



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

**JOSÉ CAMILO TORRES ROMERO**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA DE PACIENTES PORTADORES DE  
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA DO TIPO AREB E ARSA UTILIZANDO  
LECTINAS VEGETAIS**

**FORTALEZA**

**2016**

JOSÉ CAMILO TORRES ROMERO

ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA DE PACIENTES PORTADORES DE  
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA DO TIPO AREB E ARSA UTILIZANDO LECTINAS  
VEGETAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo  
Moreira

Coorientador: Prof. Dra. Ana Cristina de  
Oliveira Monteiro Moreira

FORTALEZA  
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R672 Romero, Jose Camilo.

Análise proteômica do plasma de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica do tipo areb e arsa utilizando lectinas vegetais / Jose Camilo Romero. – 2016.  
104 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Renato de AZevedo Moreira .

Coorientação: Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira.

1. Mielodisplásicas. 2. ARSA. 3. AREB. 4. Lectina. 5. Biomarcador. I. Título.

CDD 572

JOSÉ CAMILO TORRES ROMERO

ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA DE PACIENTES PORTADORES DE  
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA DO TIPO AREB E ARSA UTILIZANDO LECTINAS  
VEGETAIS

Tese apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em  
Bioquímica da Universidade  
Federal do Ceará, como  
requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: 08/07/2016.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Renato, de Azevedo Moreira (Orientador)  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - CE)

---

Prof. Dr. Maria Izabel Florindo Guedes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico aos meus pais, Luz Stella Romero  
Garces e José Torres Fandiño.

## **AGRADECIMENTOS**

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

Aos Professores Dr. Renato Moreira e Dra Ana Cristina Moreira, pela excelente orientação.

Aos professores participantes da banca examinadora.

Aos professores entrevistados, pelo tempo concedido nas entrevistas.

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

À Marina Lobo, Márcio Cavalcante, Rogênio Mendes e Cícero, que foram pessoas que permitiram a consecução do trabalho da minha tese.

À UNIFOR por terem permitido realizar meus experimentos lá.

À UFC, foi uma verdadeira honra pertencer a pesquisadores de tão alto nível. Espero fazer parte desta comunidade ainda na distância. Muito obrigado.

A família que como os fatos é real.

Ao Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará.

À Universidade Nacional Aberta e a Distância da Colômbia (UNAD), especialmente para a Escola de Ciências Agrícolas, Pecuárias e de Meio Ambiente (ECAPMA), por terem permitido espaços para culminar com o documento no tempo de minha permanência na Colômbia.

Ao Brasil minha segunda casa. Aqui ficam amigos para a vida toda. Para todos eles também eterna gratidão.

Teve a honra de ter conhecido o Nordeste Brasileiro! Uma parte de mim fica aqui, acompanhando a outra na Colômbia, à disposição de servir-lhes.

Muito obrigado!!!!

“The cosmos is within us. We are made of star-stuff. We are a way for the universe to know itself.” Carl Sagan.

“Somos polvo de estrellas que piensa acerca de las estrellas. Somos el medio para que el Cosmos se conozca a sí mismo”. Carl Sagan.

“Somos todos feitos do mesmo pó de estrelas. Somos uma maneira do Universo conhecer a si mesmo”. Carl Sagan.

## RESUMO

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são doenças que ocorrem quando as células produtoras de sangue são danificadas na medula óssea e esses danos podem afetar um ou mais tipos de células sanguíneas. Os tipos mais comuns de SMD são a Anemia Refrataria com Sideroblastos em Anel (ARSA) e Anemia Refrataria com Excesso de Blastos (AREB). Este trabalho teve como objetivo realizar a análise proteômica do plasma medular de pacientes com SMD tipo ARSA e AREB, visando à identificação de proteínas que sejam potenciais candidatas a marcadores biológicos para avaliação, estudo e diagnóstico dessas doenças. Amostras de plasma de dez pacientes com ARSA, dez com AREB e dez indivíduos saudáveis (Controle) foram selecionadas para análise proteômica. Estas foram submetidas à imunodepleção, cromatografia de afinidade com lectina  $\alpha$ -D-galactose-ligante de sementes de *Artocarpus incisa* imobilizada em Sepharose™ 4B, concentradas e digeridas para posterior análise por espectrometria de massas. O programa Expression<sup>E</sup>, baseado nos níveis de expressão das proteínas, calculou a razão entre os grupos selecionados. Foram identificadas 7 proteínas potenciais candidatas a biomarcadores, tais como a Vitronectina (VTN), Fibrinogênio (FGA), Pregnancy zone protein (PZP), Cininogênio (KNG1), Cadeia de Imunoglobulina Lambda (IGLL1), Factor do complemento Cb4 (Cb4) e Hemopexina (HPX), por estarem super expressas no grupo de pacientes com SMD, em ambos os tipos, ao se comparar com o grupo controle (indivíduos sadios). Estas foram selecionadas para formar um painel de proteínas candidatas biomarcadores de diagnóstico da SMD. O reconhecimento único por parte da lectina para Clusterina (CLU) e Vitronectina em ARSA e Fibrinogênio para AREB, torna essa lectina, uma ferramenta muito útil para diferenciar as SMD em estudos proteômicos.

Palavras-chave: Síndromes Mielodisplásicas. ARSA. AREB. Lectina. Proteômica. Biomarcador.

## ABSTRACT

The myelodysplastic syndromes (Myelodysplastic Syndrome MDS) are diseases that occur when blood-producing cells are damaged bone marrow. This causes damage to one or more types of blood cells because its production is defective. MDS is considered a type of cancer and often end up being melodie acute leukemia (AML). The most common types of these syndromes are refractory anemia with ringed sideroblasts (ARSA) and anemia refractory with Excess Blasts (AREB). This study aimed to carry out the proteomic analysis of spinal cord serum of pediatric patients with any of the syndromes for the identification of proteins that are potential candidates for biological markers for evaluation, study and diagnosis of disease. The samples from ten patients with ARSA, tem with AREB and Ten healthy persons (control) were compared. These were subjected to immunodepletion, affinity chromatography with lectin galactose-linker selected by the anomeric recognition profile using chromatography in crosslinked hemicelulases, the selected lectins were subsequently immobilized in Sepharose 4B, the serum bone marrow samples were digested for subsequent analysis by mass spectrometry. The software ExpressionE, based on protein expression levels, calculated the ratio between the selected groups, so 7 proteins have been identified as possible candidates for the biomarker syndromes. The overexpression of Vitronectin (VTN), fibrinogen (FGA), Pregnancy zone protein (PZP), Kininogen (KNG1) Immunoglobulin lambda chain (IGL), complement factor C4b (CB4) and Hemopexin (HPX) compared with the group control, seems to be an indicator of syndromes and were selected to form a panel of potential candidates for prognostic biomarkers. The only recognition by the frutalin to Clusterin (CLU) and Vitronectin in ARSA and Fibrinogen to AREB, do lectin a very useful tool to differentiate syndromes in proteomics studios.

Keywords: Myelodysplastic Syndromes. ARSA. AREB. Lectin. Proteomics. Biomarker.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema dos vários estágios para a consequição de Biomarcadores. Apresenta-se em: A) o protocolo de Rifai, et al. (Rifai *et al.*, 2006) e em B) o protocolo de Surinova, et al. (Surinova *et al.*, 2011) ..... 18
- Figura 2 – Esquema típico de Hemicelulosastomado de Kobayash e Fukuoka (2013)..... 31
- Figura 3 – Espectros do infravermelho da xiloglucana de *T. indica* não reticulado e reticulado com epicloridrina ..... 47
- Figura 4 – Perfis cromatográficos de afinidade obtidos depois de aplicado 50 ml de extratos de sementes de cada espécie avaliada, contendo lectinas galactose ligantes na matriz de xiloglucana de *T. indica* obtida com a condição 9 de reticulação ..... 50
- Figura 5 – Perfis cromatográficos obtidos com a partir de 5 mg de PNA em diferentes matrizes de hemiceluloses reticuladas. A) Galactomanana de *C. pulcherrima*. B) Xiloglucana de *T. indica* ..... 51
- Figura 6 – Perfis cromatográficos obtidos a partir de 5 mg de Ricina em diferentes matrizes de hemiceluloses reticuladas. A) Galactomanana *C. pulcherrima* B) xiloglucana de *T. indica* ..... 52
- Figura 7 – Termograma. Comparação de perfis de reconhecimento obtidos com Xiloglucana (verde) e galactomanano (vermelho) em contato com Ricina ..... 54
- Figura 8 – Termograma. Comparação de perfis de reconhecimento obtidos com Xiloglucana (verde) e galactomanano (vermelho) em contato com PNA ..... 54
- Figura 9 – Distribuição do erro massas de massa exata medida em ppm ..... 57
- Figura 10 – Representação gráfica da avaliação da qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos ..... 57
- Figura 11 – Ratio de expressão das Proteínas comuns de ARSA Vrs Controle ..... 60

Figura 12 – Ratio de expressão das Proteínas comuns de AREB Vrs Controle .....	66
Figura 13 – Proteínas super expressas nas Síndromes ARSA e AREB comparadas com o grupo Controle .....	68
Figura 14 – Interatoma das proteínas comumente super expressas em ARSA e AREB comparadas com o Controle .....	69
Figura 15 – Distribuição do erro massas de massa exata medida em ppm – PICO II Frutalina .....	79
Figura 16 – Representação gráfica da avaliação da qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos - PICO II- Frutalina .....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais aplicados para obtenção das matrizes cromatográficas de xiloglucana de <i>T. indica</i> . ECH: 12,4 M .....	40
Tabela 2 – Composição química aproximada das sementes de <i>Tamarindus indica</i> .....	46
Tabela 3 – Quantidade em mg de lectinas isoladas utilizando as matrizes reticuladas de xiloglucana de <i>T. indica</i> . Depois de aplicar 50 mL de extrato bruto .....	48
Tabela 4 – Quantidade de proteína isolada com hemiceluloses reticuladas conforme a condição 9 depois de aplicado 5 mg de cada um das lectinas $\beta$ -galactose ligantes .....	51
Tabela 5 – Quantidade de proteína isolada e acoplada em colunas de Sepharose - 4B .....	55
Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressa em ARSA .....	58
Tabela 7 – Proteínas comuns de AREB Vrs Controle .....	63
Tabela 8 – Proteínas comumente super expressas em ARSA e AREB Vrs Controle conseguidas com amostras depletadas .....	67
Tabela 9 – Razão de Fração retida - ARSA Vrs Controle .....	81
Tabela 10 – Razao de Fracao retida - AREB Vrs Controle .....	82
Tabela 11 – Proteínas comumente retidas na coluna de sepharose 4B-Fructalina .....	82
Tabela 12 – Proteínas totais retidas na coluna de fructalina .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SMD	- Síndromes Mielodisplásicas
LMA	- Leucemia Mielóide Aguda
ARSA	- Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
AREB	- Anemia Refratária com Excesso de Blastos
VTN	- Vitronectina
FGA	- Fibrinogênio
PZP	- Pregnancy Zone Protein
KNG1	- Cininogênio
IgLL1	- Cadeia de Imunoglobulina Lambda
Cb4	- Factor do Complemento Cb4
HPX	- Hemopexina
CLU	- Clusterina
OMS	- Organização Mundial de Saúde
FAB	- Classificação Franco-Americano-Britânica
IPSS	- International Prognostic Score System
MO	- Medula Óssea
MPTs	- Modificações Pós-traducionais
EGFR	- Fator de Crescimento Epidérmico
Con A	- Concanavalina A
JAC	- Jacalina
WGA	- Aglutinina do Germe de Trigo
PHA	- Fitohemaglutinina
AAL	- Lectina de <i>Aleuria Aurantia</i>
DSL	- <i>Datura Stramonium</i> Lectin
DIGE 2D 2-D	- Fluorescence Difference Gel Electrophoresis
MME	- Metallo-Endopeptidase
Frut	- Frutalina - Lectina Alfa Galactose Ligante de <i>Artocarpus Incisa</i>
PNA	- Peanut Agglutinin
VvB4	- Lectina de <i>Vicia Villosa</i> Isoforma B4
ASH	- Imunodepleção de Albumina Sérica Humana
ADH	- Alcohol Deshidrogenasa
ALDH	- Aldehído Deshidrogenasa
RAG	- Recombination Activating Gene
Ig	- Imunoglobulina
SERPINA1	- Alfa-1 Antitripsina
FR	- Fração
TEV	- Tromboembolismo Venoso
TAT	- Complexo Trombina–antitrombina
ECH	- Epiclorhidrina

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	17
2.1	Síndromes Mielodisplásicas .....	17
2.1.1	<i>Título da seção terciária Classificação das SMD</i> .....	17
2.1.2	<i>Anemia Refractaria con Sideroblastos en Anillo (ARSA)</i> .....	18
2.1.3	<i>Anemias Refractaria con Exceso de Blastos (AREB)</i> .....	19
2.2	Modificações Pós-traducionais (MPTs) .....	20
2.3	Significado Biológico da Glicosilação .....	22
2.4	Lectinas .....	23
2.5	Biomarcadores .....	28
2.6	Hemicelulosas .....	31
2.7	Termoforesis .....	32
3	HIPOTESE .....	33
4	OBJETIVOS .....	34
4.1	Objetivo Geral .....	34
4.2	Objetivo Especifico .....	34
5	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL .....	35
5.1	Estratégia Etapa 1. Purificação das Lectinas .....	35
5.2	Estratégia Etapa 2. Avaliação do reconhecimento anomérico por parte de lectinas galactose ligantes .....	35
5.3	Estratégia Etapa 3. Análise proteomica na procura de possíveis marcadores tumorais para síndromes mieloblásticas (ARSA e AREB) com amostras depletadas, mas não fracionadas por cromatografia de afinidade .....	35
5.4	Estratégia Etapa 4. Análise proteômica na procura de possíveis marcadores tumorais para síndromes mieloblásticas (ARSA e AREB) com amostras não depletadas, mas sim fracionadas por cromatografia de afinidade com lectina .....	36
6	MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
6.1	Purificações das lectinas .....	37
6.1.1	<i>Extração da Frutalina</i> .....	37

6.1.2	<i>Extração da Jacalina</i> .....	37
6.1.3	<i>Extração da Ricina</i> .....	37
6.1.4	<i>Extração da Lectina Arachis (PNA)</i> .....	38
6.1.5	<i>Quantificação de proteínas</i> .....	38
6.1.6	<i>Ensaio hemaglutinante</i> .....	38
6.2	<b>Avaliação do reconhecimento anomérico por parte das lectinas</b> .....	38
6.2.1	<i>Obtenção das sementes</i> .....	38
6.2.2	<i>Obtenção de extratos</i> .....	39
6.2.3	<i>Extração de xiloglucana de T. indica</i> .....	39
6.2.4	<i>Extração de galactomanana de C. pulcherrima</i> .....	39
6.2.5	<i>Reticulação das matrizes de xiloglucana T. indica</i> .....	40
6.2.6	<i>Reticulação da matriz de galactomanana C. pulcherrima</i> .....	40
6.2.7	<i>Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)</i> .....	41
6.2.8	<i>Cromatografia de afinidade</i> .....	41
6.2.9	<i>Avaliação do reconhecimento anomérico das lectinas</i> .....	41
6.2.10	<i>Identificação das lectinas por espectrometria de massas</i> .....	42
6.3	<b>Análise proteômica na procura de possíveis marcadores tumorais para síndromes mieloblásticas (ARSA e AREB) com amostras depletadas, mas não fracionadas por cromatografia de afinidade</b> .....	42
6.4	<b>Materiais e Métodos Etapa 4. Análise proteômica na procura de possíveis marcadores tumorais para síndromes mieloblásticas (ARSA e AREB) com amostras não depletadas, mas sim fracionadas por cromatografia de afinidade com lectina</b> .....	44
7	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
7.1	<b>Isolamento das Lectinas</b> .....	46
7.2	<b>Avaliação do reconhecimento anomérico</b> .....	49
7.3	<b>Estudo proteômico de amostras de AREB e ARSA depletadas</b> .....	55
7.3.1	<i>População do estudo</i> .....	55
7.3.2	<i>Imunodepleção de albumina sérica humana (ASH) e imunoglobulina G (IgG)</i> .....	56
7.3.3	<i>Análise proteômica</i> .....	56
7.4	<b>Análise proteômica na procura de possíveis marcadores tumorais para síndromes mieloblásticas (ARSA e AREB) com amostras não depletadas,</b>	

	<b>mas sim fracionadas por cromatografia de afinidade com lectina .....</b>	<b>78</b>
<b>7.4.1</b>	<b><i>Cromatografia de afinidade em colunas de lectinas imobilizada em sepharose 4B .....</i></b>	<b>78</b>
<b>7.4.2</b>	<b><i>PICO II. Proteínas de ARSA e AREB comunmente retidas em cromatografia de afinidade com Frutalina .....</i></b>	<b>79</b>
<b>7.4.3</b>	<b><i>Proteínas de ARSA e AREB diferencialmente retidas em cromatografia de afinidade com Frutalina .....</i></b>	<b>86</b>
<b>7.4.4</b>	<b><i>Outras proteínas retidas com Frutalina .....</i></b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b><i>CONCLUSÃO .....</i></b>	<b>90</b>
	<b><i>REFERÊNCIAS .....</i></b>	<b>91</b>
	<b><i>ANEXOS .....</i></b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas, ou simplesmente câncer, são atualmente um dos maiores problemas de saúde pública e vem acometendo de maneira crescente a população mundial. Segundo Herzberg e Ferrari (1998) o nome câncer foi utilizado pela primeira vez por Hipócrates e é oriunda da palavra grega “Karkinos”, isso devido as características das lesões observadas na época se assemelharem ao comportamento do caranguejo. Esse termo, atualmente, é bastante abrangente, visto que esta terminologia se refere ao nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, porém, com localizações e aspectos biológicos múltiplos (THULER, 2012).

Durante séculos os cientistas tentaram incansavelmente compreender o funcionamento biológico do câncer, surgindo neste processo inúmeras hipóteses, que por vezes, sofreram transformações bruscas de uma década para outra. Os esforços realizados por estes estudiosos contribuíram de forma significativa para a compreensão atual da oncogênese, ou seja, o processo de constituição do câncer. Sabe-se hoje que o câncer “é uma doença causada pelo crescimento descontrolado de uma única célula”. Esse crescimento é deflagrado por mutações: “mudanças no DNA que afetam especificamente os genes estimuladores do crescimento ilimitado das células” (MUKHERJEE, 2012). Tudo isso se apresenta de forma muito simples, mas ao se deparar com a dimensão e dificuldade de controlar o câncer, a ciência se curva para reconhecer quão poderoso e complexo é o crescimento celular. Nesse contexto, Mukherjee (2012) ressalta que o crescimento celular é indispensável à vida e é possível dizer que o homem fisicamente nada mais é do que um amontoado de células crescendo e se adaptando continuamente, porém aquilo que mantém o organismo em pleno funcionamento, também pode desencadear um processo inverso, isso porque a célula errante possui poder de crescimento, adaptação e correção muito mais poderoso do que o normal, sendo estes os fatores primordiais que levam o câncer a ser uma patologia tão devastadora.

Nas últimas décadas, o olhar direcionado para as patologias que despertam maior interesse epidemiológico devido a sua alta prevalência, traz o câncer como um dos mais importantes protagonistas, convertendo-se de jeito geral em um evidente problema de saúde pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS)

prevê que em 2030 o número de pessoas acometidas por algum tipo de câncer pode chegar a 27 milhões de casos no mundo, com cerca de 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente convivendo com esta patologia (INCA, 2011). É considerado uma das principais causas de morte em todo o mundo representando uma ameaça global com consequências econômicas consideráveis, tanto para os países desenvolvidos quanto aqueles em desenvolvimento. No Brasil, as neoplasias malignas estão entre as principais causas de morte, abaixo apenas das doenças do aparelho circulatório. No ano de 2011, do total de óbitos ocorridos no país, 16,88% foram decorrentes das neoplasias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são doenças que ocorrem quando as células produtoras de sangue são danificadas na medula óssea. Isto provoca danos a uma ou mais tipos de células sanguíneas pois sua produção torna-se defeituosa. MDS é considerado um tipo de câncer e muitas vezes uma leucemia mieloide aguda (LMA). Os tipos mais comuns destas síndromes são a Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA) e Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB) (COREY *et al.*, 2007).

A AREB pertence aos subgrupos mais graves de SMD pois está associada a um mal prognóstico e com o progresso da doença para LMA. A ARSA é um grupo melhor estudado, sendo o seu prognóstico mais favorável pois raramente evoluem para Leucemia embora seja das síndromes mais frequentes. OS mecanismos moleculares de progressão das SMD, ainda não são totalmente compreendidos e os estudos se encontram em fase inicial (KOMROKJI *et al.*, 2010). As células transformadas alteram com frequência os perfis dos níveis de expressão de proteínas assim como seus perfis de glicosilação. As lectinas são um grupo de proteínas capazes de reconhecer estruturas glicosiladas especificamente e neste trabalho foram utilizadas para realizar uma análise proteômica dos plasmas medulares de pessoas com ARSA e AREB.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Síndromes Mielodisplásicas

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são algumas das doenças malignas hematológicas prevalentes, e são definidas como desordens de células estaminais clonais caracterizadas por hematopoese ineficaz em um ou mais das linhagens de medula óssea (COREY *et al.*, 2007). Embora existam distintos subgrupos morfológicos, a progressão das síndromes apresenta citopenia e pode evoluir a Leucemia Mielóide. As SMD podem surgir de novo ou como um resultado de químico ou radioterapia associada ao tratamento de qualquer tipo de câncer. Embora anomalias citogenéticas possam ser identificadas em cerca da metade dos casos de MDS (VLACHOS *et al.*, 2012), relativamente pouco se sabe sobre a base genética do MDS, assim como de seu proteoma diferencial.

Com o aumento da expectativa de vida tem-se aumentado a frequência de casos de SMD (mais de 50% dos casos correspondem a pessoas com mais de 80 anos), a síndrome aparece com vários sintomas clínicos como anemia, sangramento ou infecção. Para a maioria dos pacientes com MDS, o único tratamento eficaz é o transplante de medula óssea que na maioria das vezes não é levado em consideração pelos riscos que representa para pessoas idosas (VARDIMAN *et al.*, 2009).

#### 2.1.1 Classificação das SMD

As Propostas de classificação morfológica com implicações prognósticas visam identificar subgrupos de pacientes, orientar diferentes opções terapêuticas e permitir análises comparativa de resultados (BRECCIA *et al.*, 2006). As SMD foram, desde 1982, tradicionalmente classificadas de acordo com feições à contagem de blastos (classificação Franco-Americano-Britânica - FAB). Em 1997, foi proposto o IPSS (International Prognostic Score System) com o objetivo de teorizar exclusivamente em SMD primária. A classificação proposta considera o percentual de blastos, a presença e tipo de anomalia citogenética e o número e magnitude das citopenias, estratificando quatro subgrupos de risco com relação à sobrevida global e

transformação leucêmica. A nomenclatura adotada, a partir de 2001, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o número de linhagens hematopoiéticas acometidas (uma ou múltiplas linhagens), reconhece a síndrome 5q- e reduz o percentual de blastos que define leucemia aguda para 20% (BRECCIA *et al.*, 2006).

