNE1_HUMAN	Isoform Beta 2 of Nesprin 1	117	Controle			
KI2L4_HUMAN	Isoform 6 of Killer cell immunoglobulin like receptor 2DL4	233	Controle			
VKIND_HUMAN	Isoform 5 of Protein very KIND	203	Controle			
TRM11_HUMAN	Isoform 3 of tRNA guanosine 2 O methyltransferase TRM11 homolog	137	Controle			
RIMB1_HUMAN	Isoform 3 of Peripheral type benzodiazepine receptor associated protein 1	77	Controle			
CNOT1_HUMAN	Isoform 3 of CCR4 NOT transcription complex subunit 1	53	Controle			
GLPK_HUMAN	Isoform 2 of Glycerol kinase	206	Controle			
NDST2_HUMAN	Isoform 2 of Bifunctional heparan sulfate N deacetylase N sulfotransferase 2	283	Controle			
NAV2_HUMAN	Isoform 13 of Neuron navigator 2	280	Controle			
LV107_HUMAN	Ig lambda chain V I region BL2	797	Controle			
KV405_HUMAN	Ig kappa chain V IV region STH Fragment	666	Controle			
KV401_HUMAN	Ig kappa chain V IV region Fragment	583	Controle			

HV106_HUMAN	Ig heavy chain V I region SIE	461	Controle			
CARM1_HUMAN	Histone arginine methyltransferase CARM1	115	Controle			
HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta 1	275	Controle			
RN135_HUMAN	E3 ubiquitin protein ligase RNF135	184	Controle			
KIN17_HUMAN	DNA RNA binding protein KIN17	153	Controle			
CSPG4_HUMAN	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	32	Controle			
BAHC1_HUMAN	BAH and coiled coil domain containing protein 1	55	Controle			
TEN1_HUMAN	Teneurin 1	259	HPB			
SAA4_HUMAN	Serum amyloid A 4 protein	244	HPB			
YN001_HUMAN	Putative uncharacterized protein CS0DJ013YG01	346	HPB			
OSBL5_HUMAN	Oxysterol binding protein related protein 5	343	HPB			
COLQ_HUMAN	Isoform V2 of Acetylcholinesterase collagenic tail peptide	420	HPB			
BMAL2_HUMAN	Isoform MOP9 short form of Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like protein 2	280	HPB			
DMD_HUMAN	Isoform Dystrophin 3 of Dystrophin	48	HPB			
STAU2_HUMAN	Isoform 5 of Double stranded RNA binding protein Staufen homolog 2	715	HPB			
ZMYM4_HUMAN	Isoform 4 of Zinc finger MYM type protein 4	203	HPB			
CV034_HUMAN	Isoform 3 of Uncharacterized protein C22orf34	215	HPB			
MFRN2_HUMAN	Isoform 3 of Mitoferrin 2	176	HPB			
NDUV3_HUMAN	Isoform 2 of NADH dehydrogenase ubiquinone flavoprotein 3 mitochondrial	35	HPB			
LV302_HUMAN	Ig lambda chain V 2I region LOI	552	HPB			
KV310_HUMAN	Ig kappa chain V 2I region VH Fragment	389	HPB			