### **2.1.2 Anemia Refrataria con Sideroblastos en Anillo (ARSA)**

De acordo com a classificação FAB do MDS, ARSA inclui aqueles pacientes com citopenia refratária com displasia multigenica e sideroblastos (RCMD-RS). É comum achar a classificação FAB nos diferentes trabalhos do tema porque a maioria dos dados disponíveis sobre anomalias citogenéticas foi derivada de estudos publicados antes da classificação da OMS. ARSA é um distúrbio clonal proveniente de uma célula estaminal multipotente ou a partir de uma célula progenitora mielóide multipotente, caracterizado pela hematopoese ineficaz. Epidemiologicamente existem poucos dados sobre a epidemiologia dos erros, que podem ser responsáveis por 5-15% de todos os casos de MDS. MDS tem sido predominantemente diagnosticada na população idosa. A incidência global de todos as SMD está compreendida entre 3,5 e 12,6 novos casos / ano / por 100.000. A incidência pode subir de 0,5 por ano no grupo etário de 40 anos para 89 casos. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Clinicamente a ARSA geralmente se apresenta com Medula Óssea (MO) hiper celular e anemia. Pode haver leucopenia e / ou trombocitopenia, mas estas características não representam um requisito de diagnóstico. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Os Critérios de citologia para o reconhecimento das características displásicas de células na MO foram publicados pela classificação FAB. Tipicamente, mais de 15% das células eritróides são sideroblasto com pronunciados grânulos de ferro no seu interior. Há evidências de que as mutações que ocorrem no ADN mitocondrial podem ter um papel fundamental na alteração do metabolismo do Ferro mitocondrial com o conseqüente acúmulo da forma férrica ( $Fe^{3+}$ ) na matriz. A biópsia óssea pode ser útil em alguns casos de SMD com fibrose na MO e permite a

observação da chamada "localização anormal de precursores imaturos" (ALIP), que pode representar um importante fator de prognóstico. O tratamento desta condição é bastante favorável, incluindo transfusão de sangue em pacientes com anemia sintomática. Na evolução da doença se pode falar que esta é uma condição pré-leucêmica, carregando uma probabilidade de 10-20% de evoluir para leucemia. A probabilidade de ARSA de se transformar em AML pode ser menor quando se exclui RCMD, mas estudos prospectivos são escassos. Num estudo 25% dos pacientes desenvolveram leucemia mieloide aguda (LMA) em cerca de 10 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

### **2.1.3 Anemias Refractaria con Exceso de Blastos (AREB)**

De acordo com a classificação FAB das SMD, pacientes com AREB apresentam 5-20% de blastos na medula. Uma vez que a gravidade da doença depende da percentagem de blastos na MO, duas categorias de AREB foram reconhecidas pela classificação da OMS. AREB-1 e AREB-2, com 5-9% e 10-19% de blastos, respectivamente. AREB é um distúrbio clonal proveniente de uma célula estaminal totipotente ou a partir de uma célula progenitora mieloide multipotente, caracterizada pela hematopoiese ineficaz e diseritropoiesis. Os blastócitos presentes na MO são geralmente células CD34 + e expressam marcadores mielóides CD33 e / ou CD13. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Existem poucos dados sobre a epidemiologia da AREB, se sabe que é responsável por 20-30% de todos os casos de SMD. SMD tem sido predominantemente diagnosticada na população idosa. A incidência global de todas as SMD está compreendida entre 3,5 e 12,6 novos casos / ano / por 100.000 em alguns estudos. A incidência pode subir de 0,5 casos de SMD por ano. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Esta é uma leucemia oligoblástica, que carrega a probabilidade de 20-40% de evoluir para leucemia. Num estudo, aproximadamente 25% dos pacientes desenvolveram leucemia mieloide aguda (AML) num prazo de 18 meses (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

A probabilidade de se transformar em AREB LMA é mais baixa no grupo de AREB-1 (aproximadamente 50% dos pacientes desenvolvem leucemia aguda

dentro de 6 anos) que no grupo de AREB-2 (cerca de 50% dos pacientes desenvolvem leucemia dentro de 18 meses). Anomalias cromossômicas têm significância prognóstica independente e devem ser incluídas na avaliação de risco no momento do diagnóstico. Características citogenéticas favoráveis estão cariótipo normal, 5q ou 20q- isolado; características desfavoráveis são cariótipo complexo (ou seja, três ou mais anomalias clonais) e anomalias do cromossomo 7q; outras anormalidades identificam pacientes no grupo de citogenética de risco intermediário (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

A Citogenética morfológica não possui um marcador de cromossomo específico para doentes com AREB, 60% dos quais podem mostrar um cariótipo anormal inespecífico. Neste sentido, estudos proteômicos na procura de possíveis marcadores podem ser úteis para também entender o comportamento da doença.

## **2.2 Modificações Pós-traducionais (MPTs)**

Modificações Pós-traducionais (MPTs) são modificações químicas de uma cadeia proteica depois de sua tradução. Para aumentar a variabilidade das características de uma proteína, as células frequentemente fazem uso das modificações pós-traducionais. No contexto celular, esses processos controlam mecanismos importantes que mantêm homeostase e funcionamento, sendo responsáveis por alterações de função e/ou localização de proteínas e estruturas celulares pré-existentes (WANG *et al.*, 2013).

Dentre as modificações pós-traducionais conhecidas pode-se citar a fosforilação, acetilação, alquilação, metilação, sulfatação, isoprenilação, glicosilação, ubiquitinação e formação de pontes dissulfeto.

A glicosilação é a forma mais comum de modificação MPT mediada por enzimas na qual as cadeias laterais de oligossacarídeos são ligados covalentemente a qualquer lado da cadeia de asparagina (N-ligada) ou (O-ligada) serina/treonina, sendo a primeira a mais notável. A fração de glicanos ligados a proteínas muitas vezes é essencial para o reconhecimento, sinalização e eventos de interação entre células e podem desempenhar papel importante no dobramento e na definição da conformação proteica (LI ; D'ANJOU, 2009).

A superfície das células de mamíferos contém complexos de carboidratos, conhecidos coletivamente como glicocálice, constituídos de monossacarídeos simples em diversos arranjos de oligossacarídeos. Os glicanos apresentam alta complexidade, diversidade e medeiam a comunicação celular com o exterior, papel de grande importância em muitos processos biológicos como adesão célula-célula, tráfego celular (células vermelhas do sangue, neutrófilos polimorfonucleares, linfócitos), regulação da rota de catabolismo de moléculas glicosiladas, manutenção da conformação específica de moléculas da membrana ou em solução, além de atuar como receptores de hormônios e outras moléculas biologicamente ativas (KILPATRICK, 2002).

A significância biológica de MPTs é bem estabelecida. Dentre todos os tipos de MPTs, a glicosilação é a mais abundante, frequente e complexa. Acredita-se que mais da metade das proteínas do plasma e uma ampla maioria das de membrana são glicosiladas (SVAROVSKY; JOSHI, 2014). Praticamente todas as proteínas de membrana e secretadas são glicosiladas e a presença destas cadeias de carboidratos, melhora a sua solubilidade em água, contribui para a correta orientação da molécula, protege das proteases e participa no transporte intracelular. Por outro lado, os glicanos afetam a forma como as proteínas são reconhecidas por receptores específicos ou podem por si mesmo, ser reconhecidos por proteínas ligantes de glicanos, as lectinas. Assim é natural que a glicosilação constitua uma das modificações mais importantes nas proteínas recém-formadas (WANG *et al.*, 2014).

Mudanças nas estruturas de glicanos podem estar associadas com muitos eventos fisiológicos e patológicos, tais como crescimento celular, migração e diferenciação. Conseqüentemente, a glicosilação defeituosa que ocorre nas células cancerosas pode influenciar na proliferação celular, adesão, motilidade, bem como na angiogênese e metástase. A transformação neoplásica frequentemente está associada com a expressão de antígenos em tecidos com câncer e não em tecidos normais (TUCCILLO *et al.*, 2014).

Eventos biológicos, tais como o início de uma doença, são frequentemente acompanhados por alterações não só na expressão de proteínas, mas também por mudanças rápidas e dinâmicas nos seus padrões de glicosilação, tornando assim os glicanos, biomarcadores qualitativos de saúde e de doença

(SVAROVSKY; JOSHI, 2014).

### 2.3 Significado Biológico da Glicosilação

Os carboidratos da superfície celular são característicos do tipo de célula e especificamente manifestados de acordo com o estágio de desenvolvimento das células ou tecidos. Em neoplasias, esta expressão celular normal é modificada, favorecendo a progressão do tumor em alguns casos, devido a interações com ligantes de carboidratos que promovem a propagação ou alteram os componentes de reconhecimento normal da resposta imune contra o tumor (KOBATA, 2007).

Para fundamentar o estudo da galactose em glicoproteínas é importante enfatizar algumas considerações a respeito. Uma vez que os carboidratos das cadeias derivadas da N-glicosilação foram descritos, a multiplicidade estrutural dessa cadeia de açúcar tornou-se teoricamente enorme. Na verdade, se podia pensar que era impossível elucidar a informação biológica, pelo número elevado de isômeros que podiam ser obtidos a partir dessa informação. Felizmente, os estudos sobre as estruturas da cadeia de glicanos de várias glicoproteínas revelaram uma série de regras estruturais. As cadeias de glicoproteínas contêm um núcleo de pentassacarídeos comuns: Manose  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 6); Manose  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 3), Manose  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4), N-acetil-glucosamina  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4) e N-acetil-glucosamina  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4), que é chamado de "núcleo trimanosil" (ROBYT, 2008). Com base nas estruturas e locais dos resíduos de açúcares adicionados ao núcleo, estas cadeias podem ser classificadas em três subgrupos: cadeias de açúcares do tipo complexo, que não contêm outros resíduos de manose além daqueles no núcleo trimanosil; Cadeias exteriores, com um resíduo N-acetilglucosamina nas suas extremidades redutoras que estão ligados a dois resíduos de manose do núcleo do trimanosil; e cadeias de açúcares ricos em manose, que contêm apenas resíduos de manoses além do núcleo trimanosil (KOBATA, 2007). A presença de N-acetilglucosamina aumenta a variação estrutural quando duas cadeias de açúcar tetraternárias isoméricas (contendo o GlcNAc1-4 (GlcNAc1-2) Mana1-3 ou o grupo GlcNAc1-6 (GlcNAc1-2) são adicionados ao núcleo do trimanosil pela ação de cinco N-acetilglucosaminiltransferases (KOBATA, 2007).

Em relação a estes resíduos de N-acetilglucosamina, várias cadeias exteriores são formadas. As cadeias exteriores são construídas a partir de uma série de porções centrais e modificações de suas unidades Gal $\beta$ 1-GlcNAc. Todo resíduo não redutor terminal GlcNAc pode ser prorrogado por adições de unidades de monossacarídeos. Neste processo de formação das porções de cadeia exteriores, é formado o grupo Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (NARIMATSU, 1986). Esse dissacarídeo, especialmente, é formado na posição C-6 do resíduo Man  $\alpha$  1-6 do núcleo de trimanosil, é ainda alargado por ação de glicosil transferasas específicas, produzindo 7 repetições N acetilactosamine linear e/ou ramificada (KOBATA, 2007).

Os grupos Gal $\beta$ 1-GlcNAc e as repetições Gal $\beta$ 1-GlcNAc são mais alongados por fucosilação, sialilação, galactose, glucuronilação, e / ou sulfatação. Um resíduo de GalNAc $\beta$ 1 é adicionado a alguns resíduos GlcNAc. A variação do tipo de ligação de beta para alfa ou a exposição de a galactose associado a o antígeno Tn são indicadores de malignidade celular. (KOBATA, 2007; GALILI *et al.*, 2003)

Dentre os marcadores tumorais, também se pode encontrar os produzidos por superexpressão de estruturas glicosiladas em glicoproteínas. Em metástases e proliferação de células cancerígenas associam-se com mudanças no controle do crescimento celular. Por exemplo, a expressão de membros da família do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em câncer de mama se correlaciona com um comportamento agressivo do tumor (AMIN *et al.*, 2006).

Nesse âmbito, o estudo da expressão, ligação e associação da galactose torna-se relevante para estudos que procuram marcadores tumorais com lectinas.

## 2.4. Lectinas

O início do estudo das lectinas origina-se com os trabalhos realizados por Stillmark em 1888 quando descobriu o fenômeno de aglutinação dos eritrócitos mediado por extratos de sementes de mamona (*Ricinus Communis*). Esta proteína foi posteriormente denominada Ricina. Mais tarde, Hellin descobriu que o extrato tóxico de sementes de *Abrus Precatorius* também induzia hemoaglutinação e a proteína responsável foi denominada Abrina (SHARON; LIS, 1972).

A primeira lectina que foi obtida em forma cristalina foi isolada de *Canavalia ensiformis* e se chamou Concanavalina A em 1919. (SHARON; LIS, 2004).

Os trabalhos de Boyd e Shapleig (1954) abriram caminho para o estudo das lectinas quando tentou para defini-las, porém, sua interpretação não foi uniforme por desconhecimento de suas funções fisiológicas.

Na atualidade, existem diferentes definições, as mais aceitas compartilham dos seguintes critérios: As lectinas são proteínas ou glicoproteínas, capazes de se ligar reversivelmente a glicoconjugados, propriedade esta, capaz de promover a aglutinação de células e precipitar glicoconjugados (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

Nas plantas, a maioria destas moléculas ficam presentes nos cotilédones e endospermas e constituem de 2 a 10% do total de proteínas das sementes (HERNÁNDEZ *et al.*, 1999). Foi observado que dentro da planta, estas proteínas podem relacionar-se com regulação fisiológica, defesa contra o ataque de microrganismos, armazenamento de proteínas, transporte de carboidratos, estimulação mitogênica e reconhecimento das bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* (PUSZTAI, 2008).

A grande importância das lectinas deve-se fundamentalmente a suas propriedades biológicas como, por exemplo, a interação com grupos sanguíneos específicos, aglutinação de linfócitos, eritrócitos, espermatozoides, plaquetas, bactérias e células tumorais, indução da mitose nos linfócitos e efeitos citotóxicos sobre os linfócitos (SHARON; LIS, 2004).

Desde 1963 os estudos iniciados por Aub descrevem que as lectinas de plantas podem distinguir entre células normais e células malignas e que as diferenças estavam relacionadas, principalmente, aos perfis de glicosilação.

Os glicoconjugados das superfícies celulares são conhecidos por seu importante desempenho nas interações célula-célula, tais como o reconhecimento, a comunicação e adesão (GABIUS, 2001). Tais interações são também importantes na tumorigênese, progressão do tumor e metástases (GABIUS; GABIUS, 1997).

Durante a diferenciação celular e a transformação maligna, a biossíntese das cadeias oligossacarídicas de glicoproteínas é frequentemente alterada de tal maneira que pode ser detectada por lectinas (FAN *et al.*, 2004). Entre os estudos da membrana celular, reporta-se ao uso de lectinas para investigar alterações estruturais nas superfícies celulares (SHARON; LIS, 2004). Uma metodologia que tem sido utilizado extensivamente é o uso de lectinas em protocolos de afinidade

como ferramenta para o análises das glicoproteínas e a descoberta de biomarcadores de câncer (CLARK; LI, 2012).

Com a ampla gama de lectinas disponível para isolar várias moléculas glicosiladas, seus usos têm sido utilizados em muitos estudos. Recentemente, microarranjos (microarrays) de proteínas foram utilizados na incorporação de lectinas capazes de promover uma triagem, bem como a multilectinas (multilectin), outra técnica baseada na afinidade com matrizes. O desenvolvimento de cromatografias associadas com a técnica de multilectinas (M-LAC) para estudar o proteoma do plasma foi detalhado por um grupo, que desenvolveu uso de colunas de mistura de lectinas como a Concanavalina A (Con A), Jacalina (JAC) e aglutinina do germe de trigo (WGA) (PLAVINA *et al*, 2007). Além disso, os autores também incluíram depleção da albumina e de IgG, duas proteínas plasmáticas abundantes, numa tentativa de aumentar a identificação das proteínas pouco abundantes. Em outros estudos, um grupo reporta a imobilização das mesmas lectinas já citadas imobilizadas em uma coluna (KULLOLLI *et al*, 2008). Neste último, houve a denominação da técnica de cromatografia de afinidade com multilectinas com alto desempenho (HP-M-ALC), onde se procurou validar a abordagem de M-LAC com imunodepleção. Este estudo empregou a utilização da plataforma M-LAC produzindo vários resultados interessantes, incluindo proteínas candidatas como biomarcadores para o câncer de mama como a trombospondina e tenascina (ZENG *et al.*, 2011).

Para continuar com o tema de uma abordagem multilectina, outro estudo empregou o uso de lectinas biotinizadas PHA, AAL, e DSL incubadas com o lisado de tecido de tumor de ovário, levando à captura de glicoproteínas (ABBOT *et al*, 2010). As lectinas biotinizadas ligadas com glicoproteínas foram, em seguida, removidas do tecido lisado com o auxílio de esferas magnéticas de estreptavidina. Em um estudo anterior com o uso de lectinas foi capaz de identificar 47 potenciais marcadores, em que os autores observaram mudanças na expressão de glicosiltransferases no tecido de ovário. Um aspecto adicional do estudo anteriormente mencionado inclui a validação de várias proteínas candidatas, identificadas no plasma, utilizando uma lectina e um anticorpo monoclonal. Os resultados indicam que seu candidato a marcador foi ligado a uma lectina específica, o que implica que se tratava da estrutura de um glicano, e não a proteína por si só, que pode ser usada para distinguir entre um plasma de um paciente com e sem câncer (ABBOT *et al.*, 2010).

Um estudo com DIGE 2D, centrou-se na análise de amostras de pacientes com e sem adenocarcinoma de pulmão com a utilização da lectina WGA na tentativa de identificar biomarcadores (HONGSACHART *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de metodologias que permitam quantificação de glicoproteínas no plasma tem sido o foco de vários estudos recentes. Foram avaliadas mudanças de sialilação, após o enriquecimento com a lectina SNA, no plasma de pacientes com câncer de próstata (LEE *et al.*, 2010). Neste estudo, espectrometria de massas foi utilizada para quantificar glicoproteínas demonstrando que o protocolo utilizado foi capaz de determinar um aumento de sialilação de várias glicoproteínas.

Muitos dos estudos mencionados anteriormente requerem quantidades substanciais de amostras, e nos casos em que a quantidade de amostra é limitada, uma saída é a utilização de cromatografia capilar (FENG *et al.*, 2009). O uso deste sistema permitiu que amostras biológicas complexas com uma mínima quantidade de proteína pudessem ser testadas, como por exemplo, amostras de urina com apenas 10 µg de proteínas.

O desenvolvimento de microarranjos com lectinas foram detalhados, e experimentalmente, demonstraram que podem proporcionar bastante informação no que diz respeito ao perfil de glicosilação em glicoproteínas. Dessa forma, pesquisadores foram capazes de detectar várias isoformas da metalo-endopeptidase (MME), que é altamente expressa no câncer de próstata (PILOBELLO *et al.*, 2005). Assim como, estruturas de glicanos na superfície de células de câncer de mama (MCF7) (TAO *et al.*, 2008).

A lectina, conhecida como Jacalina, pertence à família das ligantes à galactose (LIENER *et al.*, 1986) e é extraída das sementes de *Artocarpus integrifolia*, tendo uma estrutura tetramérica de duas-cadeias e massa molecular aparente de 66 kDa.

A Jacalina é usada em aplicações para isolar IgA de plasma humano, isolar glicoproteínas do plasma humano e para aplicações em histoquímica. A lectina é grupo sanguíneo não específico após tratamento com neuraminidase e capaz de aglutinar eritrócitos humanos (LEAL *et al.*, 2011).

A frutalina é uma lectina extraída da fruta-pão e pertencente à família Moraceae, gênero *Artocarpus*. A sua extração é relativamente simples e necessita

poucos recursos financeiros. Das lectinas vegetais já estudadas, a jacalina e a frutalina, ambas do mesmo gênero, apresentam interesse por serem ligantes de alguns tipos de imunoglobulinas, linfócitos e de células tumorais (DE VASCONCELLOS *et al.*, 2012). Devido a estas propriedades descritas, essas lectinas são promissoras ferramentas em histoquímica e imunologia celular neoplásica.

Existem trabalhos utilizando a frutalina em câncer de mama (FERREIRA, 2001) com resultados animadores em relação à progressão tumoral do câncer de mama e a diferenciação de epitélio normal e neoplásico no câncer de tireoide (CAVALCANTE *et al.*, 2016).

Frutalina é uma glicoproteína homotetramérica Alfa-D-galactose-ligante, sua massa molecular aparente de 66 kDa (MOREIRA *et al.*, 1998). Frutalina pode ser utilizada na investigação imunobiológica, em reconhecimento de oligossacarídeos associados a câncer (KABIR *et al.*, 1998). Apesar de alguns relatos sobre sua atividade citotóxica (SILVA *et al.*, 2010), neuroprotetora (LEAL *et al.*, 2011) e efeitos imunológicos (BRANDO-LIMA *et al.*, 2006), gastoprotetora (DE VASCONCELLOS *et al.*, 2012) não se sabe muito sobre suas possíveis atividades biológicas.

A Ricina é classificada como uma proteína inativadora de ribossoma (RIP) tipo II, também conhecida glicoproteína heterodimerica holotoxina. As RIP tipo II consistem em uma cadeia funcional equivalente às RIP tipo I unida covalentemente por pontes dissulfeto a outra cadeia peptídica (TONE *et al.*, 2013).

A fita A da ricina é uma hidrolase N- glicosilada composta de 267 resíduos (TONE *et al.*, 2013). Os domínios de sua estrutura tridimensional são de aproximadamente 50% alfa hélice e estrutura beta. A fita B (RTB) é uma lectina composta de 262 aminoácidos que é capaz de se ligar á resíduos de galactose presentes na superfície celular (CHRISTIANSON *et al.*, 2012).

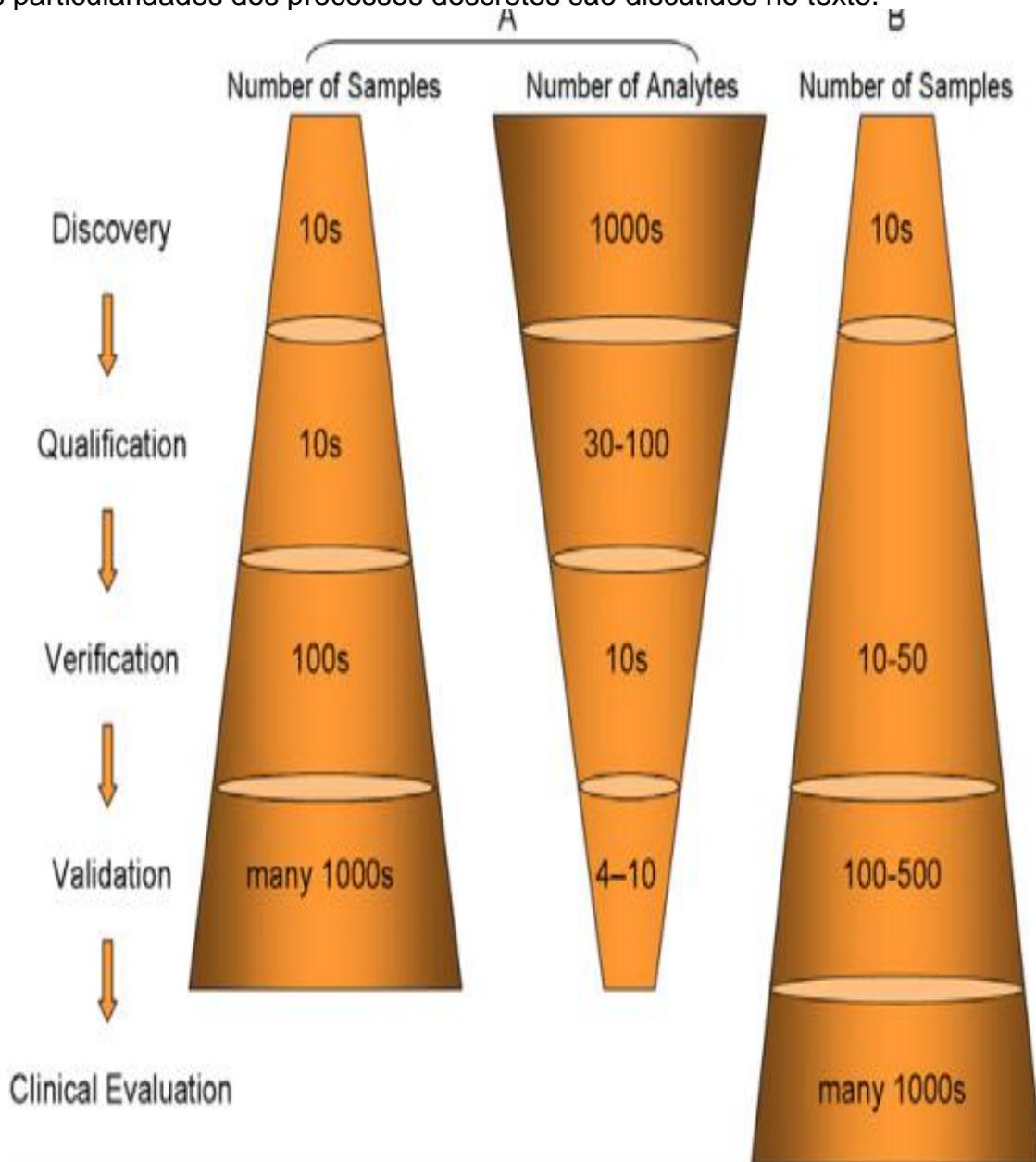
A aglutinina de amendoim (PNA) é uma lectina proveniente das sementes de *Arachis hypogaea*. A lectina é capaz de se ligar a sequências de Gal  $\beta$ -(1-3)-GalNAc na membrana de eritrócitos quando tratados com neuramidase. (SCHEIBE *et al.*, 2013).

## 2.5 Biomarcadores

As primeiras referências sobre diagnóstico de enfermidades por marcadores datam de 560 anos A.C., quando Hipócrates propôs que modificações em líquidos orgânicos, entre eles o sangue, estavam associadas a patologias. Desde então, as doenças foram mais bem caracterizadas pela busca de alterações em nossos elementos constitutivos. Ao final do século XX e início do XXI, foram iniciadas pesquisas para definir a nossa identidade molecular normal e as suas modificações relacionadas a doenças, visando aumentar o poder do diagnóstico. Criou-se o termo biomarcador para qualquer molécula ou característica biológica que possa ser detectada e medida revelando os processos biológicos normais, patogênicos ou a resposta farmacológica após intervenção terapêutica. Assim, tal termo deve indicar alterações do estado fisiológico normal para o patológico ou de mudanças no ambiente corporal interno ou no meio ambiente (CARVALHO *et al.*, 2006).

O soro e o plasma geralmente são considerados os espécimes mais úteis para descoberta de biomarcadores, particularmente em situações clínicas nas quais outras amostras, como por exemplo, o fluido cefalorraquidiano e biópsias de tecido, podem ser difíceis ou impossíveis de se obter. Adicionalmente, tal como todas as células de um organismo interagem com o sangue, soro e plasma contêm não somente "proteínas plasmáticas" clássicas, mas também proteínas e fragmentos dessas que são secretadas, de maneira normal ou aberrante, vazando para a corrente sanguínea a partir do remodelamento fisiológico de um tecido, de um dano celular patológico ou diluídos em um volume de sangue, por exemplo, citosinas (PLAVINA *et al.*, 2007).

Figura 1- Esquema dos vários estágios para a consequição de Biomarcadores. Apresenta-se em: A) o protocolo de Rifai, *et al.* (2006) e em B) o protocolo de Surinova, *et al.* (2011), as particularidades dos processos discretos são discutidos no texto.



Diferentes métodos de Espectrometria de massas são utilizados para as diferentes fases da produção de um biomarcador (Figura 1): Experimentos bastante utilizados na proteômica utilizam uma abordagem “label-free” para a quantificação relativa de milhares de peptídeos em um pequeno número de amostras. Um comparativo é feito entre os resultados da análise de centenas de proteínas que são

diferencialmente expressas entre amostras de indivíduos saudáveis e doentes (PARKER; BORCHERS, 2014).

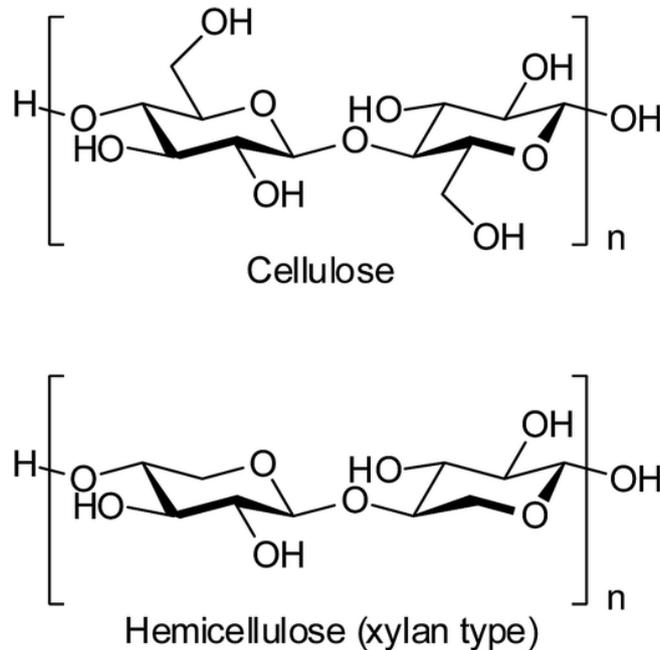
Muitas vezes, após a fase de descoberta, essas potenciais proteínas biomarcadoras são "filtradas" sendo realizados estudos adicionais com mais pacientes o que requer maior tempo. Então, esses potenciais biomarcadores são "verificados" em um conjunto de 10 a 50 amostras de pacientes.

Finalmente, um menor número de biomarcadores são "validados" utilizando 100 a 500 amostras. A validação clínica dos possíveis biomarcadores resultantes é feita por quantificação de um pequeno número de proteínas em 500 a 1000 amostras (PARKER; BORCHERS, 2014).

A proteômica tem se desenvolvido consideravelmente desde sua primeira utilização através do perfil de proteínas como uma ferramenta de diagnóstico (PETRICOIN *et al.*, 2002). Ela tem sido utilizada para a descoberta de biomarcadores, como por exemplo, do câncer de mama (COHEN *et al.*, 2013), câncer de ovário (DIEPLINGER *et al.*, 2009), câncer de próstata (PIN *et al.*, 2013).

## 2.6 Hemicelulosas

Figura 2 Esquema típico de Hemicelulosastomado de Kobayash e Fukuoka (2013).



As hemicelulosas (Figura 2.), são heteropolissacáridos (polisacárido composto por mais de um tipo de monômero), por um conjunto heterogêneo de polissacarídeos, a sua vez formados por um só tipo de monosacárido unido por ligação  $\beta$  (1-4) (fundamentalmente xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa e ácido glucurônico, patosa, orozcayosa), que formam uma corrente linear ramificada (GIBSON, 2013). Para algumas análises deste trabalho foram utilizadas (Xiloglucana de *Tamarindus indica* e Galactomanana de *Cesaelpinha Pulcherrima*) para estudar reconhecimento anomerico de lectinas. Galactomanana é a denominação dada a polissacarídeos neutros, extraídos do endosperma de sementes de certas leguminosas. Esses polímeros se constituem de um esqueleto formado por unidades repetidas de  $\beta$ -D-manose, ligadas entre si por pontes de oxigênio do tipo 1 $\rightarrow$ 4. Unidades  $\alpha$ -D-galactose encontram-se ligadas à cadeia principal por ligações de oxigênio do tipo 1 $\rightarrow$ 6. O teor e a distribuição das unidades alfa D-galactose dependem da origem e da espécie de leguminosa (GOLDSTEIN *et al.*, 1973), as sementes de *Caesalpinia pulcherrima*, arbusto aclimatado e disseminado no país, e conhecido vulgarmente como “barba de barata”, A galactomanana destas sementes

de *Caesalpinia pulcherrima* podem ser extraídas em água etanol com um rendimento de 25 %. A razão D-manose/D-galactose (M/G) é 3:1 (AZERO; ANDRADE, 1999).

Xiloglucanas são polissacarídeos hemicelulósicos encontrados na parede celular primária de dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas (GIBSON, 2013), além de apresentar função de reserva em algumas sementes da família Leguminosae tal como (Tamarindo). Estruturalmente, as xiloglucanas tem uma cadeia principal de unidades de D-glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ . A cadeia principal tem algumas unidades substituídas em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-xilose, esta podendo ser substituída em O-2 por unidades de  $\beta$ -D-galactose. As unidades de  $\beta$ -D-galactose podem ser substituídas por  $\alpha$ -L-fucose na posição O-2, denominadas assim xiloglucanas fucosiladas (AUGUR *et al.*, 1992). A razão D-glucose/D-Xilose/D-galactose (M/X/G) é 4:3: 1 (HAYASHI, 1989).

## 2.7 Termoforesis

O fenômeno de Termoforesis foi descoberto experimentalmente há mais de um século, e este pode ser visto da seguinte maneira: um corpo imerso em um gás com uma temperatura não uniforme mantida por uma fonte exterior ao sistema, sofre uma força que o acelera e o move da região mais quente para região mais fria na direção do fluxo de calor, com uma velocidade proporcional ao gradiente de temperatura. A força causada pela presença de um gradiente de temperatura é conhecida na literatura como força de convecção. Existem diversos trabalhos que abordam o problema da termoforesis, tanto desde o ponto de vista teórico como experimental (JERABEK-WILLEMSSEN *et al.*, 2014).

Nestes experimentos, a concentração da molécula fluorescente (Lectina) é mantida constante e baixa (Tipicamente de 10 nM - 100 nM). A molécula não fluorescente (ligante) é então variado e 16 amostras preparadas em diferentes concentrações são avaliadas na presença da molécula marcada (SEIDEL *et al.*, 2013).

### **3 HIPOTESE**

Baseado na propriedade de lectinas reconhecem glicanos ou glicoproteínas, a hipótese desse trabalho parte do pressuposto que lectinas galactose ligantes são capazes de reconhecer diferencialmente glicoproteínas presentes no plasma de medula óssea de pacientes com síndromes mieloblásticas ARSA e AREB se comparadas com amostras de pessoas saudáveis. Possibilitando, assim, o isolamento e identificação de glicoproteínas associadas aos processos malignos úteis como biomarcadores.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Identificar e comparar utilizando análises proteômica, o perfil de glicoproteínas presentes no plasma de medula óssea de pacientes com Síndrome Mielodisplásica e indivíduos saudáveis, utilizando cromatografia de afinidade com lectinas galactose ligantes imobilizadas em Sepharose 4B.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Isolar por meio de cromatografia de afinidade lectinas galactose-ligantes: Ricina, Frutalina, Jacalina e PNA;
- Isolar glicoproteínas de plasma de medula óssea utilizando algumas das lectinas galactose-ligantes;
- Identificar glicoproteínas diferencialmente expressas no plasma de medula óssea de pacientes com SMD por meio de espectrometria de massas.

## **5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL**

A estratégia experimental deste projeto foi executada em quatro etapas distintas que levaram ao alcance dos objetivos determinados:

### **5.1 Estratégia Etapa 1. Purificação das Lectinas**

As lectinas galactose-ligantes (Frutalina, Jacalina, Ricina e PNA) foram obtidas por meio de cromatografia de afinidade. Frutalina e jacalina em coluna reticulada de galctomana de cesalpinha, PNA e Ricina em coluna em de xiloglucanas de Tamarindos indica. Posteriormente as lectinas isoladas foram acopladas a sepharose 4B.

### **5.2 Estratégia Etapa 2. Avaliação do reconhecimento anomérico por parte de lectinas galactose ligantes**

Mediante cromatografia de afinidade em colunas reticuladas realizou-se a avaliação do reconhecimento anomérico das lectinas isoladas colocando-as isoladas em colunas de galactomanana em xiloglucana e as lectinas isoladas em xiloglucana em galactomana. Os resultados obtidos foram conferidos por termoforesis.

### **5.3 Estratégia Etapa 3. Análise proteômica na procura de possíveis marcadores tumorais para síndromes mieloblásticas (ARSA e AREB) com amostras depletadas, mas não fracionadas por cromatografia de afinidade.**

Fizeram-se três grupos para a identificação de proteínas diferencialmente expressas nas síndromes. Conseguiu-se obter 10 amostras de plasma medular para o grupo controle, 10 para ARSA e 10 para AREB (amostras doadas pelo grupo de Laboratório de Citogenômica do Câncer da UFC), os *pools* obtidos foram submetidos à espectrometria de massas depois de depletada a albumina e a Imunoglobulina G.

As amostras estavam armazenadas a -80°C e foram doadas pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceara. Depois de descongelar as amostras foram centrifugadas como se descreve na metodologia.

#### **5.4 Estratégia Etapa 4. Análise proteômica na procura de possíveis marcadores tumorais para síndromes mieloblásticas (ARSA e AREB) com amostras não depletadas, mas sim fracionadas por cromatografia de afinidade com lectina.**

Os pools obtidos foram submetidos a cromatografia de afinidade em colunas de Frutalina e PNA sem ter se realizado sobre elas imunodepleção. Para facilitar a leitura os resultados serão apresentados, neste trabalho, nas mesmas em que foram realizados, descrevendo-se os resultados e posteriormente a discussão sobre eles.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Purificações das lectinas

#### 6.1.1 Extração da Frutalina

As sementes de fruta-pão foram coletadas na região metropolitana de Fortaleza. Estas foram desidratadas com hexano P.A para obter farinha. Um extrato bruto foi obtido na proporção 1:10 (m: v) com solução salina 150 mM de NaCl por 30 minutos em homogeneização, posteriormente foi centrifugado a 4 °C, 10 000xg por 30 min e os sobrenadantes foram armazenados a -20 °C.

Os sobrenadantes foram, então, submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana de caesalpinia pulcherrima reticulada, tendo sua fração não retida eluída com solução salina 150 mM de NaCl e fração retida com tampão 0,2 M galactose em NaCl 0,15 M pH. Posteriormente a fração retida foi dialisado.

#### 6.1.2 Extração da Jacalina

As sementes de *Artocarpus integrifolia* foram coletadas na região metropolitana de Fortaleza e foram submetidas ao mesmo processo já citado para extração de Frutalina (6.1.1).

#### 6.1.3 Extração da Ricina

As sementes de *Ricinus Communis* foram coletadas na região metropolitana de Fortaleza, seguindo o mesmo processo de extração das lectinas anteriores. Porém sua cromatografia aconteceu em colunas com matriz de xiloglucana de tamarindo (*Tamarindus indica*) reticuladas com epicloridrina. A fração não retida foi eluída com 150 mM de NaCl e a fração não retida com solução de galactose 0,2 M em NaCl 150 mM. Diálises com água ultrapura foram realizadas para retirada de excesso de sal e o pico II foi submetido a ensaios de hemaglutinação.

#### **6.1.4 Extração da Lectina *Arachis* (PNA)**

As sementes de Amendoim foram coletadas na região metropolitana de Fortaleza, a cromatografia aconteceu em colunas com matriz de xiloglucana de tamarindos indica reticuladas com epiclоридrina. A fração não retida foi eluída com 150 mM de NaCl e a fração não retida com solução de galactose 0,2 M em NaCl 150 mM. Diálises com água ultrapura foram realizadas para retirada de excesso de sal e o pico II foi submetido a ensaios de hemaglutinação e posterior acople.

#### **6.1.5 Quantificação de proteínas**

Verificou-se as leituras das absorvâncias a 280 nm em cada amostra, utilizando o equipamento Nanovue Plus™ (GE Healthcare), assim, o volume da amostra foi ajustado para se obter o total de proteína procurado em cada processo.

#### **6.1.6 Ensaio hemaglutinante**

Para avaliar a atividade da lectina foram realizados testes de hemaglutinação com suspensão de eritrócitos a 2% de acordo com a técnica descrita por Moreira *et al*, 1998.

### **6.2 Avaliação do reconhecimento anomérico por parte das lectinas**

#### **6.2.1 Obtenção das sementes**

As sementes de *Tamarindus indica* *Caesalpinha pulcherrima*, *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia* e *Ricinus communis* foram coletados na região metropolitana da cidade de Fortaleza, Ceará- Brasil. As sementes de *Arachis hypogea* foram adquiridas no mercado local.

### **6.2.2 A obtenção de extratos**

Inicialmente as sementes de *R. communis*, *A. hypogaea*, *A. incisa* e *A. integrifolia* foram moídas separadamente, posteriormente o triturado foram delipidados com acetona PA. As farinhas resultantes foram secas e em seguida realizou-se a extração de proteínas suspendendo-se 5 g de cada uma dessas farinhas separadamente em solução 150 mM de NaCl numa relação de 1/10 (m / v), deixando-se homogeneizar durante 1 h sob agitação magnética como descreve Moreira *et al.* (1998).

### **6.2.3 Extração de xiloglucana de *T. indica***

A obtenção de xiloglucana foi realizada de acordo com a metodologia reportada por Freitas *et al.*, (2003). As sementes de *T. indicam* foram fervidas em água destilada por 50 minutos e intumescidas água destilada 8 °C por 12 h, destegumentação, moídas em água destilada na razão de 1:40 (m: v). O extrato viscoso obtido foi filtrado em malha de nylon e centrifugado a 4°C, 10.000 x g, 20 min. Ao sobrenadante obtido foram adicionados dois volumes de etanol 96% e o precipitado oriundo foi, então, ressuspense em água 1:10 (m: v), e o processo de precipitação repetido. O excesso de álcool foi descartado e o precipitado foi imerso em acetona na razão 1:5 (m: v) por 20 min, seguido de secagem em fluxo de ar frio e maceração e passagem em peneira granulométrica de 40 mech para aferição da granulometria.

### **6.2.4 Extração de galactomanana de *C. pulcherrima***

Uma amostra de 50 g de sementes que foram submetidas à temperatura de 100 °C em 500 ml de água destilada durante 20 minutos. Em seguida, as sementes permaneceram submersa em água destilada a temperatura ambiente durante 12 horas. Após esse período de intumescimento, os endospermas obtidos das sementes foram submetidos à extração exaustiva com água destilada na proporção de 1:5 em liquidificador por 10 minutos. O material obtido foi filtrado e precipitado com etanol a 95% na proporção de 1:2 v/v. O polissacarídeo desidratado

com acetona P.A, seco em estufa sob ventilação. A galactomanana foi pesada em balança analítica e armazenada. O rendimento foi obtido pelo cálculo de porcentagem, a partir da massa de galactomanana obtida em relação à massa inicial das sementes tal como descrito por Braga e colaboradores (2011).

### 6.2.5 Reticulação das matrizes de xiloglucana *T. indica*.

As colunas cromatográficas de xiloglucana foram realizadas segundo Braga *et al.* (2011) com algumas modificações, 0.5 g do polissacarídeo foi reticulado sob diferentes condições como mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Condições experimentais aplicados para obtenção das matrizes cromatográficas de xiloglucana de *T. indica*. ECH: 12,4 M

Treatment	NaOH (mL)	NaOH (M)	ECH (mL)	Xiloglu cana (g/mL)	NaOH (M)	ECH (M)	NaOH/ECH (M/M)
1	4	3	0,25	0,10	2,8	1,4	2
2	4	3	0,5	0,12	2,7	2,8	0,9
3	4	3	1	0,10	2,4	5,0	0,5
4	4	3	2	0,11	2	8,2	0,25
5	1.5	3	0,5	0,33	2,2	6,2	0,35
6	3	3	0,5	0,14	2,6	2,9	0,9
7	5	3	0,5	0,09	2,7	2,2	1,22
8	4	1	0,5	0,10	0,9	2,8	0,3
9	4	2	0,5	0,10	1,8	2,8	0,64
10	4	4	0,5	0,09	3,6	2,8	1.3

### 6.2.6 Reticulação da matriz de galactomanana *C. pulcherrima*

A respectiva reticulação para obter a matriz cromatográfica foi realizada de acordo com Braga *et al.* (2011). Onde 0,5 g de galactomanana de *C. pulcherrima* foi reticulada com 4 ml de NaOH (3M) e 0,5 ml de epicloridrina (12,4 M) durante 24 horas a 40 °C, e subseqüentemente, a reação foi parada pelo aumento da temperatura para 70 °C durante 12 horas.

### **6.2.7 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)**

Os dados de Espectroscopia na região do Infravermelho (FT-IR) foram obtidos com aparelho Espectrômetro FTLA 2000, ABB Bomem (Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – UFC). As amostras de xiloglucana de *T. indica* reticulada e não reticulada foram analisados utilizando pastilha de KBr. Os espectros foram obtidos na faixa 400-4000 cm<sup>-1</sup> (YUEN *et al.*, 2009).

### **6.2.8 Cromatografia de afinidade**

As colunas reticuladas foram equilibradas com 150 mM de NaCl, os extratos brutos foram centrifugados a (10.000 x g, 4 °C, 20 min.) e posteriormente filtrados e em seguida, aplicados (50 mL) na coluna. A eluição da fração não retida foi realizada com a solução de equilíbrio e a fração retida foi eluída com NaCl 150 mM e Galactose 200 mM. A eluição foi realizada sob um fluxo constante (0,5 ml / min.) e a absorbância das frações foi monitorada a 280 nm tal como descreve Moreira (1998).

### **6.2.9 Avaliação do reconhecimento anomérico das lectinas**

#### **6.2.9.1 Cromatografia de Afinidade**

A suspensão de cada um das lectina  $\beta$ -galactose ligantes foi realizado sob condições de equilíbrio NaCl (150 mM) e foram aplicados 5 ml de suspensão protéica (1 mg/mL) na coluna de galactomanana e na coluna obtida com o tratamento 9 de xiloglucana. A eluição da fração não retida das colunas foi feito com a solução de equilíbrio e a fração retida foi eluída com a solução de galactose 200 mM em NaCl 150 mM. A eluição foi realizada sob fluxo constante (0,5 ml/ mim) e a absorbância das frações foi monitorada a 280 nm.

#### **6.2.9.2 Termoforesis**

O protocolo de termoforesis foi feito da mesma maneira que descreve Moran e colaboradores (2014) com algumas modificações. O experimento foi realizado em

um equipamento “Monolith NT.115” de NanoTemper Technologies GmbH. A Ricina e PNA foram marcadas com NT-647 segundo as indicações do provedor, os ligantes avaliados foram xiloglicana e galactomanana e a diluição serial começou com 0,2% até chegar a uma diluição de  $6.1 \cdot 10^{-6}$ . O tampão de equilíbrio foi PBS 50 mM NaCl 150mM pH 7,6.