KV121_HUMAN	Ig kappa chain V I region Ni	489	HPB			
KV101_HUMAN	Ig kappa chain V I region AG	1127	HPB			
GDPD3_HUMAN	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing protein 3	280	HPB			
GIMA2_HUMAN	GTPase IMAP family member 2	431	HPB			
CA156_HUMAN	UPF0558 protein C1orf156	608		0,65	1,65	2,53
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P component	439				0,24
CD14_HUMAN	Monocyte differentiation antigen CD14	1754		0,19	0,21	1,11
K2C1_HUMAN	Keratin type 2 cytoskeletal 1	317		0,44	0,62	1,4
K1C9_HUMAN	Keratin type I cytoskeletal 9	509		0,43	0,86	2,01
IGHM_HUMAN	Isoform Membrane bound of Ig mu chain C region	32526		0,64	0,51	0,8
ATRN_HUMAN	Isoform 3 of Attractin OS Homo sapiens GN ATRN	219		0,92	0,95	1,03
A1AT_HUMAN	Isoform 3 of Alpha 1 antitrypsin	1498		0,19	0,48	2,53
ALBU_HUMAN	Isoform 2 of Serum albumin	740		0,36	0,35	0,96
PZP_HUMAN	Isoform 2 of Pregnancy zone protein	5574		0,15	0,15	0,97
HPTR_HUMAN	Isoform 2 of Haptoglobin related protein	340		0,11	3,63	32,14
PRKDC_HUMAN	Isoform 2 of DNA dependent protein kinase catalytic subunit	62				5,81
CLUS_HUMAN	Isoform 2 of Clusterin	185		1,07	1,27	1,19
ALS_HUMAN	Insulin like growth factor binding protein complex acid labile subunit	323		0,61	0,6	0,99
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain	25365		0,43	0,68	1,57
MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein	26267		0,67	0,55	0,84
LV209_HUMAN	Ig lambda chain V 2 region WIN	1535		0,93	0,7	0,76
LV204_HUMAN	Ig lambda chain V 2 region TRO	1436		4,62	2,41	0,52

LV206_HUMAN	Ig lambda chain V 2 region MGC	1431		0,97		
LV106_HUMAN	Ig lambda chain V I region WAH	1742				2,27
LV104_HUMAN	Ig lambda chain V I region NIG 64	917				1,79
LV102_HUMAN	Ig lambda chain V I region HA	1431		1,45	1,9	1,31
LAC7_HUMAN	Ig lambda 7 chain C region	24790		0,22	0,25	1,13
LAC6_HUMAN	Ig lambda 6 chain C region	42857		0,9	0,84	0,92
LAC3_HUMAN	Ig lambda 3 chain C regions	66590		0,69	0,48	0,69
LAC2_HUMAN	Ig lambda 2 chain C regions	66590		0,67	0,64	0,94
LAC1_HUMAN	Ig lambda 1 chain C regions	57495		0,59	0,7	1,19
KV402_HUMAN	Ig kappa chain V IV region Len	515				1,46
KV305_HUMAN	Ig kappa chain V 2I region WOL	3107			0,38	
KV309_HUMAN	Ig kappa chain V 2I region VG Fragment	999				0,9
KV304_HUMAN	Ig kappa chain V 2I region Ti	3687		0,53	0,79	1,49
KV302_HUMAN	Ig kappa chain V 2I region SIE	3107		0,22	0,38	1,72
KV303_HUMAN	Ig kappa chain V 2I region NG9 Fragment	169		0,86	1,04	1,21
KV312_HUMAN	Ig kappa chain V 2I region HAH	7574			1,15	
KV307_HUMAN	Ig kappa chain V 2I region GOL	3107		0,65	0,6	0,93
KV204_HUMAN	Ig kappa chain V 2 region TEW	4455		2,46	4,66	1,9
KV206_HUMAN	Ig kappa chain V 2 region RPMI 6410	3321		1,2	1,79	1,49
KV205_HUMAN	Ig kappa chain V 2 region GM607 Fragment	9889			0,53	
KV201_HUMAN	Ig kappa chain V 2 region Cum	3294		0,61		
IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	62095		0,41	0,49	1,2
HV302_HUMAN	Ig heavy chain V 2I region WEA	2055		2,97	3,19	1,06
HV31HUMAN	Ig heavy chain V 2I region WAS	2604		0,32	1,04	3,25
HV303_HUMAN	Ig heavy chain V 2I region VH26	8873		0,33	0,41	1,26
HV318_HUMAN	Ig heavy chain V 2I region TUR	2610		0,64	0,25	0,39
HV304_HUMAN	Ig heavy chain V 2I region TIL	2791		0,64	0,78	1,22