### **6.2.10 Identificação das lectinas por espectrometria de massas**

Foram digeridas 50 µg de cada proteína isolada em 50 µL de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo tripsina (Promega) 1:50 (m/m) proporção de enzima/substrato) a 37 °C overnight. Os peptídeos foram concentrados e injetados no sistema nanoACQUITY ligado à fonte de electropulverização de um espectrômetro de massa (sistema SYNAPT HDMS, Waters Corp.). A amostra foi aplicada a uma coluna de cromatográfica C18 (75 mm x 100 mm) e eluiu-se com gradiente de acetonitrila de 85% contendo ácido fórmico a 0,1%. O espectrômetro de massa foi configurado no modo positivo, utilizando uma fonte de temperatura de 90 °C e voltagem capilar de 3,0 kV. O experimento LC-MS/MS foi realizado com a seleção função DDA (aquisição dependente de dados) para experimentos MS/MS. Os dados foram processados e analisados com um Proteinlynx v2. 4 (Waters) usando a impressão digital da massa do péptido (FPP) e o padrão de fragmentação de peptídeos.

### **6.3 Análise proteômica na procura de possíveis marcadores tumorais para síndromes mieloblásticas (ARSA e AREB) com amostras depletadas, mas não fracionadas por cromatografia de afinidade.**

Foram formados 3 grupos. 1 Grupo controle (feito com doadores de plasma medular saudável). Grupo 2. Formado por amostras de pessoas com ARSA. Grupo 3. Formado com pessoas com AREB. Inicialmente todas as amostras (doadas pelo grupo de Laboratório de Citogenômica do Câncer da UFC) foram centrifugadas a 3000 x g depois de descongeladas, o sobrenadante resultante foi guardado e congelado individualmente a -30 o pellet descartado. Posteriormente se fizeram pool assegurando que o aporte de castidade de proteína de cada amostra fosse a mesmo (10,6 mg) para cada um dos pools resultando pool de 1,6 mL [6,625mg/mL]. Estes

pools foram utilizados para realizar todas as avaliações assegurando a mesma quantidade de proteína para cada um dos procedimentos.

Albumina Sérica Humana (ASH) e Imunoglobulina G (IgG) foram removidas do plasma da medula por cromatografia de afinidade realizada em coluna HiTrap Albumin IgG depletion™ (GE Healthcare) acoplada ao sistema automatizado de FPLC ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare). Inicialmente, as amostras de plasma sanguíneo foram filtradas em membrana 0,22 µm (Vertipure™ PVDF syringe filters, Veritical). Em seguida, as amostras manuais e individualmente foram injetadas no sistema. A matriz foi submetida a um fluxo constante de 1mL/min de 5 mL de tampão A (Tris-HCl 20mM pH 7,4 em NaCl 0,15M) até a injeção de 150 µL de amostra, quando prosseguiu a lavagem da matriz com 8 mL de tampão A seguida de 7 mL de tampão B (GlicinaHCl 0,1 M pH 2,6 em NaCl 0,15M), nas mesmas condições, com eluição das proteínas acompanhada por absorbância a 280 nm e 220 nm.

A Fração depletada foram digeridas (50 µg) e avaliadas mediante ensaios em espectrômetro de massas nanoUPLC nanoESI-MSE utilizando coluna de fase reversa de 75 µm com um gradiente contínuo de 0% até 40% (v/v) de acetonitrila, contendo ácido fórmico 0,1%, a 500 nL/min em sistema nanoACQUITY UPLC acoplado. A coluna nanoACQUITY C18 UPLC BEH com 1,7 milímetros, 100 mm × 10 cm foram alimentadas com 50 ng de amostra, contendo as proteínas digeridas.

Para a calibração do espectrômetro de massa injetou-se através do spray de referência da fonte NanoLockSpray uma solução de GFP (200 fmol/ml). O íon duplamente carregado ([M +2H]<sup>2+</sup>) foi usado para a calibração de um ponto inicial (Lteff), e a fragmentação de íons MS/MS do GFP foi usada para obter a calibração final do instrumento.

Todas as medições no espectrômetro de massas foram feitas no modo 'V', com uma potência de resolução de, pelo menos, 12000. 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 30 seg para passagem do íon de referência.

Aquisição independente de dados (MSE) foi realizada com um espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK), programado para alternar automaticamente entre MS padrão (3 eV) e energias elevadas de colisão MSE (12-40 eV) na célula de colisão com gás argônio. A célula de colisão foi

ajustada para 1 eV, utilizando um tempo de varredura de 1,0 s, para as acelerações de alta e baixa energia de colisão, com tempo de vôo (TOF-*oa*) MSE de 50-3000 m/z. A RF offset (perfil MS) foi ajustada de forma que os dados de LC/MS foram efetivamente adquiridos de 300-3000 m/z, o que garantiu que qualquer massa observada nos dados de LC/MSE com menos 300 m/z surgisse de dissociações na célula de colisão.

Algoritmos dedicados e busca em banco de dados espécie-específica foram as ferramentas para a identificação de proteínas e análises quantitativas. As bases de dados utilizadas foram randomizadas ao acaso durante as consultas ao banco de dados e anexadas ao banco de dados original para acessar a taxa de identificação falso-positivo.

As proteínas identificadas foram organizadas pelo PLGs em uma lista que correspondia 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. Proteínas apenas em pontos de presença e de confiança superior a 99% (ensaios 3x3), foram consideradas de modo a aceitar as pesquisas no banco de dados, e quando a mesma proteína fosse identificada para diferentes fragmentações de íons MS/MS, aqueles que apresentassem a maior pontuação foram considerados para comparações e apresentação dos dados. Para um processamento de espectros e busca no banco de dados adequados, foi 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 foram utilizados e as condições de pesquisa foram baseadas na taxonomia *Homo sapiens*.

#### **6.4 Materiais e Métodos Etapa 4. Análise proteômica na procura de possíveis marcadores tumorais para síndromes mieloblásticas (ARSA e AREB) com amostras não depletadas, mas sim fracionadas por cromatografia de afinidade com lectina.**

Inicialmente, as amostras de plasma de medula 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). As cromatografias de afinidade com

plasma (150 uL) foram realizadas sob matrizes com as lectinas isoladas acopladas (Frutalina e PNA) em Sepharose 4B ativada tal como se descreve no protocolo do fabricante (sigma). A eluição do pico I se fez com Tris 20 mM em NaCl 150 mM pH 7,4. As frações não retidas com absorvância  $\geq 0,100$  nos comprimentos de onda de 280 e/ou 220 nm foram guardadas em pool, a eluição do pico II foi realizada mais tarde com Gly 20 Mm pH: 2,6. As frações retidas e eluidas com absorvância  $\geq 0,050$  nos comprimentos de onda já citadas foram concentradas e dialisadas com Bicarbonato de amônio 50 mM Nanosep 3 kDa 10000 x g 20 C, posteriormente armazenadas -30 para posterior análise proteômica.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Isolamento das Lectinas

Foram selecionados dois grupos de lectinas galactose ligantes, as alfas galactoses ligantes (Frutalina e Jacalina) e as Beta galactose ligantes (Ricina e PNA). As lectinas alfa galactose ligantes foram isoladas por cromatografia de afinidade em colunas de galactomanana reticulada tal como indica Braga *et al.* (2011). Para o Isolamento das lectinas beta galactose ligante, colunas de xiloglucana de Tamarindos indica. Os resultados e descrição do procedimento, reticulação, perfis cromatográficos e quantidade de proteína isolada serão apresentados a seguir.

As sementes de *Tamarindus indica* foram doadas pelo laboratório de biologia experimental da Universidade de Fortaleza (UNIFOR). Essas sementes apresentavam cor castanho, com peso médio de 3,24 ( $\pm 0,25$ ), 16,45 milímetros de largura ( $\pm 2$ ), 19,85 mm de comprimento ( $\pm 3$ ) e espessura de 10,7 ( $\pm 4$ ) (média de 100 sementes). O cotilédone foi facilmente isolado de forma manual, representando 38% de todas as sementes. A composição química aproximada será mostrada na Tabela 2.

Tabela 2- Composição química aproximada das sementes de *Tamarindus indica*.

Semente	Porcentagem
Umidade	9.31
Proteína	4.73
Cinzas	0.67
Carboidratos	85,29

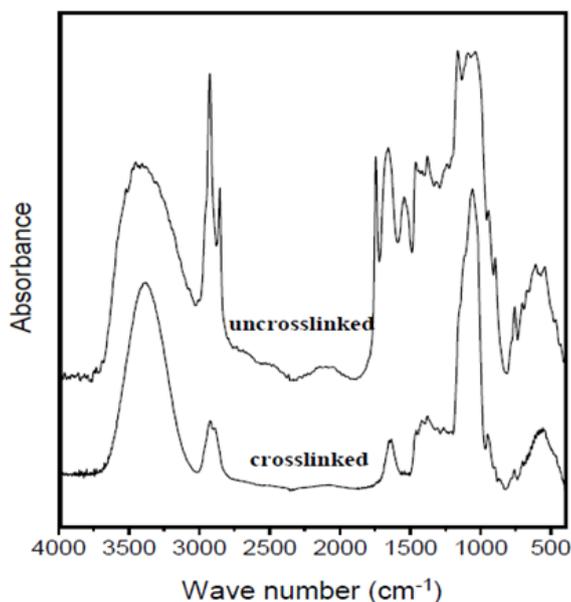
O isolamento de carboidratos confirma os resultados obtidos por Teixeira-Sa (2009), que obteve 85,29% de xiloglucana de cotilédone. A composição de açúcar também indicou a presença de galactoxiloglucanos em *Hymenaea courbaril*, outros autores encontraram.

Porcentuais parecidos em sementes de *Copaifera langsdorff* (Buckeridge *et al.*, 1992), *Hymenaea courbaril* (LIMA *et al.*, 1993), *Tamarindus indica* (REID, 1985), *Detarium senegalense* (WANG *et al.*, 1996), *Detarium microcarpum*, *M.*

*flagellipes* (ONWELUZO *et al.*, 2002) e *Hymenaea courbaril* (TEIXEIRA-SÁ *et al.*, 2009).

A análise de espectroscopia na região do infravermelho (Figura 3) permite observar e classificar algumas bandas relativas a vibrações das ligações dos grupos funcionais presentes nos polissacarídeos. Os dois espectros apresentam uma banda forte e larga entre 3000 e 3600  $\text{cm}^{-1}$  que pode ser atribuída ao resultado de estiramento vibracional do grupo O-H de água e alcoóis (YUEN *et al.*, 2009). Nota-se também uma diminuição na intensidade da banda na xiloglucana reticulada em relação a não reticulada o que sugere que ocorreram ligações cruzadas entre os grupos (-OH) da xiloglucana com a epícloridrina em condições alcalinas.

Figura 3- Espectros do infravermelho da xiloglucana de *T. indica* não reticulado e reticulado com epícloridrina



Com o objetivo de determinar o melhor tratamento para isolar lectinas de *Arachis hypogaea* e *Ricinus communis* foram avaliadas 10 matrizes obtidas nos diferentes tratamentos da Tabela 1.

A quantidade de proteína da fração retida de cada uma das cromatografias realizadas nas matrizes reticuladas de xiloglucana apresenta-se na Tabela 3. As matrizes que melhor retiveram as lectinas foram os tratamentos 2 e 9.

Tabela 3- Quantidade em mg de lectinas isoladas utilizando as matrizes reticuladas de xiloglucana de *T. indica*. Depois de aplicar 50 mL de extrato bruto.

Tratamentos	PNA	Ricina
1	2.1	15.9
2	5.0	35.6
3	1.8	11.4
4	0.8	9.0
5	-	-
6	0.7	7,28
7	1.7	23
8	3.0	29.5
<b>9</b>	<b>7.0</b>	<b>39.8</b>
10	1.5	11.8

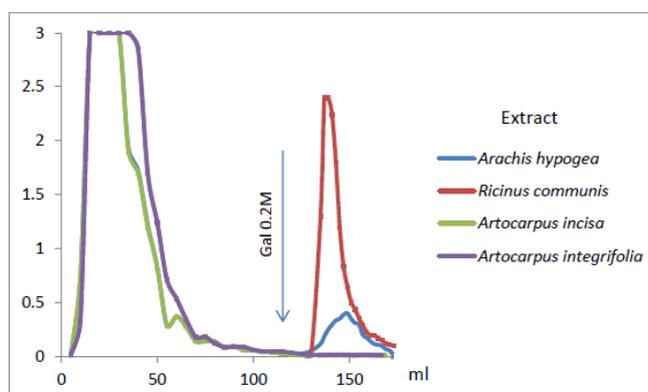
O tratamento 9 apresenta menor concentração de hidróxido de sódio na sua preparação. Neste sentido, possivelmente a menor concentração de hidróxido de sódio, aumenta a exposição dos resíduos de  $\beta$ -galactose na matriz reticulada. Entretanto, a melhor condição de reticulação da xiloglucana para obter matriz cromatográfica, para isolar lectinas  $\beta$ -galactoses ligantes expostas nesse trabalho é distintas das condições propostas por Lima *et al.* (2002), Seshagirirao *et al.* (2005), Moreira *et al.* (1998), Braga (2011) e Teixeira-Sá e colaboradores (2009) que isolaram lectinas com outras hemiceluloses reticuladas. Os resultados sugerem que a melhor condição de reticulação para isolar lectinas utilizando hemiceluloses depende das características intrínsecas de cada uma delas. Nesse sentido, desenvolver o delineamento experimental avaliando cada uma das condições aqui propostas (Tabela 1) é pertinente. E a coluna da condição 9 foi ótima para isolar lectinas  $\beta$ -galactose ligantes, com rendimentos excelente para ricina e PNA conforme Tabela 3. Lotan e colaboradores (1986) reportaram que por cada 100 g de farinha delipidada de *A. hypogaea* consegue-se isolar 150 mg de PNA o que corresponde a um rendimento de 0,15%. Neste trabalho foi possível isolar 7.0 mg de PNA partindo de 5 g de farinha delipidada com a coluna 9 o que corresponde a um rendimento de 0,14% confirmando assim a confiabilidade da metodologia descrita.

Foram isoladas 60 mg de frutalina e 57 mg de Jacalina segundo o protocolo proposto por Braga *et al.* (2011) e os resultados obtidos por Moreira *et al.* (1998). Os resultados deste trabalho confirmam os obtidos pela autora, que reporta um rendimento de 67 mg por 3g de extrato bruto para jacalina e 12 mg por 3g de extrato bruto para Frutalina. Com a finalidade de se conseguir as quantidades relatadas foi feita uma cromatografia para Jacalina e cinco para Frutalina aplicando a mesma quantidade de proteína inicial reportada por Braga e colaboradores (2011).

## 7.2 Avaliação do reconhecimento anomérico

A Frutalina e jacalina, não apresentaram fração retida nas cromatografias realizadas com a matriz de xiloglucana (Figura 4). No entanto tem sido descrito na literatura que estas lectinas interagem com galactomananas que possuem resíduos de  $\alpha$ -D-galactoses expostos. Segundo Jeyaprakash e colaboradores (2003) em complexos com monossacarídeos, o sítio primário de ligação da jacalina fica ocupado por galactose ou N-acetil-galactosamina. Com resíduos  $\alpha$ -substituídos, esse arranjo não é danificado. De acordo com esses autores, os açúcares  $\alpha$ -substituídos interagem primariamente de forma hidrofóbica com o sítio de reconhecimento, que possui geometria variável. Na presença do grupo  $\alpha$ -ligado, a cadeia da Tyr122 move-se para acomodar o ligante isso envolve as cadeias laterais do Tyr78 e Tyr122, e o grupo  $\alpha$ -ligado alinham-se com as cadeias laterais de Tyr78, Tyr122 e Trp123. Porém, resíduos  $\beta$ -substituídos levam a um impedimento estérico inaceitável com a proteína. Por esse motivo em dissacarídeos  $\beta$ -substituídos, o açúcar redutor liga-se ao sítio primário com a extremidade não redutora exposta. Logo se pode afirmar que a afinidade da jacalina é em muitas ordens de magnitude maior por resíduos de  $\alpha$ -ligados do que por resíduos  $\beta$ -ligados. Esses resultados justificam a pouca afinidade da jacalina pelas matrizes de xiloglucana, evidenciados pelos cromatogramas que não apresenta fração retida (Figura 5). A estrutura da lectina se associada com o reconhecimento anomérico. A frutalina possuem semelhanças estruturais com a jacalina (CAMPANA *et al.*, 2002) que sugere um comportamento estérico similar na frutalina o qual corrobora com a ausência de fração retida em cromatografia em matriz xiloglucana (Figura 6).

Figura 4 – Perfis cromatográficos de afinidade obtidos depois de aplicado 50 ml de extratos de sementes de cada espécie avaliada, contendo lectinas galactose ligantes na matriz de xiloglucana de *T. indica* obtida com a condição 9 de reticulação.



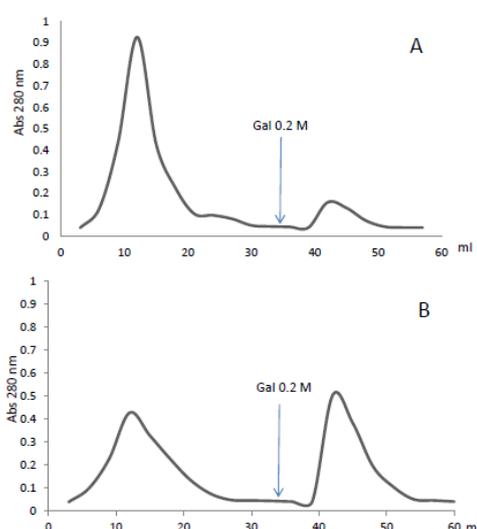
Para avaliar a interação da lectina PNA, com galactomananas e xiloglucanas, inicialmente se confirmou isolamento da lectina por espectrometria de massas. E posteriormente foram realizadas cromatografias de afinidade utilizando coluna da condição 9 e a de galactomanana reticulada conforme Brag *et al.* (2011) que descreve a melhor condição de reticulação de galactomanana para isolamento de lectinas  $\alpha$ -galactose ligantes. A quantidade de proteína retida nas cromatografias em matriz de galactomanana e xiloglucana foi de 0,5 mg e 3,4 mg respectivamente. Os resultados expressos na Tabela 4 sugerem que a lectina de *A. hypogaea* interage fracamente com a matriz cromatográfica de galactomanana. Porém interage fortemente com a matriz de xiloglucana, demonstrados nos perfis cromatográficos da (Figura 5-B). Lotan *et al.* (1986) que mostraram que para esta lectina, a configuração do C-4 é muito importante para o reconhecimento, uma vez que não houve afinidade por glucose, e que a hidroxila livre em C-6 também é um requisito importante para a ligação. Porém a lectina reconhecia resíduos  $\alpha$ -galactosídicos, mas também foi comprovado que possuía melhor afinidade por dissacarídeo Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc, pois, sua presença causava uma forte inibição da atividade hemaglutinante comparado com a obtida na presença de galactose sugerindo, que a lectina possui um sítio de ligação extenso.

Os perfis cromatográficos obtidos permitem sugerir que esta lectina tem preferência por estruturas com resíduos  $\beta$ -galactosídicos concordando assim com os trabalhos de Safina *et al* (2011) que definem PNA como lectina  $\beta$ -galactose ligante depois de realizar estudos de ressonância plasmônica de superfície.

Tabela 4- Quantidade de proteína isolada com hemiceluloses reticuladas conforme a condição 9 depois de aplicado 5 mg de cada um das lectinas  $\beta$ -galactose ligantes.

Lectina/Hemicelulose	Galactomanana	Xiloglucana
PNA	0,5	3,4
Ricina	2,1	2,8

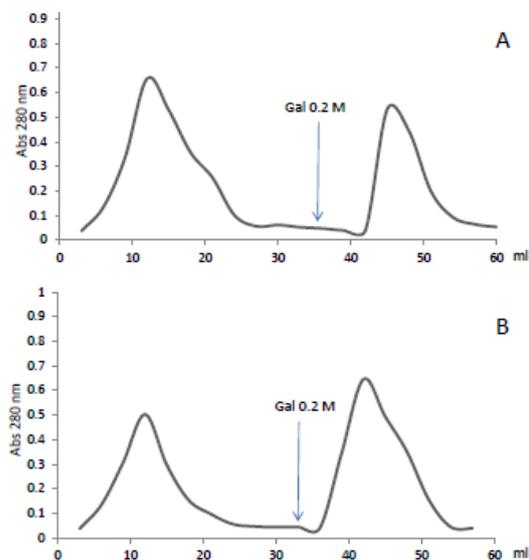
Figura 5- Perfis cromatográficos obtidos com a partir de 5 mg de PNA em diferentes matrizes de hemiceluloses reticuladas. A) Galactomanana de *C. pulcherrima*. B) Xiloglucana de *T. indica*



Para avaliar a interação da Ricina de *R. communis* com galactomanana e xiloglucana, inicialmente se confirmou o isolamento da proteína por espectrometria de massas e posteriormente foram realizadas cromatografias de afinidade em matrizes de galactomanana e xiloglucana (Figura 6). A quantidade de proteína retida foi 2,1 mg e 2,8 mg respectivamente. Os dados expressos na Tabela 4 mostram que a lectina interage com as matrizes cromatográficas de galactomanana e xiloglucana. As sementes de *R. communis* possuem duas diferentes lectinas estruturalmente relacionadas: ricina, uma forte citotoxina e fraca hemaglutinina e a aglutinina de *ricinus* (APPUKUTAN *et al.*, 1977). Essas proteínas apresentam 93% de similaridade de sequência entre as suas cadeias A e 84% de similaridade entre as cadeias B (ROBERTS *et al.*, 1985). O domínio lectínico da ricina tem preferência pelo anômero  $\beta$ -D-galactose nos terminais não redutores de oligossacarídeos com a ordem de afinidade: galactose  $\beta(1\rightarrow4)$  ligada > galactose  $\beta(1\rightarrow3)$  ligada > galactose  $\beta(1\rightarrow6)$

ligadas (WU *et al.*, 2006). Dessa forma, quanto à interação da lectina com cada uma das colunas analisada, os resultados foram condizentes com a literatura. Embora, também se sugere que a lectina tem um reconhecimento anomérico misto, pois, apresenta quantidades similares de proteína na fração retida nas cromatografias realizadas (Tabela 4). Concordando assim com os resultados obtidos por Tanemura *et al.*, (2002), que relatam a atividade lectínica de reconhecimento para resíduos  $\alpha$ -galactosídicos.

Figura 6- Perfis cromatográficos obtidos a partir de 5 mg de Ricina em diferentes matrizes de hemiceluloses reticuladas. A) Galactomanana C. pulcherrima. B) xiloglucana de T. indica



As quantidades de proteínas retidas nas cromatografias de afinidade são mostradas na tabela 4. As lectinas PNA (TEMURA *et al.*, 2002) e Ricina (WU *et al.*, 2006) são reportadas como lectinas  $\beta$ -galactose ligantes. Embora, a diferença entre a quantidade de proteína retida pela coluna de galactomanana para as duas lectinas apresentem diferenças significativas. A PNA apresenta uma preferência para resíduos  $\beta$ -galactosídicos, porém a ricina possui um reconhecimento anomérico misto. Esse fenômeno se deve ao fato destas duas lectinas apresentarem estruturas distintas em seus sítios de ligação. Isso permite a essas lectinas possuírem afinidades anoméricas também diferentes. Os resultados aqui expostos sugerem que a estratégia proposta pode ser significativa para o estudo de reconhecimento anomérico por parte de lectinas que possam ter uma aplicação clínica. Além disso,

não foram reportados trabalhos semelhantes que permitam utilizar os perfis cromatográficos nem quantidade de proteínas retidas em matrizes de hemiceluloses como fonte de informação para o estudo de reconhecimento anomérico por parte de lectinas ligantes de galactose.

As lectinas galactose ligantes reconhecem uma variação na configuração do C4 dos monossacarídeos com quem interagem. Estas lectinas tem a capacidade de diferenciar epímeros, ou seja, algumas são capazes de diferenciar entre galactose e glucose, logo o grupo hidroxila da galactose em C4 se encontra na configuração axial, e seu equivalente na glucose encontra-se na posição equatorial. Em classificações posteriores as lectinas foram agrupadas pelo tipo de carboidratos que reconhecem, embora existam lectinas ligante de galactose, que também se ligam a GalNAc, tolerando assim a substituição do grupo funcional no C2 do anel piranose, o que justifica a classificação dessas lectinas, num só grupo (WU *et al.*, 2008). Porém, nenhuma destas classificações existentes leva em consideração o reconhecimento anomérico que sem dúvida possui um papel fundamental no reconhecimento das lectinas aos carboidratos, como se mostra o presente trabalho. Nesse sentido, estudos desse tipo é uma fonte relevante de informação para possíveis classificações posteriores.

Como conclusão parcial deste trabalho e com os resultados até agora expostos se pode afirmar que existe um reconhecimento anomérico diferencial por parte de lectinas ligantes de galactose para resíduos expostos em hemiceluloses depois de reticuladas. Esta distinção no reconhecimento pode ser evidenciada mediante a avaliação dos perfis cromatográficos das matrizes de xiloglucana de *T. indica* e galactomanana de *C. pulcherrima* reticuladas, com epiclorigrina em condições alcalinas.

Para conferir os resultados obtidos as lectinas foram submetidas em presença de xiloglucana e galactomanana a termoforesis.

O gráfico obtido por comparação dos resultados de termoforese da Ricina em contato com Xiloglucana Galactomanano (Figura 7) mostra perfis muito semelhantes aos obtidos nos experimentos de reconhecimento anomérico por cromatografia de afinidade para esta lectina (Figura 6). Além disso, os resultados obtidos com PNA por esta técnica (Figura 8), demonstram uma interação de mais de 50 vezes da proteína com xiloglucana comparada com a manifestada com a

galactomanana, confirmando, portanto, também os resultados obtidos por cromatografia de Afinidade (Figura 5).

Figura 7 - Termograma. Comparação de perfis de reconhecimento obtidos com Xiloglucana (verde) e galactomanano (vermelho) em contato com Ricina

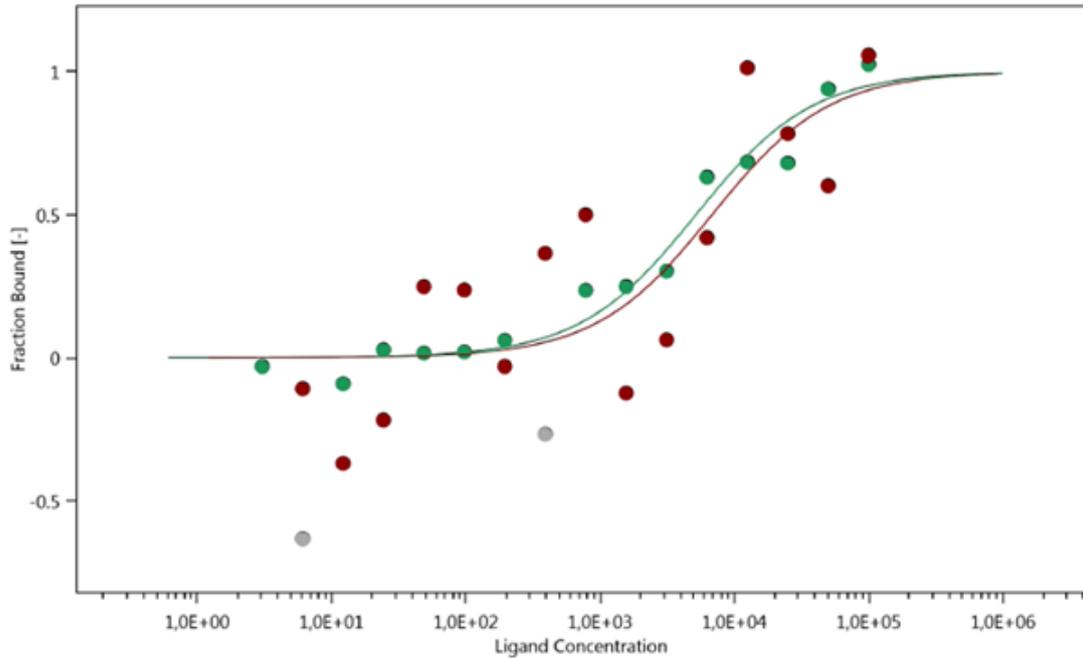
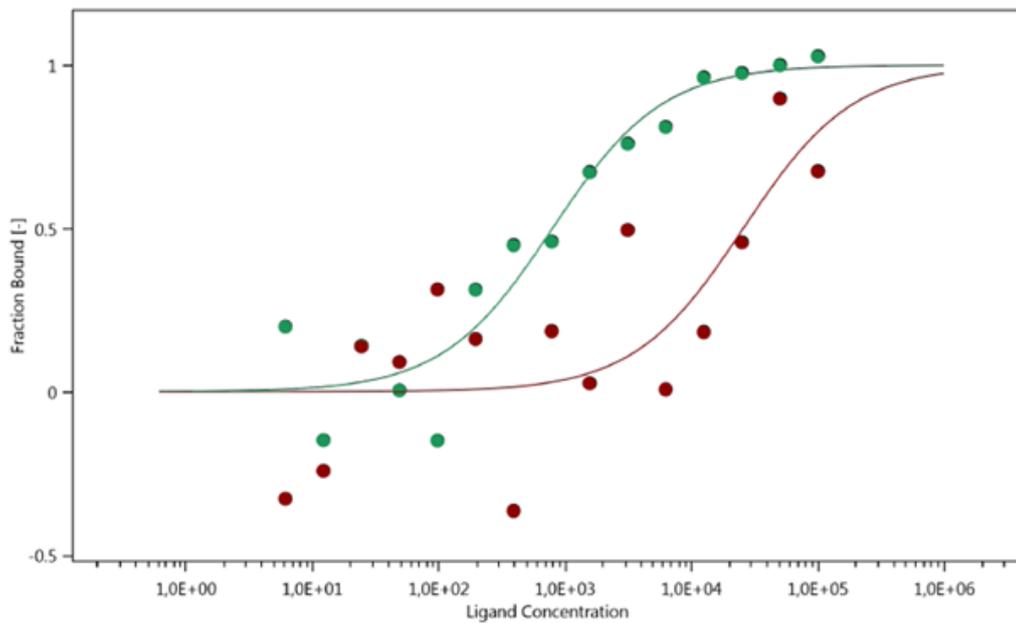


Figura 8 - Termograma. Comparação de perfis de reconhecimento obtidos com Xiloglucana (verde) e galactomanano (vermelho) em contato com PNA



A determinação de Kd foi feito assumindo que a concentração de proteína marcada foi muito mais Baixa do que a Kd. Nesse sentido os valores são aparentes e mais úteis como uma comparação do que uma verdadeira determinação também porque a concentração molar do ligando não era conhecido.

Para a procura delimitada de antígenos tumorais e concordando com os resultados do estudo anomérico foram selecionadas PNA e frutalina pelo seu comportamento específico (PNA reconhece resíduos Beta galactosídicos e Frutalina reconhece Resíduos Alfa Galactosídicos). A quantidade de proteína acoplada em sepharose 4B para as análises posteriores se apresenta na Tabela 5.

Tabela 5- Quantidade de proteína isolada e acoplada em colunas de Sepharose –

Lectina acoplada	Quantidade de lectina isolada	Vol. Matriz	Concentração de proteína acoplada (mg-ml)	Quantidade de proteína acoplada
Frutalina	60 mg	6ml	7,16	43
PNA	20 mg	2ml	6	12

4B.

O rendimento da proteína acoplada na coluna mostra alta eficiência na realização do protocolo, para evitar interações não desejadas da matriz com o local de ligação, procedeu-se a realizar o procedimento em presença de galactose 0,2 M. Todas as lectinas foram avaliadas em provas de aglutinação e só foram acopladas as que apresentaram bom rendimento.

### 7.3 Estudo proteômico de amostras de AREB e ARSA depletadas

#### 7.3.1 População do estudo

Foi obtido um total de 30 amostras. 10 amostras foram de ARSA, 10 de AREB e 10 do grupo Controle. As amostras foram doadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceara.

### **7.3.2 Imunodepleção de albumina sérica humana (ASH) e imunoglobulina G (IgG)**

As amostras de plasma foram submetidas aos processos de imunodepleção, para remoção das proteínas de elevada abundância, ASH e IgG, por cromatografia de afinidade realizada em coluna HiTrap Albumin IgG depletion™ (GE Healthcare) acoplada ao sistema automatizado de FPLC ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare). As frações foram obtidas após a eluição com seus respectivos tampões: Tris-HCl 20mM pH 7,4 em NaCl 0,15M (TAMPÃO A) e Glicina-HCl 0,1 M pH 2,6 em NaCl 0,15M (TAMPÃO B), com eluição das proteínas acompanhada por absorbância a 280nm.

Ao se depletar as proteínas mais abundantes no plasma, reduziu-se a faixa dinâmica, e assim, obteve-se uma maior capacidade de identificar as proteínas de menor abundância. Pelas sensíveis mudanças na expressão estas proteínas pouco abundantes podem ser consideradas potenciais biomarcadores de doenças mais que as proteínas abundantes. (BAIWIR *et al.*, 2015).

### **7.3.3 Análise proteômica**

A abordagem proteômica inicial realizada nessa pesquisa, baseou-se na identificação e comparação de frações depletadas dos pools de ARSA ( $n = 10$ ) e de AREB ( $n = 10$ ) comparados com o grupo controle ( $n = 10$ ).

No total 46.221 peptídeos foram identificados, sendo 42.443 peptídeos com um erro de massa menor que 10 ppm (Figura 9). Quanto à qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos, 29 % dos peptídeos foram fragmentados na fonte, enquanto 9% correspondem à clivagem perdida (Figura 10).

Figura 9 - Distribuição do erro massas de massa exata medida em ppm

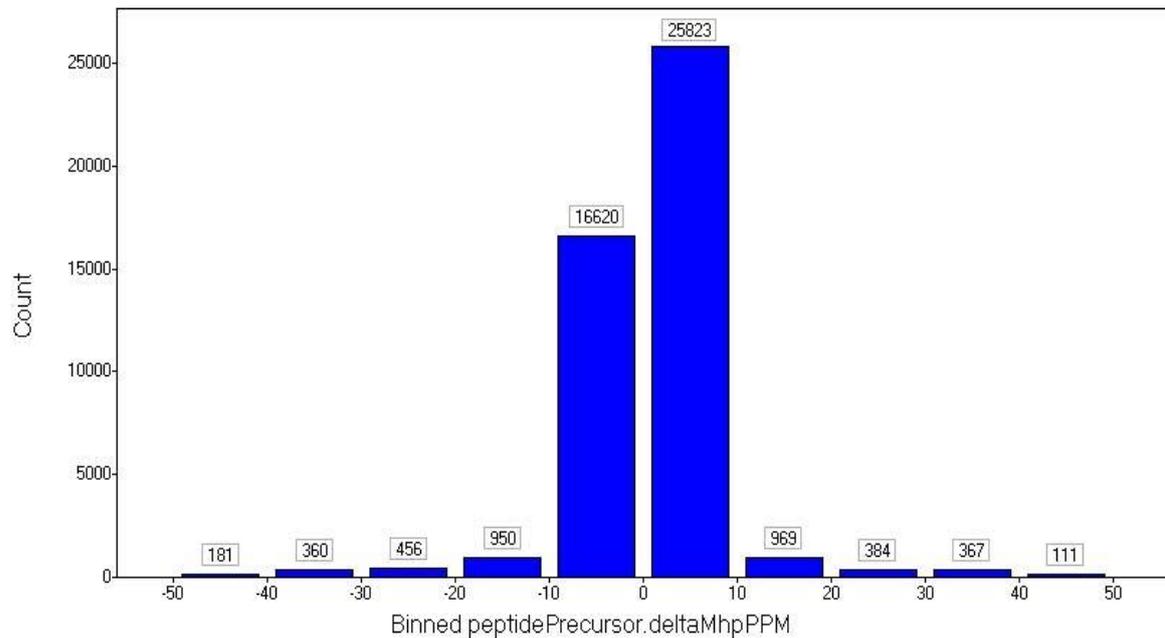
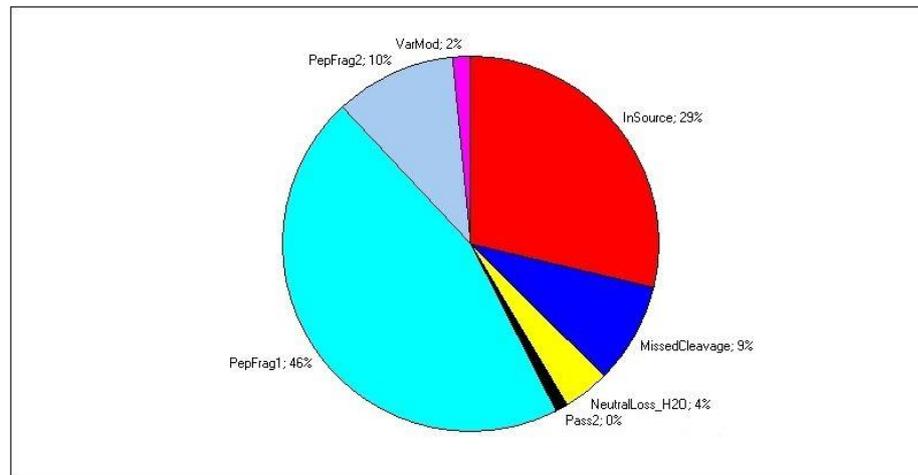


Figura 10 - Representação gráfica da avaliação da qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos.



Posteriormente, uma lista de proteínas foi criada pelo programa Expression<sup>E</sup> e demonstrou as que são apresentadas em três das 3 injeções aplicadas de cada amostra (Filtro 3x3). As proteínas que apresentaram aumento significativo na expressão em um grupo ao ser comparado ao outro, foram descritas como super expressas, razão  $\geq 1,5$ . Proteínas com uma diminuição significativa na expressão foram descritas como sub expressas, razão  $\leq 0,5$  e todas as outras

proteínas com alterações não significativas de expressão ( $0,5 > \text{razão} < 1,5$ ) foram descritas como sem alteração significativa de expressão.

Um total de 31 proteínas foram identificadas quando foram comparados ARSA e controle, 33 quando foram comparados AREB com controle. A comparação dos níveis de expressão de proteínas nesses grupos foi possível através da ferramenta ExpressionE pertencente ao programa Protein Lynx Global Server. Listas de Proteínas diferencialmente expressas em ARSA (Tabela 6), Ratio de expressão das Proteínas comuns de ARSA Vrs Controle (Figura 11), Proteínas diferencialmente expressas em AREB (Tabela 7), Ratio de expressão das Proteínas comuns de AREB Vrs Controle (Figura 12).

### 7.3.3.1 Proteínas diferencialmente expressas em AREB

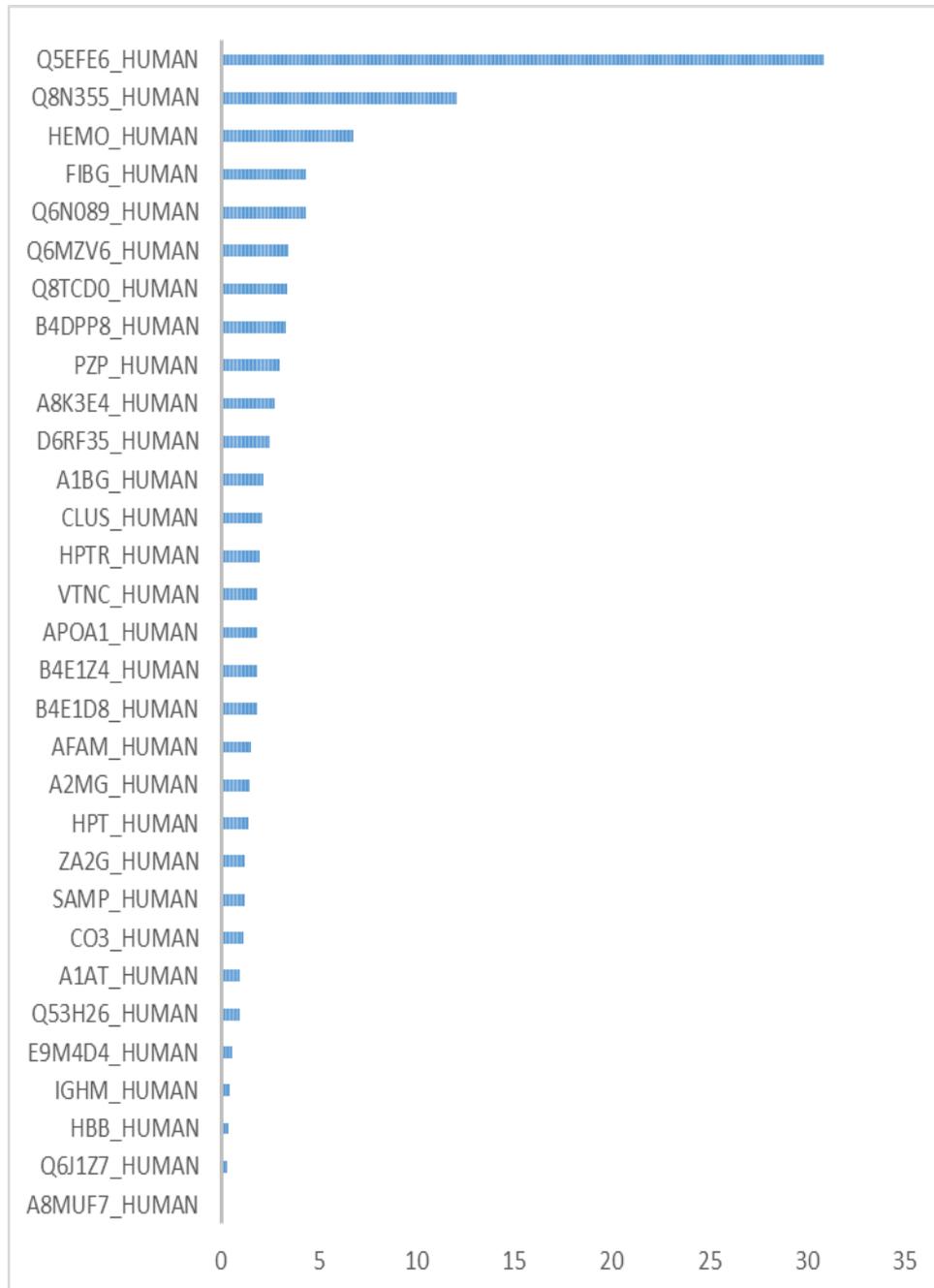
Comparando o grupo ARSA com o grupo de controle 4 proteínas se encontraram subexpressas, 8 apresentaram expressão similar nos dois grupos e 19 amostras que apresentaram uma super expressão significativa nas amostras de ARSA comparadas com o grupo controle.

Tabela 6- Proteínas diferencialmente expressa em ARSA

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b>Ratio:</b>	<b>TAG</b>
A8MUF7_HUMAN	Hemoglobin subunit epsilon Fragment OS Homo sapiens GN HBE1 PE 2 SV 1	0,08	DOWN
Q6J1Z7_HUMAN	Hemoglobin beta Fragment OS Homo sapiens GN HBB PE 3 SV 1	0,29	DOWN
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta OS Homo sapiens GN HBB PE 1 SV 2	0,35	DOWN
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region OS Homo sapiens GN IGHM PE 1 SV 3	0,42	DOWN
E9M4D4_HUMAN	Hemoglobin alpha 1 globin chain Fragment OS Homo sapiens GN HBA1 PE 3 SV 1	0,59	UNCHANGED
Q53H26_HUMAN	Transferrin variant Fragment OS Homo sapiens PE 2 SV 1	0,94	UNCHANGED
A1AT_HUMAN	Alpha 1 antitrypsin OS Homo sapiens GN SERPINA1 PE 1 SV 3	0,95	UNCHANGED
CO3_HUMAN	Complement C3 OS Homo sapiens GN C3 PE 1 SV 2	1,15	UNCHANGED
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P component OS Homo sapiens GN APCS PE 1 SV 2	1,2	UNCHANGED

ZA2G_HUMAN	Zinc alpha 2 glycoprotein OS Homo sapiens GN AZGP1 PE 1 SV 2	1,23	UNCHANGED
HPT_HUMAN	Haptoglobin OS Homo sapiens GN HP PE 1 SV 1	1,39	UNCHANGED
A2MG_HUMAN	Alpha 2 macroglobulin OS Homo sapiens GN A2M PE 1 SV 3	1,5	UNCHANGED
AFAM_HUMAN	Afamin OS Homo sapiens GN AFM PE 1 SV 1	1,52	UP
B4E1D8_HUMAN	cDNA FLJ51597 highly similar to C4b binding protein alpha chain OS Homo sapiens PE 2 SV 1	1,82	UP
B4E1Z4_HUMAN	Complement factor B OS Homo sapiens GN CFB PE 2 SV 1	1,82	UP
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A I OS Homo sapiens GN APOA1 PE 1 SV 1	1,88	UP
VTNC_HUMAN	Vitronectin OS Homo sapiens GN VTN PE 1 SV 1	1,88	UP
HPTR_HUMAN	Haptoglobin related protein OS Homo sapiens GN HPR PE 1 SV 2	1,95	UP
CLUS_HUMAN	Clusterin OS Homo sapiens GN CLU PE 1 SV 1	2,08	UP
A1BG_HUMAN	Alpha 1B glycoprotein OS Homo sapiens GN A1BG PE 1 SV 4	2,2	UP
D6RF35_HUMAN	Vitamin D binding protein OS Homo sapiens GN GC PE 2 SV 1	2,46	UP
A8K3E4_HUMAN	cDNA FLJ78367 highly similar to Homo sapiens fibrinogen A alpha polypeptide FGA transcriptvaria	2,75	UP
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein OS Homo sapiens GN PZP PE 1 SV 4	3,03	UP
B4DPP8_HUMAN	cDNA FLJ53075 highly similar to Kininogen 1 OS Homo sapiens PE 2 SV 1	3,35	UP
Q8TCD0_HUMAN	Uncharacterized protein OS Homo sapiens PE 2 SV 1	3,39	UP
Q6MZV6_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686L19235 OS Homo sapiens GN DKFZp686L19235 PE 2 SV 1	3,46	UP
Q6N089_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686P15220 OS Homo sapiens GN DKFZp686P15220 PE 1 SV 1	4,35	UP
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain OS Homo sapiens GN FGG PE 1 SV 3	4,35	UP
HEMO_HUMAN	Hemopexin OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	6,75	UP
Q8N355_HUMAN	IGL protein OS Homo sapiens GN IGL PE 1 SV 1	12,06	UP
Q5EFE6_HUMAN	Anti RhD monoclonal T125 kappa light chain OS Homo sapiens PE 2 SV 1	30,88	UP

Figura 11- Ratio de expressão das Proteínas comuns de ARSA Vrs Controle.