HV316_HUMAN	Ig heavy chain V 2I region TEI	3537		0,17	0,34	2,01
HV313_HUMAN	Ig heavy chain V 2I region POM	2610		0,49	0,45	0,92
HV320_HUMAN	Ig heavy chain V 2I region GAL	398		1,15	1,57	1,36
HV305_HUMAN	Ig heavy chain V 2I region BRO	5566		0,46	0,76	1,65
IGHG4_HUMAN	Ig gamma 4 chain C region	11835		0,12	0,43	3,63
IGHG3_HUMAN	Ig gamma 3 chain C region	19515		0,17	0,35	2,1
IGHG2_HUMAN	Ig gamma 2 chain C region	13123		0,35	0,34	0,95
IGHG1_HUMAN	Ig gamma 1 chain C region	14046		0,76	0,9	1,2
IGHA2_HUMAN	Ig alpha 2 chain C region	17778		0,28	0,23	0,79
IGHA1_HUMAN	Ig alpha 1 chain C region	19198		0,43	0,62	1,43
HRG_HUMAN	Histidine rich glycoprotein	142				2,36
HEMO_HUMAN	Hemopexin	4817		0,49	0,83	1,7
HPT_HUMAN	Haptoglobin	1324		0,27	0,43	1,6
CO7_HUMAN	Complement component C7	1158		0,28	0,46	1,65
CO4B_HUMAN	Complement C4 B	5458		0,82	0,86	1,05
CO4A_HUMAN	Complement C4 A	5345		0,23	0,45	1,95
CO3_HUMAN	Complement C3	30221		1,9	1,6	0,85
CO2_HUMAN	Complement C2	175		1,23	1,39	1,14
CD5L_HUMAN	CD5 antigen like	8858		0,44	0,67	1,52
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	1727		0,85	0,8	0,94
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C 2I	464		0,66	0,42	0,63
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B 100	789		0,66	0,92	1,38
ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	567		0,3		
A2MG_HUMAN	Alpha 2 macroglobulin	51439		0,5	0,93	1,88
A1AG1_HUMAN	Alpha 1 acid glycoprotein 1	668		0,13	0,19	1,46

APÊNDICE B - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA FINR -FRAÇÃO IMUNODEPLETADA NÃO RETIDA PELA CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDADE EM MATRIZ DAL-SEPHAROSE.

Acesso	Descrição	Escore	"Única"	Razão Controle:CaP	Razão HPB:CaP	Razão HPB:Controle
A1AG1_HUMAN	Alpha 1 acid glycoprotein 1	6114		0,96	1,05	1,09
A1AG2_HUMAN	Alpha 1 acid glycoprotein 2	1569		1,75	1,09	0,63
A1BG_HUMAN	Alpha 1B glycoprotein	1292		1,63	1,16	0,71
A2AP_HUMAN	Alpha 2 antiplasmin	1019	Controle			
A8K5A4_HUMAN	cDNA FLJ76826 highly similar to Homo sapiens ceruloplasmin ferroxidase CP mRNA	4841		1,23	0,96	0,78
AACT_HUMAN	Alpha 1 antichymotrypsin	2927		1,77	1,3	0,73
AFAM_HUMAN	Afamin	234		1,99	1,19	0,59
ANT3_HUMAN	Antithrombin 2I	475				0,58
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A IV	580		4,06	2,16	0,54
B2M1S8_HUMAN	Delta globin B2 variant Fragment	12310	Controle			
B4DPP8_HUMAN	cDNA FLJ53075 highly similar to Kininogen 1	712		2,64	1,75	0,66
B4DU16_HUMAN	cDNA FLJ54550 highly similar to fibronectin 1 FN1 transcript variant 6 mRNA	642	Controle			
B4E1B2_HUMAN	cDNA FLJ53691 highly similar to Serotransferrin	62063		1,54	1,08	0,7
B4E1B3_HUMAN	cDNA FLJ53950 highly similar to Angiotensinogen	130				0,59
B4E1Z4_HUMAN	Complement factor B	2544		1,48	1,19	0,8
B7Z544_HUMAN	cDNA FLJ51742 highly similar to Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain H4	195		2,14	1,25	0,58
B7ZLE5_HUMAN	FN1 protein OS Homo sapiens GN FN1 PE 2	678	Controle			