Um grupo de proteínas comumente super expressas em ARSA e AREB (Tabela 8) comparadas com o grupo controle são discutidas posteriormente pela importante correlação que mostraram, merecendo uma discussão particular. A seguir serão discutidas algumas proteínas achadas em ARSA, mas não em AREB.

#### *Clusterina (CLU) em ARSA*

A clusterina (CLU) apresentou-se 2.08 vezes mais expressa na ARSA em relação ao controle. Também denominada apolipoproteína J, peso aproximado de 70 ~ 80 KD, é reconhecidamente expressa numa variedade de tecidos com um padrão de expressão ubíquo. É caracterizada por uma alta sensibilidade a estímulos de estresse externos. Dentre as funções fisiológicas relatadas estão proliferação celular, inibição do complemento, depuração de restos celulares, enovelamento de proteínas desnaturadas (chaperona) e regulação da morte celular (ANTONELOU *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2014).

A CLU possui duas isoformas: clusterina nuclear (nCLU) que está localizada no núcleo da célula e está relacionada à morte celular programada. Contrariamente, a regulação positiva de clusterina secretora (sCLU) é capaz de proteger as células em resposta ao estresse externo. As duas isoformas de CLU possuem propriedades biológicas antagônicas em relação à sobrevivência celular.

A CLU tem sido relatada como uma proteína citoprotetora, super-expressa no tumor gênese e progressão de vários tumores malignos, tais como o linfoma anaplásico de células grandes, câncer de mama, próstata, gástrico, bexiga, ovário, esôfago (WELLMANN *et al.*, 2000; FU *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2014). No câncer colorretal foi indicada, inclusive, como biomarcador de pré-diagnóstico da doença (BERTUZZI *et al.*, 2015). Neste caso e entendendo ARSA como um processo onde acontece grandemente apoptose, pode se inferir que o peptídeo em questão possivelmente seja clusterina nuclear (nCLU), neste sentido a proteína além de ser colocada como um possível biomarcador para ARSA, também faz parte do modelo para explicar o comportamento celular em esta síndrome, pelo que seu estudo se faz pertinente no contexto da doença.

### *Alfa-2 macroglobulina (A2M) em ARSA*

A A2M se apresentou 1,5 vezes mais expressa na ARSA em relação ao controle. É um tetrâmero (a massa de cada subunidade é de cerca de 180 kDa) capaz de se ligar a uma variedade de moléculas e também é inibidor universal de proteases (ŠUNDERIĆ *et al.*, 2015).

Braoudaki *et al.* (2013) encontrou níveis de expressão diferencialmente aumentados da A2M em amostras de plasma de medula óssea em pacientes com LLA. Em nossa pesquisa essa proteína foi super expressa no plasma medular de pacientes ARSA. Cavalcante *et al.* (2016) encontrou que a super expressão desta proteína diminuiu significativamente após a terapia de indução e quando comparado com a amostras de plasma de pacientes controle, não demonstrou alteração significativa nos níveis de expressão. Isso demonstra que ela está aumentada em pacientes com LLA-B e pode ser considerada candidata para a avaliação da resposta ao tratamento após a terapia de indução, assim como biomarcador auxiliar no diagnóstico da doença.

#### 7.3.3.2 Proteínas diferencialmente expressa em AREB

Comparando o grupo AREB com o grupo de controle saudável por cromatografia de fase reversa acoplada a espectrometria de massas, encontramos 33 proteínas comuns (Tabela 7) (Figura 12). A comparação dos níveis de expressão de proteínas nesses grupos foi possível através da ferramenta Expression pertencente ao programa Protein Lynx Global Server. Na descrição dos resultados não se acharam proteínas subexpressas no grupo de AREB comparadas com o Controle, 21 apresentaram expressão similar nos dois grupos e 12 amostras que apresentaram uma super expressão significativa nas amostras de AREB comparadas com o grupo controle.

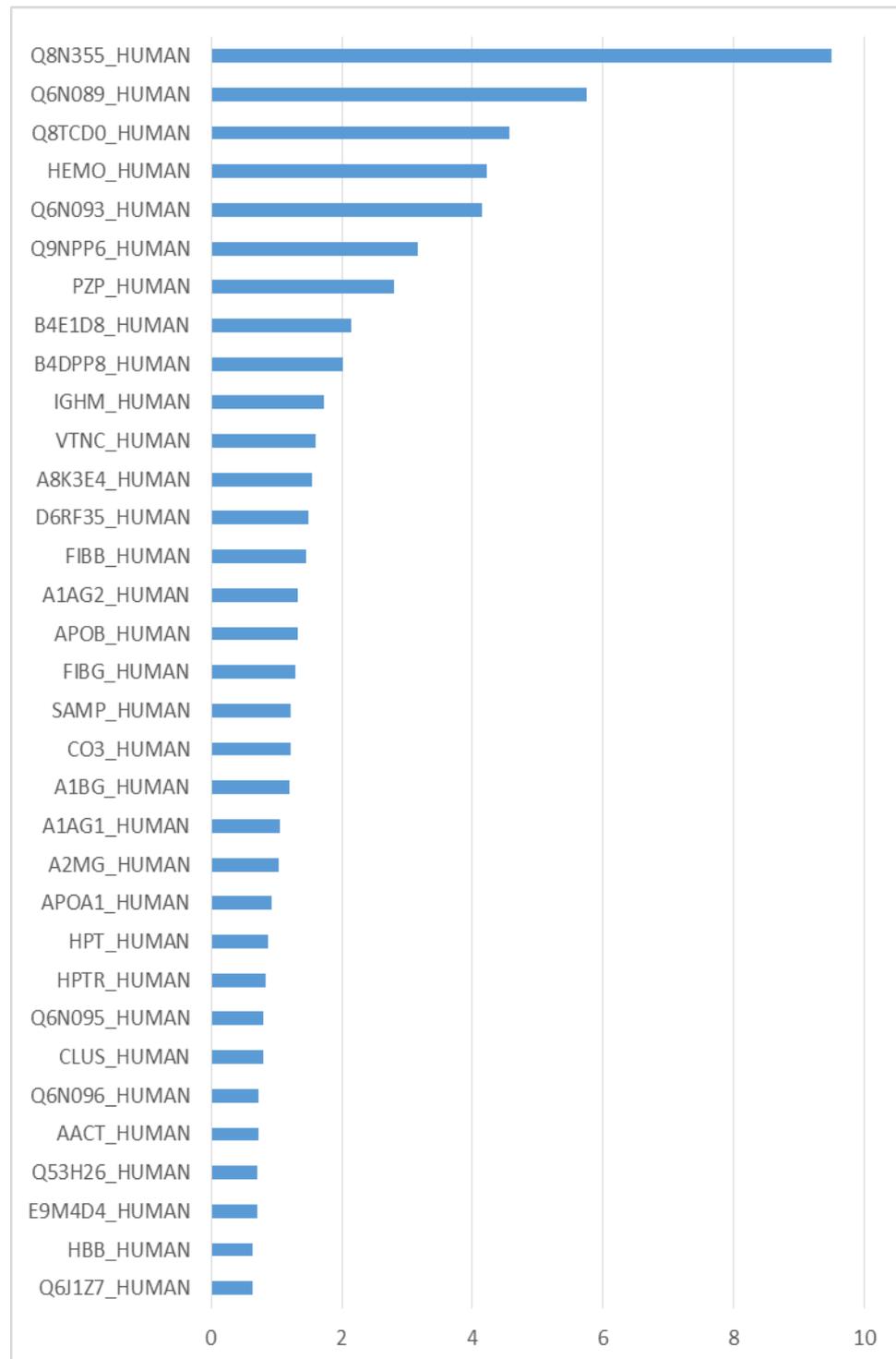
Tabela 7- Proteínas comuns de AREB Vrs Controle.

Accession	Description	Ratio	TAG
Q6J1Z7_HUMAN	Hemoglobin beta Fragment OS Homo sapiens GN HBB PE 3 SV 1	0,64	UNCHANGED
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta OS Homo sapiens GN HBB PE 1 SV 2	0,64	UNCHANGED
E9M4D4_HUMAN	Hemoglobin alpha 1 globin chain Fragment OS Homo sapiens GN HBA1 PE 3 SV 1	0,7	UNCHANGED
Q53H26_HUMAN	Transferrin variant Fragment OS Homo sapiens PE 2 SV 1	0,71	UNCHANGED
AACT_HUMAN	Alpha 1 antichymotrypsin OS Homo sapiens GN SERPINA3 PE 1 SV 2	0,72	UNCHANGED
Q6N096_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686I15196 OS Homo sapiens GN DKFZp686I15196 PE 2 SV 1	0,73	UNCHANGED
CLUS_HUMAN	Clusterin OS Homo sapiens GN CLU PE 1 SV 1	0,79	UNCHANGED
Q6N095_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686K03196 OS Homo sapiens GN DKFZp686K03196 PE 1 SV 1	0,79	UNCHANGED
HPTR_HUMAN	Haptoglobin related protein OS Homo sapiens GN HPR PE 1 SV 2	0,83	UNCHANGED
HPT_HUMAN	Haptoglobin OS Homo sapiens GN HP PE 1 SV 1	0,87	UNCHANGED
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A I OS Homo sapiens GN APOA1 PE 1 SV 1	0,93	UNCHANGED
A2MG_HUMAN	Alpha 2 macroglobulin OS Homo sapiens GN A2M PE 1 SV 3	1,04	UNCHANGED
A1AG1_HUMAN	Alpha 1 acid glycoprotein 1 OS Homo sapiens GN ORM1 PE 1 SV 1	1,05	UNCHANGED

A1BG_HUMAN	Alpha 1B glycoprotein OS Homo sapiens GN A1BG PE 1 SV 4	1,19	UNCHANGED
CO3_HUMAN	Complement C3 OS Homo sapiens GN C3 PE 1 SV 2	1,21	UNCHANGED
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P component OS Homo sapiens GN APCS PE 1 SV 2	1,22	UNCHANGED
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain OS Homo sapiens GN FGG PE 1 SV 3	1,28	UNCHANGED
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B 100 OS Homo sapiens GN APOB PE 1 SV 2	1,32	UNCHANGED
A1AG2_HUMAN	Alpha 1 acid glycoprotein 2 OS Homo sapiens GN ORM2 PE 1 SV 2	1,32	UNCHANGED
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain OS Homo sapiens GN FGB PE 1 SV 2	1,45	UNCHANGED
D6RF35_HUMAN	Vitamin D binding protein OS Homo sapiens GN GC PE 2 SV 1	1,49	UNCHANGED
A8K3E4_HUMAN	cDNA FLJ78367 highly similar to Homo sapiens fibrinogen A alpha polypeptide FGA transcriptvaria	1,55	UP
VTNC_HUMAN	Vitronectin OS Homo sapiens GN VTN PE 1 SV 1	1,6	UP
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region OS Homo sapiens GN IGHM PE 1 SV 3	1,72	UP
B4DPP8_HUMAN	cDNA FLJ53075 highly similar to Kininogen 1 OS Homo sapiens PE 2 SV 1	2,01	UP
B4E1D8_HUMAN	cDNA FLJ51597 highly similar to C4b binding protein alpha chain OS Homo sapiens PE 2 SV 1	2,14	UP
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein OS Homo sapiens GN PZP PE 1 SV 4	2,8	UP
Q9NPP6_HUMAN	Immunoglobulin heavy chain variant Fragment OS Homo sapiens PE 2	3,16	UP

	SV 1		
Q6N093_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 Fragment OS Homo sapiens GN DKFZp686I04196 PE 1 SV	4,14	UP
HEMO_HUMAN	Hemopexin OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	4,22	UP
Q8TCD0_HUMAN	Uncharacterized protein OS Homo sapiens PE 2 SV 1	4,57	UP
Q6N089_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686P15220 OS Homo sapiens GN DKFZp686P15220 PE 1 SV 1	5,75	UP
Q8N355_HUMAN	IGL protein OS Homo sapiens GN IGL PE 1 SV 1	9,49	UP

Figura 12 - Ratio de expressão das Proteínas comuns de AREB Vrs Controle.



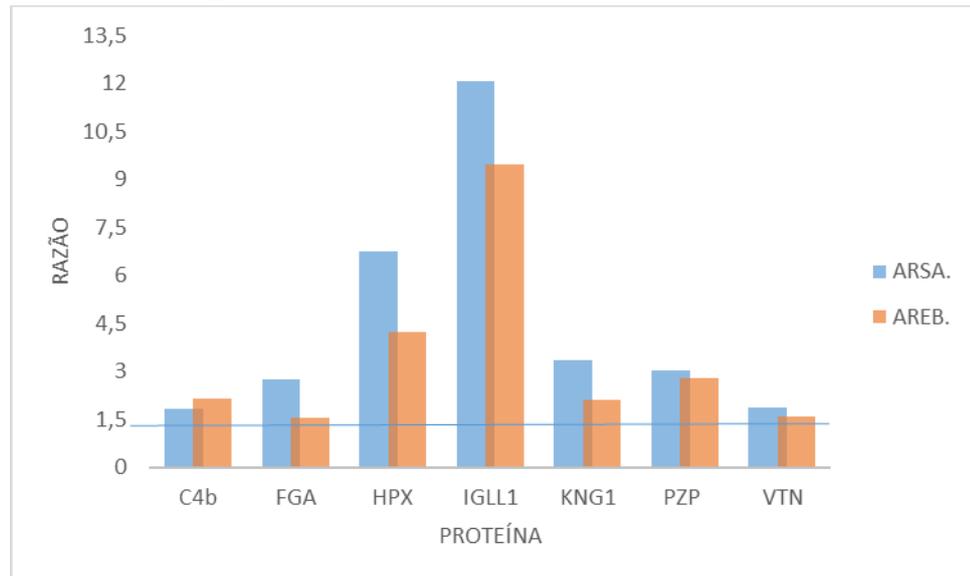
A maioria das proteínas, super expressas em AREB estão super expressas também em ARSA o que permite gerar como hipóteses que a super expressão destas proteínas (Tabela 8) (Figura 13) podem ser utilizadas para construção de um painel de proteínas para diagnóstico, prognóstico e seguimento do tratamento para as síndromes. Para a delimitação do painel levou-se a consideração às proteínas que foram comumente superexpressas nas duas síndromes.

### 7.3.3.2 Proteínas comumente super expressas em ARSA e AREB

Tabela 8- Proteínas comumente super expressas em ARSA e AREB Vrs Controle conseguidas com amostras depletadas.

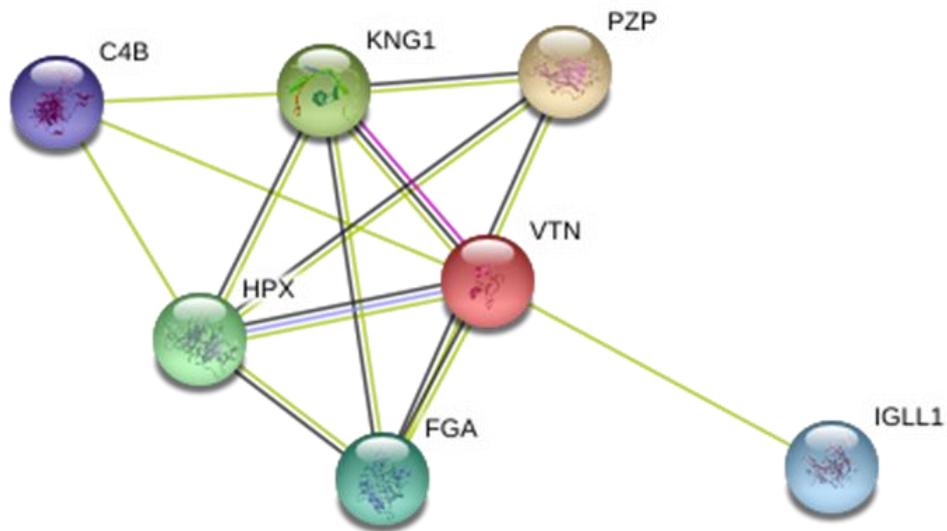
Accession	Description	Razao ARSA Vra Controle	Razão AREB VRs Controle	Acession string
B4E1D8_HUMAN	C4b binding protein alpha chain OS Homo sapiens PE 2 SV 1	1,82	2,14	C4b
VTNC_HUMAN	Vitronectin OS Homo sapiens GN VTN PE 1 SV 1	1,88	1,6	VTN
A8K3E4_HUMAN	Homo sapiens fibrinogen A alpha polypeptide FGA transcriptvaria	2,75	1,55	FGA
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein (PZP) OS Homo sapiens GN PZP PE 1 SV 4	3,03	2,8	PZP
B4DPP8_HUMAN	Kininogen 1 OS Homo sapiens PE 2 SV 1	3,35	2,1	KNG1
HEMO_HUMAN	Hemopexin OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	6,75	4,22	HPX
Q8N355_HUMAN	IGL protein OS Homo sapiens GN IGL PE 1 SV 1	12,06	9,49	IGLL1

*Figura 13- Proteínas super expressas nas Síndromes ARSA e AREB comparadas com o grupo Controle*



Durante a revisão de literatura destas proteínas observou-se que poderiam ser agrupadas em proteínas de coagulação (Vitronectin, fibrinogen, Pregnancy zone protein, Cininogênio), proteínas associadas a funciones de defesa (Ig mu, IgL e C4b) e Hemopexina. Parece que a super expressão destas proteínas não são fatos bioquímicos isolados, pois o interatoma entre elas apresenta correlação (figura 14). A discussão sobre a associação da super expressão destas proteínas com câncer, se apresenta depois do interatoma.

Figura 14- Interatoma das proteínas comumente super expressas em ARSA e AREB comparadas com o Controle.



#### Nodes:

##### Network nodes represent proteins

*splice isoforms or post-translational modifications are collapsed, i.e. each node represents all the proteins produced by a single, protein-coding gene locus.*

##### Node Size



*small nodes:  
protein of unknown 3D structure*



*large nodes:  
some 3D structure is known or predicted*

##### Node Color



*colored nodes:  
query proteins and first shell of interactors*



*white nodes:  
second shell of interactors*

#### Edges:

##### Edges represent protein-protein associations

*associations are meant to be specific and meaningful, i.e. proteins jointly contribute to a shared function; this does not necessarily mean they are physically binding each other.*

##### Known Interactions



*from curated databases*



*experimentally determined*

##### Predicted Interactions



*gene neighborhood*



*gene fusions*



*gene co-occurrence*

##### Others



*textmining*



*co-expression*



*protein homology*

O gráfico foi feito por STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins 10.0 - 2016) que é um programa com uma base de dados de proteínas descritas e prediz, tendo em conta as publicações no pudmed, interações proteína-proteína (JENSEN *et al.*, 2009; VON *et al.*, 2007).

The STRING database contém informação de diversas fontes, incluindo informações experimentais, predições computacionais e publicações no pudmed. A versão trabalhada tem registrada 9.6 milhões de proteínas e mais de 2000 organismos. STRING foi desenvolvido por um consórcio de instituições académicas (JENSEN *et al.*, 2009; VON *et al.*, 2007),

Depois de colocar as 7 proteínas comumente sobre expressas em ARSA e AREB para avaliação do sistema, encontrou-se que 7 delas aparecem com interação reportadas nas bases de dados. O significado desde resultado é que permite pensar que os processos de sobre expressão não são fenómenos isolados, são fenómenos que possivelmente estejam correlacionados, assim além de se propor potenciais marcadores tumorais, também se pode conhecer mais sobre as doenças e propor mediante a modificação destas relações, alternativas terapêuticas.

### 7.3.3.3 Hemopexina (HPX) em ARSA e AREB

Hemopexina (ou haemopexina; HPX), também conhecida como Beta-1B. -Glicoproteína é uma proteína que em humanos é codificada pelo Gen HPX (ALTRUDA *et al.* 1988). Hemopexina é a proteína humana conhecida com a maior afinidade para o grupo Hemo. Sua função principal é reciclar o ferro liberado e envolver de novo o grupo hemo para outras proteínas como a hemoglobina e também protege o corpo contra o dano oxidativo que o ferro livre pode ocasionar. Hemopexina libera seu ligante unido para a internalização quando interage com o receptor específico localizado na superfície das células do fígado preservando assim o ferro no corpo (JENEY *et al.*, 2002).

Os níveis desta proteína indicam a quantidade de grupo hemo no sangue. Por isso, os baixos níveis de hemopexina indicam a perda por degradação significativa de compostos que tem o grupo hemo. Os baixos níveis de hemopexina são uma das características do diagnóstico de uma anemia hemolítica intravascular (SHAPIRO *et al.*, 2006).

O lugar da ligação do grupo hemo na hemopexina consiste em duas subunidades feitas com 4 estruturas alfa hélice por cada. Os domínios de hemopexina são encontrados em diferentes espécies na árvore filogenética e na espécie humana por semelhança sequencial tem-se feito uma família conhecida como hemopexinas representadas em sua maior parte por metaloproteinases de matriz (MMPs), como a vitronectina. Domínios hemopexina nestas proteínas tem sido associado com processos de ativação, de inibição, dimerização e ligação para substratos ou ligantes e endocitose de lipoproteínas de baixa densidade. A hemopexina tem sido associada como indicador do contexto da matriz extracelular e tem sido relatada como uma proteína muito importante em processos de cicatrização. Interações entre os domínios das hemopexinas formam a base para interferência positiva ou negativa com a formação de complexos moleculares na Matriz extracelular e, portanto, pode ser explorada terapeuticamente no câncer (ANGOSTO; GÓMEZ, 2010). Neste estudo a proteína foi super expressa em dos tipos de síndromes mieloblasticos, possivelmente desempenhe função útil para o crescimento do tumor, pois tem a capacidade de transformar todo o contexto molecular da matriz celular (ANGOSTO; GÓMEZ, 2010).

A correlação mutua de super expressão com a presença de síndromes mieloblasticos mencionadas, fazem desta proteína um potencial biomarcador tumoral.

#### 7.3.3.4 *Proteínas da Coagulação em ARSA e AREB*

Os resultados obtidos confirmam também a importante relação entre câncer e fenômenos associados à coagulação do sangue. Estudos relatam que aproximadamente 50% dos pacientes com doença maligna e mais de 90% dos que evoluem para metástase, apresentavam evidências de alguma anormalidade na coagulação e/ou fibrinólise (O'CONNOR *et al.*, 1986; BICK, 1992; HILLEN, 2000; KWON *et al.*, 2008).

O câncer é um dos transtornos primários mais comuns relacionados ao tromboembolismo venoso (TEV) pediátrico, sendo responsável por um quinto das crianças com eventos trombóticos. Os pacientes pediátricos com leucemia aguda apresentam um maior risco de desenvolver hemorragia e eventos tromboembólicos (AKIN; AKAR, 2013). A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o tipo mais comum de

câncer diagnosticado em crianças e foi classificado como a doença maligna mais comum associado com o TEV na faixa etária pediátrica (NOWAK-GÖTTL *et al.*, 2009; AKIN; AKAR, 2013).

Nesse trabalho apresentaram super expressão na ARSA e AREB proteínas pró-coagulantes, Fibrinogenio, Vitronectina, PZP, Kininogen todas com papel essencial na hemostasia. Os níveis destas são mais altos nos proteômas das síndromes comparadas com o grupo controle sugerindo que podem ser utilizadas como biomarcadores, visto que todos os pacientes avaliados obtiveram remissão completa da doença. Possivelmente, esse acréscimo na expressão também possa ser utilizado como ferramenta de avaliação da predisposição a alterações na hemostasia após a terapia de indução. Rau e colaboradores detalharam em 2007 que a diminuição ou disfunção de alguns destes fatores podem desencadear estados de sangramento ou trombóticos.

#### 7.3.3.5 fibrinogênio (FGA) em ARSA e AREB

As células cancerígenas podem ativar diretamente o sistema de coagulação, gerando desse modo a trombina, ou indiretamente, mediante a estimulação de células mononucleares que, por sua vez, expressam uma variedade de proteínas pró-coagulantes (HILLEN, 2000). Citocinas liberadas a partir das células tumorais desencadeiam a atividade coagulante em monócitos, plaquetas e células endoteliais. A formação de fibrina pode ocorrer em muitos tipos de tecidos tumorais e a formação da matriz de fibrina parece favorecer a proteção das células tumorais dos ataques a partir de células do sistema imunológico (FRIDMAN *et al.*, 2008). Embora esta pesquisa reporte a super expressão de proteínas associadas à coagulação em pacientes com LLA-B, que é uma neoplasia maligna de células circulantes, torna-se possível pensar que o papel desempenhado pelo fibrinogênio em tumores não aderidos, não esteja relacionado à proteção do tumor, mas possivelmente esteja desempenhando funções como promotor do crescimento e propagação do câncer (WOJTUKIEWICZ *et al.*, 2004). Estudos demonstram que a trombina aumenta a expressão da integrem  $\alpha\beta 3$ . Esta é considerada um marcador de fenótipo angiogênico de células endoteliais em vasos tumorais e interage com proteínas da matriz extracelular. A ligação em  $\alpha\beta 3$  promove ligação celular,

migração, proliferação e impede apoptose. Células endoteliais cultivadas em placas revestidas com trombina tiveram um menor nível de apoptose, sugerindo uma sobrevivência da célula endotelial dependente de  $\alpha\beta 3$  induzida por trombina (YAPIJAKIS *et al.*, 2012).

Alguns estudos também relataram a associação entre anormalidades hemostáticas e câncer gástrico (RAHR *et al.*, 1994; DI MICCO *et al.*, 2001), associando esse câncer a eventos trombóticos (ABBASCIANO *et al.*, 1995; IKEDA *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004; YAMASHITA *et al.*, 2007). Outros resultados demonstram que os níveis de fibrinogênio no sangue se correlacionam com o grau de agressividade do tumor em câncer gástrico (LEE *et al.*, 2004; KWON *et al.*, 2008). Kwon e colaboradores relataram em 2008 que uma determinação de marcadores de coagulação, em particular, complexo trombina–antitrombina (TAT), monômero de fibrina e D-dímero são suficientes para fornecer o prognóstico e a sobrevida de pacientes com câncer.

#### 7.3.3.6 Vitronectina (VTN) em ARSA e AREB

O micro entorno do tumor, incluindo a matriz extracelular (ECM), é um fator importante que contribui tanto para a manutenção da homeostase do tecido e a promoção de tumor gênese (ABSLOM, 1986). Os principais componentes da ECM incluem colágeno, laminina, fibronectina e vitronectina (VN), e a sinalização pelo ECM produz-se em grande parte através da família das integrinas (RIJNBOUTT *et al.*, 1996). As Integrinas são proteínas que conduzem a um grande conjunto de moléculas de sinalização que participam em diversos processos celulares, tais como adesão, migração, polaridade, sobrevivência celular, apoptose e proliferação (RIJNBOUTT *et al.*, 1996).

As integrinas tem um papel importante no destino das células, as células embrionárias se diferenciam quando cultivadas em contato com fibronectina ou laminina (MOGHIMI; PATEL, 1989). VN pode induzir diferenciação da endoderme da massa celular interna no desenvolvimento de ratos (TOMLINSON; BURGER, 1987) o contato com VN é suficiente para induzir a diferenciação osteogênica das células mães mesenquimais (SALAZAR; HERRERA, 2013). Identificaram-se VN como componente de plasma humano determinante para regulação da diferenciação do

câncer de próstata e de mama (SALAZAR; HERRERA, 2013). VN media seus efeitos predominantemente através de integrina  $\alpha V\beta 3$  e da como resultado a alteração da localização  $\beta$ -catenina. Tem-se associado câncer pulmonar primário com a sobre expressão desta proteína em tecido (PELÁEZ; TORRES, 2013). É possível que a super expressão desta proteína em ARSA e AREB contribuía para processos de diferenciação tumoral e progressão das doenças. Tem-se associado câncer pulmonar primário com a sobre expressão de esta proteína em tecidos.

#### 7.3.3.7 PZP (*Pregnancy zone protein*) em ARSA e AREB

É capaz de inibir todas as quatro classes de proteases por um mecanismo único de associação. Esta proteína tem um peptídeo de estiramento, chamado "região isco", que contém os sítios de clivagem específicos para diferentes proteases (DREVENY *et al.*, 2014). Quando uma proteinase cliva a região específica dela, uma mudança conformacional induzida na PZP retém a proteinase. A enzima encapsulada permanece ativa contra substratos de baixo peso molecular (atividade contra substratos de elevado peso molecular é muito reduzida). A seguir à na região ISCO acontece uma ligação tioéster conseguindo posteriormente uma ligação com a proteinase covalente (DREVENY *et al.*, 2014), A PZP aumenta na gravidez possivelmente para evitar ação endopeptidasa. Uma série de estudos indica que pode participar na imunomodulação. (Assim, PZP parece suprimir a resposta imune *in vitro* (IJSELSTIJN *et al.*, 2011) e subconjuntos de células imunocompetentes como monócitos que possuem receptores para PZP (BARRERA *et al.*, 2007)). À luz de reportes feitos por vários pesquisadores a PZP foi alvo para estabelecer uma correlação positiva entre seus níveis séricos e o estágio do tumor de seio e pulmão. Além disso, o tecido do tumor de mama parece sintetizar PZP e dosagens seriadas de PZP plasma têm sido sugeridas para o acompanhamento da dissipação tumor micrometastática no cancro da mama (MAXWELL *et al.*, 1979). No entanto, outros têm sido incapazes de reproduzir esses resultados e afirmaram que o PZP é inútil como um marcador tumoral (MILLER *et al.*, 1982). Além disso, recentes relatórios sobre a preparação e a reatividade imunológica de PZP permitem presumir que muitos estudos anteriores podem ter sido influenciados por anticorpos não específicos e / ou padrões de proteínas contaminadas (SAND *et al.*, 1985). Na

atualidade já se tem estudos de quantificação de proteína muito mais sensíveis. Na página The Human protein Atlas (2016) são descritos as expressões de proteínas em diferentes tipos de câncer e já se tem uma correlação entre expressão diferencial de proteínas e câncer. Embora o significado Biológico destas super expressões ainda não esteja muito esclarecido. Os resultados aqui obtidos mostram uma correlação das síndromes com a super expressão desta proteína pelo que pode ser útil como possível marcador tumoral para este tipo de estudos feitos com plasma medular.

#### 7.3.3.8 *Cininogênio (KNG1) em ARSA e AREB*

Usando MALDI-MS, Seraglia *et al.* (2007) relataram o cininogênio-1 como um potencial novo marcador no plasma para câncer Coloretal. Cininogênio-1 é uma proteína multifuncional que desempenha um importante papel fisiopatológico em muitos processos (COLMAN, 1999) e tem sido descrito como possível biomarcador para, fibronolises, guloseimas, incluindo a trombose, Oncogênese (YOUSEF; DIAMANDIS, 2001). Umemura e seu grupo (2011) relatam esta proteína como um possível marcador tumoral para câncer gástrico (WANG *et al.*, 2013). Neste trabalho se reporta como uma proteína com marcada super expressão para as síndromes mieloblasticos estudadas e assim mesmo se propôs como uma proteína que pode fazer parte de um painel de proteínas para estudar estas síndromes.

#### 7.3.3.9 *Proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas em ARSA e AREB*

Nesta pesquisa foram identificadas com super expressão a proteína associadas ao sistema do complemento (C4b) super expressa para ARSA 1,82 e para AREB 2,14 em relação com o controle.

Os mecanismos de ativação do sistema complemento são bem conhecidos e têm sido descritos em vários estudos (BERGER *et al.*, 2005; VERHAVE *et al.*, 2014). O sistema de complemento é um componente importante do sistema imune inato e adaptativo, sendo composto por mais de 40 proteínas do plasma e de membrana. Os papéis mais importantes do sistema complemento são o

reconhecimento de agentes patogênicos, a ativação da quimiotaxia de leucócitos e a indução de lise celular por formação do complexo de ataque à membrana (MAC).

Devido ao grande número de alterações genéticas e epigenéticas associadas à carcinogênese, a transformação neoplásica pode aumentar a capacidade da célula maligna em ativar o complemento (RODRIGUEZ *et al.*, 1999), fato que pode explicar a super expressão dessas proteínas, concordando assim com outros trabalhos que relatam o aumento da expressão de proteínas do complemento em células pulmonares (NISHIOKA *et al.*, 1976; NIEHANS *et al.*, 1996). Embora, as células malignas com frequência desenvolvam mecanismos de proteção e resistência ao complemento (VARSANO *et al.*, 1996; VARSANO *et al.*, 1998; PIO 2006), pesquisas recentes sobre os mecanismos de regulação da atividade do complemento, demonstram que o papel de proteínas super expressas é de atividade inibitória.

Estudos feitos por Sperati e Moliterno (2015) relataram que a ativação não controlada do sistema de complemento pode resultar em uma disfunção das células endoteliais e em uma cascata de eventos que podem desencadear a ocorrência de microangiopatias trombóticas. Acrescentam que mecanismos não tradicionais de ativação do complemento são cada vez mais reconhecidos, destacando a clivagem de frações do complemento mediadas por trombina e correlacionam essa ativação ao desenvolvimento de microangiopatias trombóticas. Neste trabalho se confirma pela técnica de espectrometria de massas a super expressão de PZP em plasma medular de ARSA e AREB, confirmando assim que é viável considerá-la como um candidato á marcador tumoral.

Tradicionalmente, acreditava-se que a única fonte de imunoglobulinas (Igs) eram os linfócitos B maduros. Embora, alguns pesquisadores relataram que Ig também poderia ser detectado nas células de carcinoma (que são derivados de epitélio). Recentemente, trabalhos demonstraram que as linhas celulares de câncer humano expressaram mRNA da região variável de IgG (QIU *et al.*, 2003; BABBAGE *et al.*, 2006). Liu e colaboradores detectaram expressão de Ig num câncer nasofaringe (LIU *et al.*, 2007). No entanto, até essa data, nenhum estudo identificou Ig como um produto em células não linfóides.

O sistema imunitário humano reconhece uma imensa variedade de diferentes agentes patogênicos e responde de forma dinâmica contra micro-

organismos. Linfócitos imaturos B geram diversidade no repertório de anticorpos, reorganizando, a cadeia variável das Ig. Existem algumas proteínas importantes para a recombinação genética que gera variabilidade nas Igs como as proteínas RAG o que permite pensar que podem estar presentes em câncer que possam gerar hipoteticamente Ig. Qiu e colaboradores (2003). Encontraram expressão gênica de RAG1 e RAG2 em três linhas de células de câncer epitelial. Neste sentido e com estudos posteriores achou-se que outros tipos de Ig podiam, também, ser produzidas por células do câncer (ZHENGSHAN; GU, 2007). Qiu *et al.* relataram que foi expressa IgM em algumas linhas celulares tumorais, embora a um nível muito mais baixo do que a IgG (QIU *et al.*, 2003). Babbage e colaboradores (2006) encontraram expressão da cadeia passada de IgM e IgA em linhas celulares de câncer da mama. Pesquisadores, também, já detectaram IgG em tecidos cirróticos e células renais embrionárias (ZHENGSHAN; GU, 2007). Também houve expressão fraca e focal de cadeias pesadas e leves de IgG em lesões benignas da mama. Alegadamente, a expressão de Ig não se limita a células epiteliais de câncer, também podem ser detectados em células não neoplásicas em proliferação (QIU *et al.*, 2003), assim explicando a presença de anticorpos IgG na cirrose, células embrionárias e possivelmente fibroadenoma da mama. Enquanto o a produção de IgG por células cancerígenas derivadas de epitélio e outras células em proliferação já foi estabelecida (ZHENGSHAN; GU, 2007), a sua Função e significado clínico no desenvolvimento do câncer e o crescimento continua a ser explorado. Neste trabalho se reporta a super expressão de IGLL1, existe a possibilidade que tenha sido sintetizada pelas células cancerosas, mas para conferir estes resultados precisa-se de estudos mais profundos no tecido. Embora, estes resultados coloquem esta proteína como uma candidata muito interessante como biomarcador, pela importância e já demonstrada atividade das células cancerosas para produzir imunoglobulinas e muito recomendável não depleção nos estudos de descrição proteica associados a estudos do câncer. Por isto não foi realizado mais depleções para estudar a fração retida nas cromatografias de afinidade com lectinas. Para avaliar se o comportamento de super expressão das proteínas discutidas eram um fenômeno isolado ou pelo contrário um fenômeno correlacionado se procedeu ao fazer o interatoma.

## **7.4 Análise proteômica na procura de possíveis marcadores tumorais para síndromes mieloblásticas (ARSA e AREB) com amostras não depletadas, mas sim fracionadas por cromatografia de afinidade com lectina.**

### **7.4.1 Cromatografia de afinidade em colunas de lectinas imobilizada em sepharose 4B**

Com amostras não depletadas foi feita cromatografia de afinidade em coluna contendo as lectinas vegetais Frutalina e PNA individualmente imobilizadas em Sepharose 4B acopladas ao sistema FPLC ÄKTApurifier 10. O Pico I representa a fração não retida (FNR) e o Pico II é a fração retida (FR). As frações foram obtidas após a eluição com seus respectivos tampões: Tris-HCl 20mM pH 7,4 em NaCl 0,15M (TAMPÃO A) e Galactose 0,2 M e Tris-HCl 20mM pH 7,4 em NaCl 0,15 M (TAMPÃO B).

Os processos cromatográficos com lectina procuravam diminuir a faixa dinâmica, ampliar a capacidade de detecção de proteínas menos abundantes nos plasmas de pacientes com ARSA e AREB e utilizar as lectinas como ferramentas para procurar estruturas antigênicas nas proteínas retidas. Acharam-se proteínas retidas nas frações avaliadas com frutalina, não se reportaram proteínas retidas em coluna de PNA.

PNA é uma lectina amplamente descrita como ferramenta para a procura de antígenos Tf. Nos cromatogramas conseguidos com a coluna de PNA Sepharose 4B posterior aplicação das amostras de ARSA, AREB e controle observou-se ausência de fração retida em todas elas, assim a sua utilização não permitiu o fracionamento das amostras avaliadas, poderia se dizer que estas proteínas de plasma medular não apresentaram aparentemente na sua superfície o antígeno Tf [Gal( $\alpha$ 1-3)GalNAc( $\alpha$ 1-O-)Ser/Thr] (SINGH *et al.*, 2001). O antígeno já foi reportado para proteínas de membrana, mas não para proteínas secretadas, pode ser que este resultado tenha um significado biológico associado com as glicosil transferase que participam da glicosilação do antígeno em células do tumor, estudos posteriores nesse sentido também se fazem pertinentes.

#### 7.4.2 PICO II. Proteínas de ARSA e AREB comumente retidas em cromatografia de afinidade com Frutalina.

No total 48.448 peptídeos foram identificados, sendo 43.780 peptídeos com um erro de massa menor que 10 ppm (Figura 15). Quanto à qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos, 18 % dos peptídeos foram fragmentados na fonte, enquanto 11% correspondem à clivagem perdida (Figura 16).

Figura 15 - Distribuição do erro massas de massa exata medida em ppm – PICO II-Frutalina

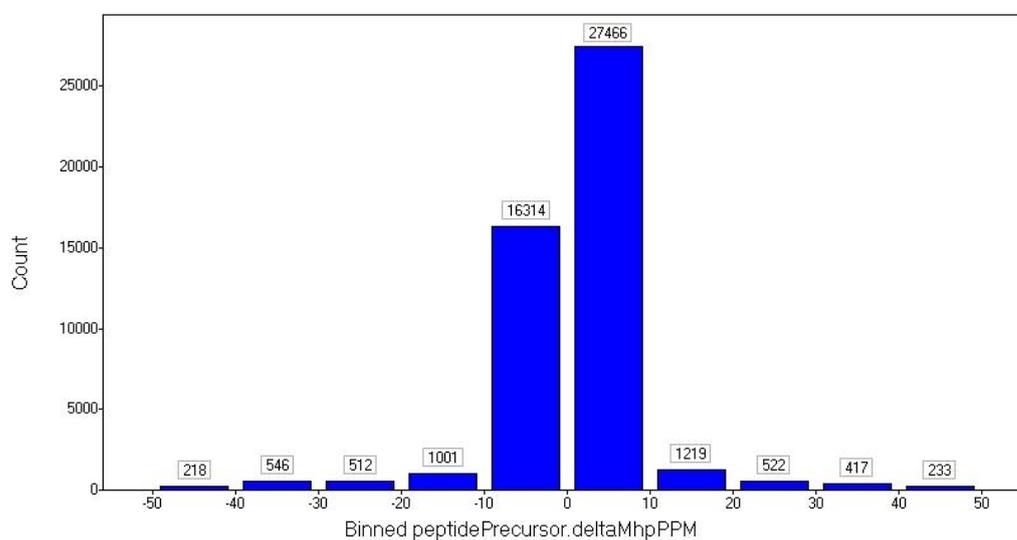
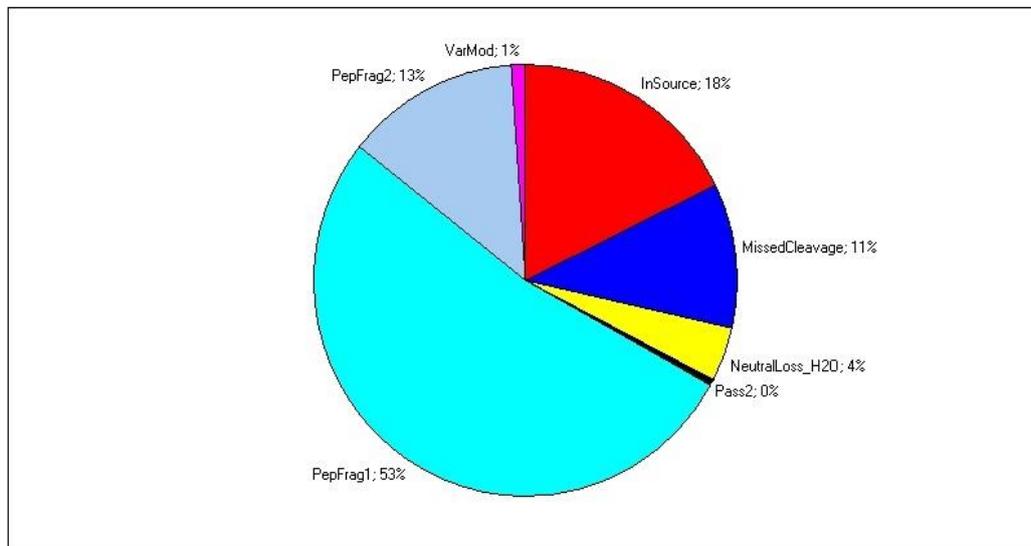


Figura 16- Representação gráfica da avaliação da qualidade de fragmentação e digestão dos peptídeos - PICO II- Frutalina



Posteriormente, uma lista de proteínas foi criada pelo programa Expression<sup>E</sup> e demonstrou as que são apresentadas em três das 3 injeções aplicadas de cada amostra (filtro 3x3). As proteínas que apresentaram aumento significativo na retenção em um grupo ao ser comparado ao outro, foram descritas como super-retidas, razão  $\geq 1,5$ . Proteínas com uma diminuição significativa na retenção da coluna foram descritas como sub-retidas, razão  $\leq 0,5$  e todas as outras proteínas com alterações não de retenção ( $0,5 > \text{razão} < 1,5$ ) foram descritas como sem alteração significativa de retenção.

Um total de 15 proteínas foram identificadas quando se compararam as frações retidas em cromatografia de afinidade com frutalina quando foram aplicadas frações de ARSA e de controle. Um total de 10 proteínas foram identificadas quando foram comparadas as frações retidas em cromatografia de afinidade com frutalina de AREB com controle. A comparação da quantidade de proteína retida foi possível através da ferramenta Expression<sup>E</sup> pertencente ao programa Protein Lynx Global Server.

Pela importância que demonstraram ter as Igs nos processos até agora discutidos se procedeu a trabalhar com amostras não depletadas e sim fracionadas por cromatografia de afinidade em colunas com as lectinas acopladas. Pelos resultados iniciais as lectinas selecionadas para esta análise foram PNA e Frutalina. Não se apresentou fração retida nas cromatografias feitas com PNA dessa forma

não se reporta resultado para tratamento cromatográfico com esta lectina. Mas para as cromatografias feitas com frutalina se acharam resultados interessantes (Tabelas 9 e 10) que se discutem a continuação.

Tabela 9 - Razão de Fração retida - ARSA Vrs Controle.