	SV 1					
C6KXN3_HUMAN	Lambda light chain of human immunoglobulin surface antigen related protein Fragment	9184		0,42		
C9JEV0_HUMAN	Zinc alpha 2 glycoprotein	2287	HPB			
CFAH_HUMAN	Complement factor H	260		2,46	1,68	0,69
CO9_HUMAN	Complement component C9	104	HPB			
D6RF35_HUMAN	Vitamin D binding protein	1390		1,8	1,48	0,82
D9IWP9_HUMAN	Beta 2 glycoprotein I Fragment	2634		2,2	1,77	0,8
E9M4D4_HUMAN	Hemoglobin alpha 1 globin chain Fragment	4179		3,03	0,68	0,22
E9PFT6_HUMAN	Hemoglobin subunit delta	12310				0,15
FETUA_HUMAN	Alpha 2 HS glycoprotein	2031		3,78	2,41	0,64
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	29376		3,03	0,68	0,22
LUM_HUMAN	Lumican	128	Controle			
O95408_HUMAN	Beta globin Fragment	18877	Controle			
Q0KKI6_HUMAN	Immunoglobulin light chain Fragment	20718			1,52	
Q14476_HUMAN	G gamma hemoglobin gene from Greek HPFH mutant Fragment	9093	CaP			
Q4JLR8_HUMAN	Hemoglobin beta chain Fragment	12476	CaP			
Q53H26_HUMAN	Transferrin variant Fragment	68232		2,41	1,73	0,72
Q569I7_HUMAN	Uncharacterized protein	6077		2,59		
Q5EFE6_HUMAN	Anti RhD monoclonal T125 kappa light chain	20725		2,01	1,07	0,53
Q5FWF9_HUMAN	IGL protein	3728			1,28	
Q5T985_HUMAN	Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain H2	441		3,22	1,75	0,55
Q5VY30_HUMAN	Plasma retinol binding protein 1 182	671				0,52
Q6GMV8_HUMAN	Uncharacterized protein	9104		2,56	1,05	0,41
Q6J1Z7_HUMAN	Hemoglobin beta Fragment	12482			0,42	
Q6MZV6_HUMAN	Putative uncharacterized protein	2525				0,55

	DKFZp686L19235					
Q6MZX9_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686M08189	2541		20,7	6,05	0,29
Q6N096_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686I15196	458	Controle			
Q6P5S3_HUMAN	Uncharacterized protein	8763				0,68
Q6ZW64_HUMAN	cDNA FLJ41552 fis clone COLON2004478 highly similar to Protein Tro alpha1 H myeloma	6019				0,65
Q7Z3Y4_HUMAN	Uncharacterized protein	20718		0,94	0,47	0,5
Q7Z7B3_HUMAN	Beta globin variant Fragment	2551	Controle			
Q8NEJ1_HUMAN	Uncharacterized protein	9101		0,76	0,79	1,03
Q9BWU5_HUMAN	Mutant hemoglobin beta chain Fragment	26496	CaP			
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	67443				0,7
ZA2G_HUMAN	Zinc alpha 2 glycoprotein	2421		1,79	1,16	0,65

APÊNDICE C - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA FIR - FRAÇÃO IMUNODEPLETADA RETIDA PELA CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDADE EM MATRIZ DAL-SEPHAROSE.

Acesso	Description	Escore	"Única"	Razão CaP:HPB	Razão Controle:HPB	Razão Controle:CaP
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B 100	348		0,71	0,78	1,09
B4DIE5_HUMAN	cDNA FLJ60561 highly similar to Complement C4 B	82	Controle			
CO3_HUMAN	Complement C3	2506		0,76	1,04	1,38
CO4A_HUMAN	Complement C4 A	605			0,76	
E1A689_HUMAN	Mutant Apo B 100	342		2,05		
F8W7G7_HUMAN	Ugl Y3	370	Controle			
F8WEX7_HUMAN	Cholinesterase	70	Controle			
K1C10_HUMAN	Keratin type I cytoskeletal 10	173	Controle			
K2C1_HUMAN	Keratin type 2 cytoskeletal 1	169		0,76	0,63	0,83
L0R8D2_HUMAN	Alternative protein RCOR1	524	Controle			
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein	3993		2,83	0,78	0,28
Q06AH7_HUMAN	Transferrin	136	Controle			
Q69EZ7_HUMAN	Prothrombin B chain Fragment	391	Controle			
Q6GMW4_HUMAN	IGL protein	375	Controle			
Q6P5S8_HUMAN	IGK protein	2483	CaP			
Q7Z2U7_HUMAN	Uncharacterized protein	362	Controle			
Q86TT1_HUMAN	Full length cDNA clone CS0DD006YL02 of Neuroblastoma	732		0,45	0,26	0,58
VTNC_HUMAN	Vitronectin	216	Controle			

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA COLETA DE AMOSTRAS NO HOSPITAL DR. EVANDRO AIRES DE MOURA



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
ENSINANDO E APRENDENDO

UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Comitê de Ética em Pesquisa – COÉTICA

PARECER N.º. 427/2009

Projeto de Pesquisa: Perfil cromatográfico de glicoconjugados do soro de pacientes com Câncer de Próstata (CAP) e com Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) em coluna de Sepharose-Dioctea altíssima.

Pesquisador Responsável: Maria de Fátima Figueiredo

Data de apresentação ao COÉTICA: 19/11/09

Registro no COÉTICA: 09-447

CAAE: 0163.0.037.000-09

Parecer: Aprovado Ad Referendum na data de 01/12/09

Marília Joffily Pereira da Costa Parahyba

Prof. Marília Joffily Pereira da Costa Parahyba
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFOR – COÉTICA

ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA COLETA DE AMOSTRAS NO CENTRO INTEGRADO DE ONCOLOGIA DO ESTADO DO CEARÁ – CRIO

<p>UNIVERSIDADE DE</p> <p>FORTALEZA (UNIFOR)/</p> <p>FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ</p>	
--	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil comparativo entre proteínas e glicoproteínas sorológicas de pacientes com doença prostática e de indivíduos sem doença prostática.

Pesquisador: Leonardo Primo Bezerra

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 07894112.0.0000.5052

Instituição Proponente: Universidade de Fortaleza (UNIFOR)/ Fundação Edson Queiroz

Patrocinador Principal: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior ((CAPES))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 238.998

Data da Relatoria: 05/04/2013

Apresentação do Projeto:

Com a crescente incidência do câncer de próstata (CaP), surge a necessidade por pesquisar novos biomarcadores capazes de aprimorar o diagnóstico, a avaliação da agressividade, risco e progressão do tumor ou ainda de recaída da doença. Neste contexto, o presente trabalho pretende utilizar cromatografia de afinidade com lectina vegetais, imobilizadas em Sepharose 4B® ativada com Brometo de Cianogênio, e análise de espectrometria de massas na identificação possíveis biomarcadores sorológicos para o CaP. A população do estudo será composta por pacientes atendidos no serviço de urologia do no Centro Integrado de Oncologia do Ceará ζ CRIO. Os indivíduos serão agrupados segundo o diagnóstico em dois grupos: pacientes com doença prostática e indivíduos sem doença prostática. As amostras de sangue, aproximadamente 5 mL, de pacientes e controles, serão coletadas por punção venosa periférica e na ausência de anticoagulante. As amostras de soro obtidas serão submetidas, individualmente, e separadamente, à cromatografia de afinidade em coluna de Frutalina Sepharose e LTA-Sepharose, acoplada a um sistema de FPLC ÅKTApurifier 10 (GE Healthcare). As frações contendo as glicoproteínas isoladas por cromatografia de afinidade nas duas colunas propostas serão dialisadas exaustivamente contra água destilada e, posteriormente, concentradas em concentrador a vácuo. Posteriormente, essas frações serão, inicialmente, submetidos à digestão com tripsina e aplicadas em espectrômetro de massas nanoUPLC nanoESI-MSE. Para um processamento de espectros e busca no banco de dados

adequados, será utilizado o pacote ProteinLynxGlobalServer (PLGs) v.2.4 contendo o programa ExpressionE v.2.4. Os bancos de dados UniProtKB/Swiss-Prot 57.1 e UniProtKB/TrEMBL 40.1 serão utilizados e as condições de pesquisa serão baseadas na taxonomia [*Homo sapiens* (humano)]. As proteínas identificadas serão organizadas em uma lista que corresponde a uma proteína única para ambas às condições (estudo ou grupo controle), e uma razão logarítmica entre os diferentes grupos será plotada em um gráfico de dispersão para visualizar diferenças entre os grupos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

No presente projeto de trabalho pretende-se utilizar cromatografias de afinidade em matrizes com lectinas, imobilizadas em CNBr-Sepharose-4B® (GE Healthcare), e análise de espectrometria de massas para o isolamento, identificação e quantificação de glicoproteínas séricas de indivíduos com e sem doença prostática.

Objetivo Secundário:

Selecionar um grupo de indivíduos saudáveis, no que diz respeito a doenças prostáticas, para compor o grupo controle; Selecionar um grupo de pacientes com câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna, para fazer parte do grupo de estudo. Isolar glicoproteínas séricas, através de cromatografia de afinidade em coluna de frutalina imobilizada em CNBr Sepharose-4B®; Isolar glicoproteínas séricas, através de cromatografia de afinidade em coluna de lectina ligante de fucose imobilizada em CNBr-Sepharose-4B®; Analisar os perfis cromatográficos das glicoproteínas séricas por meio de espectrometria de massas; Estabelecer um perfil comparativo de glicoproteínas séricas entre controles e indivíduos com doença prostática. Elaborar resumos para serem divulgados em Congressos Nacionais e Internacionais; Publicar artigos científicos completos em periódicos de impacto elevado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios

Riscos:

Não existe risco de contaminação, advindo do procedimento utilizado no estudo (flebotomia) porque todo o material que será utilizado na coleta é esterilizado, descartável e, portanto, não reutilizável, além de ser realizado por técnico, devidamente capacitado, treinado e competente, de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso. Na tentativa de evitar e/ou minimizar ao máximo a possibilidade de algum desconforto, o paciente será submetido a uma avaliação médica sobre a sua condição antes de retirar uma alíquota de 5,0 mL ou volume maior de sangue total; mas se ainda assim, algum paciente, porventura vier a sentir algum desconforto ou mal estar, incluindo tonturas, náuseas ou vômitos, advindos do procedimento de coleta, o mesmo será orientado, pela equipe de enfermagem do CRIO, a sentar-se e colocar a cabeça abaixo dos joelhos ou deitar-se com os pés em nível acima da cabeça. Em casos de hematoma ou mancha arroxeadas no local da punção da agulha: serão aplicadas compressas de gelo no local nas primeiras 6 horas; flebite (vermelhidão e dor no local da punção): serão aplicadas compressas de água morna no local e procurar o serviço médico do Hospital. Em casos de desmaio, um médico (a) ou enfermeira (o) plantonista será acionado imediatamente. Nos demais casos, os sujeitos participantes da pesquisa, serão orientados, logo após a coleta, a permanecerem pelo menos 15 minutos no serviço, não fumar no período de duas horas, não ingerir bebidas alcoólicas nas próximas 6 horas, aumentar a ingestão de líquidos nas próximas 24 horas, evitar grandes esforços físicos por algumas horas e evitar desempenhar atividades de risco, como manipular máquinas de corte ou tornos, trabalhar em andaimes ou em grandes

alturas, dirigir transportes coletivos ou motocicletas, nas próximas 24 horas. Benefícios: Despertar o interesse de mais pesquisadores para o estudo de glicoproteínas séricas, em outras condições clínicas, utilizando a técnica das lectinas vegetais imobilizadas em matrizes para cromatografias de afinidade; Ampliação dos conhecimentos já existentes, no que se refere ao contexto de glicoproteínas séricas; Aplicação da técnica utilizando lectinas vegetais para análise proteômica; Elaboração de um perfil glicoprotéico comparativo, entre pacientes com doença prostática e controle, indivíduos livres de doença prostática.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de relevância médica epidemiológica visto buscar novas tecnologias aplicadas ao diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos:

- 1.Folha de Rosto;
- 2.Carta de Anuência da Instituição co-participante;
- 3.Termo de fiel depositário material biológico.
- 4.TCLE.

Recomendações:

Não há recomendações a serem feitas ao projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugere-se a Aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FORTALEZA, 05 de Abril de 2013

Assinado por:

Marilia Joffily Pereira da Costa Parahyba
(Coordenador)

Endereço: Av. Washington Soares, 1321, Bloco da Reitoria

Bairro: Sala da VRPPG – Edson Queiroz **CEP:** 60.811-905

UF: Ce **Município:** Fortaleza

Telefone: (85) 3477-3122

Fax: (85) 3477-3056

email: coetica@unifor.br