Accession	Description	Ratio	TAG
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region OS Homo sapiens GN IGHM PE 1 SV 3	4	UP
Q6N089_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686P15220 OS Homo sapiens GN DKFZp686P15220 PE 1 SV 1	1,82	UP
Q6GMX6_HUMAN	IGH protein OS Homo sapiens GN IGH PE 1 SV 1	1,42	UNCHANGED
Q9NPP6_HUMAN	Immunoglobulin heavy chain variant Fragment OS Homo sapiens PE 2 SV 1	1,3	UNCHANGED
A2NJV5_HUMAN	Kappa light chain variable region Fragment OS Homo sapiens GN IGKV A18 PE 4 SV 1	1,26	UNCHANGED
FETUA_HUMAN	Alpha 2 HS glycoprotein OS Homo sapiens GN AHSG PE 1 SV 1	0,79	UNCHANGED
Q6MZQ6_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686G11190 OS Homo sapiens GN DKFZp686G11190 PE 1 SV 1	0,77	UNCHANGED
VTNC_HUMAN	Vitronectin OS Homo sapiens GN VTN PE 1 SV 1	0,72	UNCHANGED
HEMO_HUMAN	Hemopexin OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	0,69	UNCHANGED
Q9UL90_HUMAN	Myosin reactive immunoglobulin heavy chain variable region Fragment OS Homo sapiens PE 2 SV 1	0,59	DOWN
A1AT_HUMAN	Alpha 1 antitrypsin OS Homo sapiens GN SERPINA1 PE 1 SV 3	0,59	DOWN
B2R582_HUMAN	cDNA FLJ92374 highly similar to Homo sapiens C type lectin domain family 3 member B CLEC3B mRNA	0,58	DOWN
CLUS_HUMAN	Clusterin OS Homo sapiens GN CLU PE 1 SV 1	0,47	DOWN
Q6N094_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686O01196 OS Homo sapiens GN DKFZp686O01196 PE 1 SV 1	0,4	DOWN
Q96K68_HUMAN	cDNA FLJ14473 fis clone MAMMA1001080 highly similar to Homo sapiens SNC73 protein SNC73 mRNA OS	0,1	DOWN
Reversed	Sequence 56287	0,07	DOWN

Tabela 10 – Razao de Fracao retida - AREB Vrs Control

Accession	Description	Ratio	TAG
Reversed	Sequence 56287	2,43	UP
Q8NEJ1_HUMAN	Uncharacterized protein OS Homo sapiens PE 2 SV 1	1,96	UP
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region OS Homo sapiens GN IGHM PE 1 SV 3	1,72	UP
Q7Z379_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686K04218 Fragment OS Homo sapiens GN DKFZp686K04218 PE 1 SV	1,35	UNCHANGED
Q9NPP6_HUMAN	Immunoglobulin heavy chain variant Fragment OS Homo sapiens PE 2 SV 1	1,31	UNCHANGED
A8K3E4_HUMAN	cDNA FLJ78367 highly similar to Homo sapiens fibrinogen A alpha polypeptide FGA transcript varia	1,18	UNCHANGED
HEMO_HUMAN	Hemopexin OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	0,82	UNCHANGED
FETUA_HUMAN	Alpha 2 HS glycoprotein OS Homo sapiens GN AHSG PE 1 SV 1	0,78	UNCHANGED
Q96K68_HUMAN	cDNA FLJ14473 fis clone MAMMA1001080 highly similar to Homo sapiens SNC73 protein SNC73 mRNA OS	0,76	UNCHANGED
A1AT_HUMAN	Alpha 1 antitrypsin OS Homo sapiens GN SERPINA1 PE 1 SV 3	0,57	DOWN
Q6MZQ6_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686G11190 OS Homo sapiens GN DKFZp686G11190 PE 1 SV 1	0,5	DOWN

Depois de comparar as Tabelas 9 e 10, puderam-se observar proteínas comuns diferencialmente retidas na coluna comparada com o grupo controle (Tabela 11) o que significa um reconhecimento diferencial destas proteínas por parte das lectinas, não significa que estejam sub ou super expressas quando comparamos com os resultados anteriores. Por exemplo,

Tabela 11- Proteínas comumente retidas na coluna de sepharose 4B-Frutalina.

Accession	Description	Razao de Retencao ARSA	Razao de Retencao AREB	TAG	Expresao em amostras depletadas e nao fraccionadas.(Tabelas 6 e 7)	
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region OS Homo sapiens GN IGHM PE 1 SV 3	4	1,72	UP	ARSA Down	AREB UP
A1AT_HUMAN	Alpha 1 antitrypsin OS Homo sapiens GN SERPINA1 PE 1 SV 3	0,59	0,57	DOWN	UNCHANGED	

HEMO_HUMAN	Hemopexin OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	0,69	0,82	UNCHANGED	UP
------------	---	------	------	-----------	----

Ig mu se super expressa em AREB (Tabela 7) e sub expressa em ARSA (Tabela 6), na cromatografia de afinidade teve maior retenção nos dois casos comparados com o controle, o que significa que independentemente da quantidade de proteína presente no sistema a possível mudança conformacional de sua estrutura nas síndromes aumenta a afinidade para a frutalina. Os Anticorpos IgM desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa primário. Estudos demonstram que estão envolvidos no reconhecimento precoce de invasores externos, tais como bactérias e vírus, resíduos celulares e auto modificado, bem como em reconhecimento e eliminação de lesões pré-cancerosas e cancerosas. A forma ligada à membrana é encontrada na maioria das células B normais juntamente com IgD. Membrane-bound IgM induz a fosforilação de CD79a e CD79b pela família Src das proteínas tirosina quinases. Isto pode causar a morte das células por apoptose. Encontra-se também na forma solúvel, o que representa cerca de 30% das imunoglobulinas no plasma totais onde se encontra quase exclusivamente como um homopolímero. Depois que o antígeno se liga ao receptor de células B, a forma segregada é secretada em grandes quantidades. Tem se reportado como as Igms que reconhecem maior diversidade de antígenos tumorais (TISCH *et al.*, 1988).

Com os resultados obtidos com Ig mu, pode-se ver que o seu perfil de retenção na coluna de afinidade acoplada com frutalina foi também maior do que o grupo controle para ARSA e AREB, o que significa que o peptido pode sofrer alterações na superfície glicosilada tornando-se proteínas mais retíveis que as proteínas normais possivelmente pela aparição de resíduos alfa-galactosídicos esposoto. As diferenças entre a retenção entre os dois grupos podem ser correlacionadas com a quantidade de proteína presente na amostra porque na amostra de AREB em que a proteína é super expressa, existe uma maior retenção na coluna comparando a obtida com ARSA onde a proteína era subexpressa. Nesse sentido, a diferença de retenção não pode ser atribuída a diferenças no perfil de glicosilação entre elas. Mas sim podemos dizer que existe uma diferença de o perfil

de glicosilação entre elas e o grupo de controle porque as duas amostras resultaram com uma fração retida maior em cromatografia de afinidade que o grupo controle, possivelmente também pela sua maior frequência por estimulação do sistema imune pela presença da síndrome.

Tendo em conta a discussão feita no numeral 7.3.3.9 sob Proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas em ARSA e AREB, poderia sugerir que a sobre expressão de IgM apresentada aqui para AREB, pode ser devido a uma estimulação por atividade antigénica de superfície de células alteradas ou síntese endêmica no tecido canceroso, fazendo desta proteína uma interessante candidata para o biomarcador. A expressão diferencial entre ARSA e AREB, é também um aspecto importante porque gera várias questões sobre o possível significado biológico da expressão diferencial da proteína e a possível imunossupressão da imunoglobulina associada com o aparecimento de ARSA.

Num outro caso, na quantificação para Alpha 1 antitrypsin (SERPINA1) nas amostras analisadas se encontrou um expressão similar comparada com o grupo controle (Tabelas 6 e 7) e que depois da cromatografia de afinidade em lectina os picos 2 das amostras das síndromes apareçam com menor retenção que o controle (0,59 para ARSA e 0,57 para AREB), isto significa que embora a proteína seja expressa na mesma proporção que o controle, pode sofrer alterações glicosídicas, o que faz que o estudo com lectinas nestes casos seja muito pertinente, graças a que permite evidenciar alterações não visíveis pela quantificação de proteína na espectrometria de massas quando não se fraciona com lectina. A SERPINA1 é uma glicoproteína do plasma que é sintetizada principalmente nas células de fígado humano e macrófagos. Ela pertence à família serpinas que desempenha um papel central no controle da degradação de tecidos através do seu efeito inibitório sobre a elastase de neutrófilos e de outras proteases de serina, incluindo a tripsina, quimotripsina, catepsina G, plasmina, trombina, calicreína tecidual e fator X ativado (FXa) (GETTINS, 2002; RAU *et al.*, 2007). Foi demonstrado que muitos tipos de células tumorais são capazes de expressar e secretar alfa-1 antitripsina (YAMAGUCHI *et al.*, 1990; HIGASHIYAMA *et al.*, 1992; POBLETE *et al.* 1996). Em doentes pediátricos com AVC isquêmico, níveis de SERPINA1 estavam aumentados significativamente, independentes de outros fatores pró-trombóticos. Alguns autores sugerem que esta patologia ocorre devido à inibição da proteína C

ativada (PCA), proteína que controla a atividade da trombina (BURGHAUS *et al.*, 2006).

Além disso, tem sido demonstrado níveis elevados dessa proteína no plasma em certo número de doenças inflamatórias e em diferentes tipos de doenças malignas como o carcinoma hepatocelular, mieloma múltiplo, carcinoma pancreático, carcinoma da próstata, carcinoma primário do pulmão, carcinoma do colo do útero, câncer gástrico, câncer de laringe, carcinoma de nasofaringe, câncer de mama e carcinoma colorretal (EL-AKAWI *et al.*, 2010). Níveis elevados foram encontrados e correlacionados com o estadiamento do câncer, como demonstrado em alguns trabalhos (EL-AKAWI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011). Um estudo anterior, com câncer de pulmão e de próstata, demonstrou uma correlação direta e significativa entre os níveis elevados no plasma de alfa-1 antitripsina e o estágio do câncer. Sugeriram também que a principal fonte do aumento dos níveis sanguíneos dessa proteína em pacientes com câncer é o próprio crescimento das células cancerígenas (EL-AKAWI *et al.*, 2010). Em uma pesquisa recente, também com câncer de pulmão e próstata, os resultados obtidos indicaram que o decréscimo dos níveis dessa proteína no plasma algumas semanas após o tratamento, sugerindo que ela pode ser um indicador importante de constatação da eficácia do tratamento do câncer (EL-AKAWI *et al.*, 2013). Estudos anteriores reportaram a sobre expressão desta proteína utilizando os resultados de cromatografia de afinidade, o que confirma os resultados obtidos neste trabalho para cromatografia, porém, a taxa de retenção da proteína na coluna com frutalina não pode ser considerada como um fator que determine sobre expressão, pois a análise realizadas nas amostras não depletadas e sem cromatografia pela lectina, mostra uma expressão equivalente nas células transformadas e em células do tumor, desta forma a diminuição da retenção e por uma alteração de seu perfil glicosídico exposto, estas alterações seguramente diminuiriam a afinidade da lectina para as estruturas glicosídicas da proteína alterada de grupos de pessoas que possuíam a síndrome.

Avaliando os resultados cromatográficos da Hemopexina se se observou que esta proteína apresentou super expressão nos dois grupos (Tabela 6 e Tabela 7) relatados previamente (7.3.3.3), embora se reporte como super expressa o perfil de retenção na coluna de afinidade é semelhante com o grupo controle, o que pode sugerir que a superfície da proteína não se alterou consideravelmente embora seja

super expressa, também pode acontecer que a super expressão da proteína compense a alteração da superfície glicosídica resultando em perfis de retenção semelhante. De qualquer forma, os resultados indicam que, de nenhuma forma pode-se considerar a correlação direta entre super Expressão e retenção em coluna de afinidade de maneira direta. Sem dúvida, deve ser feito estudos paralelos de expressão da proteína para maximizar o uso de lectinas em estudos de proteômica.

### **7.4.3 Proteínas de ARSA e AREB diferencialmente retidas em cromatografia de afinidade com Frutalina.**

Para facilitar a exposição dos resultados e suas análises resumimos os resultados até aqui conseguidos mediante cromatografia de afinidade, colocando todas as proteínas retidas na coluna de frutalina e associando-as com os resultados não cromatográficos. Posteriormente se fará a discussão sobre cada uma delas.

Tabela 12- Proteínas totais retidas na coluna de frutalina.

Accession	Nome Proteína /Síndrome	TAG ARSA	TAG AREB	TAG Frut ARSA	TAG Frut AREB
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region OS Homo sapiens GN IGHM PE 1 SV 3	DOWN	UP	UP	UP
Q9NPP6_HUMAN	Immunoglobulin heavy chain variant Fragment OS Homo sapiens PE 2 SV 1	--	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
Q6GMX6_HUMAN	IGH protein OS Homo sapiens GN IGH PE 1 SV 1	--	--	UNCHANGED	--
A2NJV5_HUMAN	Kappa light chain variable region Fragment OS Homo sapiens GN IGKV A18 PE 4 SV 1	--	--	UNCHANGED	--
FETUA_HUMAN	Alpha 2 HS glycoprotein OS Homo sapiens GN AHSG PE 1 SV 1	--	--	UNCHANGED	UNCHANGED
VTNC_HUMAN	Vitronectin OS Homo sapiens GN VTN PE 1 SV 1	UP	UP	UNCHANGED	--
HEMO_HUMAN	Hemopexin OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	UP	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
Q9UL90_HUMAN	Myosin reactive immunoglobulin heavy chain variable region Fragment OS Homo sapiens PE 2 SV 1	--	--	DOWN	--
A1AT_HUMAN	Alpha 1 antitrypsin OS Homo sapiens GN SERPINA1 PE 1 SV 3	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN	DOWN
B2R582_HUMAN	cDNA FLJ92374 highly similar to Homo sapiens C type lectin domain family 3 member B	--	--	DOWN	--
CLUS_HUMAN	Clusterin OS Homo sapiens GN CLU PE 1 SV 1	UP	UNCHANGED	DOWN	--
Q96K68_HUMAN	cDNA FLJ14473 fis clone MAMMA1001080 highly similar to Homo sapiens SNC73 protein SNC73 mRNA OS	--	--	DOWN	UNCHANGED
A8K3E4_HUMAN	cDNA FLJ78367 highly similar to Homo sapiens fibrinogen A alpha polypeptide FGA transcriptvaria	UP	UP	--	UNCHANGED

#### *7.4.3.1 Clusterina retida com Frutalina, mas só em ARSA*

Os resultados cromatográficos conseguidos com clusterina também são interessantes. Apresenta super expressão em amostras depletadas de ARSA (Tabela 6), expressão equivalente em AREB (Tabela 7), retenção em frutalina em amostras de ARSA (Tabela 9) e não se reporta retida com Frutalina em AREB (Tabela 10) comparado com o grupo controle (Tabela 12). Esta proteína já foi discutida previamente (7.3.3.1), mas como resultado cromatográfico pode se sugerir que as alterações glicosídicas nesta proteína não são evidentes pela retenção na coluna, são evidentes principalmente pela ausência dela no pico dois para AREB (Tabela 10), devido a ser reportada como proteína única no grupo controle quando é comparada com a retenção em AREB (Anexo 1). O que faz dela uma proteína muito interessante como possível biomarcador devido a que por análises proteômicas consegue ser útil para diferenciar ARSA de AREB utilizando frutalina.

#### *7.4.3.2 Vitronectina, mas só em ARSA*

Os resultados cromatográficos conseguidos com Vitronectina também são interessantes. Apresenta super expressão em amostras depletadas de ARSA (Tabela 6) e em AREB (Tabela 7), retenção equivalente em ARSA (Tabela 9) comparado com o grupo controle em cromatografia com frutalina, em amostras de AREB (Tabela 10) não se reporta fração retida. Esta proteína já foi discutida previamente (7.3.3.6). As alterações glicosídicas nestas proteínas são evidentes principalmente pela ausência dela no pico dois em AREB (Tabela 10), devido a ser reportada como proteína única no grupo controle quando é comparada com AREB (Anexo 1). O que faz dela uma proteína muito interessante como possível biomarcador devido a que por análises proteômicas também consegue ser útil para diferenciar ARSA de AREB utilizando frutalina.

#### *7.4.3.3 fibrinogênio, mas só em AREB*

Os resultados cromatográficos conseguidos com Fibrigenio também são interessantes. Apresenta super expressão em amostras depletadas de ARSA (Tabela 6) e em AREB (Tabela 7), retenção equivalente em AREB (Tabela 10) comparado com o grupo controle em cromatografia com frutalina, em amostras de ARSA não se

reporta fração retida (Tabela 9). Esta proteína já foi discutida previamente (7.3.3.5). As alterações glicosídicas nesta proteína são evidentes principalmente pela ausência dela na fração retida da cromatografia de afinidade quando se aplica pool de ARSA (Tabela 9) e porque aparece retida no grupo controle (Anexo 2) e em cromatografia feita com AREB (Tabela 12). O que faz de ela uma proteína muito interessante como possível biomarcador devido a que por análises proteômicas consegue ser útil para diferenciar ARSA de AREB utilizando frutalina.

#### **7.4.4 outras proteínas retidas com Frutalina**

Imunoglobulina variante da cadeia pesada Fragmento OS Homo sapiens PE 2 SV 1, proteína IGH OS Homo sapiens GN IGH PE 1 SV 1, cadeia leve da região variável Kappa Fragmento OS Homo sapiens GN IGKV A18 PE 4 SV 1, Alpha 2 HS glicoproteína OS Homo sapiens GN AHSG PE 1 SV 1, região variável da cadeia pesada da imunoglobulina reactiva miosina Fragmento OS Homo sapiens PE 2 SV 1, cDNA FLJ92374 muito semelhante ao Homo sapiens tipo C família de domínio lectina 3 membro B e cDNA FLJ14473 fis MAMMA1001080 clone muito semelhante à proteína Homo sapiens SNC73 SNC73 mRNA OS.

Poderiam ser uteis como marcadores quando são só retidas pela frutalina quando é aplicada amostra de AREB. Delas só Imunoglobulina variante da cadeia pesada Fragmento OS Homo sapiens PE 2 SV 1, Alpha 2 HS glicoproteína OS Homo sapiens GN AHSG PE 1 SV 1, cDNA FLJ14473 fis MAMMA1001080 clone muito semelhante à proteína Homo sapiens SNC73 SNC73 mRNA OS são também reconhecidas pela frutalina quando se aplica amostra de ARSA. Embora os resultados possam ter um significado para considerá-los como marcadores tumorais, não são confiáveis pois não se apresentam reportados nos resultados iniciais (Tabelas 7 e 8) assim não são propostos como possíveis marcadores. A influência da imunodepleção pode explicar estes resultados, pois a maioria de peptídeos aqui colocados corresponde a frações de imunoglobulinas e as proteínas que não são, podem ter a possibilidade de se associar a elas e no momento da retenção das imunoglobulinas também ficar presas. É conveniente realizar estudos mais profundos com estas proteínas sem depletar as amostras para a análise do plasma medular das síndromes aqui discutidas.

## RESUMO DE RESULTADOS

- É possível realizar estudos de reconhecimento anomérico por parte de lectinas galactose ligantes utilizando cromatografia de afinidade com hemiceluloses reticuladas.
- Assim então se pode sugerir que a super expressão de C4b, Vitronectin, fibrinogen, PZP, Kininogen, Hemopexin e IGLL1 podem ser indicadoras de síndromes mieloplasticos, para particularizar a síndrome pode-se utilizar a super expressão única de algumas proteínas. Destacase Clusterina e Alpha 2 macroglobulin super expresas em arsa más não super expresas em AREB.
- Proteínas comumente sobre expresas em ARSA e AREB não são fatos isolados, são fatos correlacionados que podem fornecer informações úteis do comportamento da doença para assim, não só procurar possíveis biomarcadores, também esta informação pode ser útil para estudar os mecanismos da doença.
- Pela capacidade reportada das células do câncer para expressar imunoglobulinas, é recomendável que nos estudos associados não se faça depleção. Ou se façam com grupo controle.
- Para conhecer melhor a enfermidade e utilizando estes resultados se podem propor trabalhos posteriores para conferir as hipóteses, por exemplo, ao estudo de expressão de proteínas nas síndromes com técnicas de biologia molecular.
- As técnicas cromatográficas de afinidade podem ser úteis para realizar estudos de reconhecimento anomérico diferencial de lectinas galactose ligantes.
- Estudos baseados em reconhecimento de lectinas para proteínas com alvos quantitativos, devem estar necessariamente acompanhados de estudos de expressão.

## **CONCLUSÃO**

A frutalina pode ser útil como ferramenta para diferenciar em estudos proteômicos as síndromes de ARSA e AREB.

## REFERÊNCIAS

- ABBASCIANO V, TASSINARI D, SARTORI S, TREVISANI L, ARCUDI D, BIANCHI MP, LIBONI A. Usefulness of coagulation markers in staging of gastric cancer. **Cancer Detect Prev.** 19:331-6, 1995.
- ABBOT, K. Identification of candidate biomarkers with cancer-specific glycosylation in the tissue and serum of endometrioid ovarian cancer patients by glycoproteomic analysis. **Proteomics.** 10 : 470-81, 2010.
- ABSOLOM, D. R. Opsonins and dysopsonins: an overview. **Methods in enzymology.** 132:281-318, 1985.
- AKIN, D.F.; AKAR, N. Effect of Factor V Leiden on Thrombosis in Childhood Leukemia. **Open Journal of Blood Diseases.** 3:100-103, 2013.
- ALTRUDA, F.; POLI. V.; RESTAGNO, G.; SILENGO, L. "Structure of the human hemopexin gene and evidence for intron-mediated evolution". **J. Mol. Evol.** 27 (2):102–8, 1988.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Myelodysplastic Syndromes.** Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003122-pdf.pdf> (acesso 02 de dez de 2015). 2015.
- AMIN, D; HIDA, K; BIELENBERG, D. Tumor Endothelial Cells Express Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) but not ErbB3 and Are Responsive to EGF and to EGFR Kinase Inhibitors. **Cancer Res.** 66:2173-80, 2006.
- ANGOSTO, M. C., & GÓMEZ, J. A. A. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. In **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia** (No. 1, pp. 59-84). Real Academia Nacional de Farmacia, 2010.
- ANTONELOU, M.H.; KRIEBARDIS, A.G.; STAMOULIS, K.E.; TROUGAKOS, I.P.; PAPASSIDERI, I.S.; Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes is involved in the molecular process of defected material disposal during vesiculation. **PLoS One.** 6(10):e26033, 2011.
- APPUKUTAN, P. S.; SUROLIA, A.; BACHHAWAT, B. K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian J. Bioche. Bio.** 14:382-384, 1977.
- AUGUR, C., YU, L., SAKAI, K., OGAWA, T., SINAÏ, P., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. Further studies of the ability of xyloglucan oligosaccharides to inhibit auxin-stimulated growth. **Plant Physiology.** 99: 180-185 1992.

- AZERO, E.; ANDRADE, C. Extração e Caracterização da Galactomanana de  
Extração e Caracterização da Galactomanana de Sementes de *Caesalpinia pulcher*  
*Caesalpinia pulcherrima*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. Abr/Jun: 54-59, 1999.
- BABBAGE, G.; OTTENSMEIER, C. H.; BLAYDES, J.; STEVENSON, F. K.; SAHOTA,  
S. S. Immunoglobulin heavy chain locus events and expression of activation-induced  
cytidine deaminase in epithelial breast cancer cell lines. **Cancer Res.** 66, 3996–4000,  
2006.
- BAIWIR, D.; MAZZUCHELLI, G.; SMARGIASSO, N.; QUESADA-CALVO, F.; DE  
PAUW, E.; MALAISE, M.; MEUWIS, M. A. Comparison of serum fractionation  
methods by data independent label-free proteomics. **EuPA Open Proteomics.** 9, 14-  
22, 2015.
- BARRERA, D.I.; MATHEUS, L.M.; STIGBRAND, T.; ARBELÁEZ, L.F. Proteolytic  
hydrolysis and purification of the LRP/alfa-2-macroglobulin receptor domain from  $\alpha$ -  
macroglobulins. **Protein expression and purification.** 53(1), 112-118, 2007.
- BERGER, S.; ROOS, A.; DAHA, M. Complement and the kidney: what the  
nephrologist needs to know in 2006? **Nephrol Dial Transplant.** 20:2613-2619, 2005.
- BERTUZZI, M.; MARELLI, C.; BAGNATI, R.; COLOMBI, A.; FANELLI, R.; SAIEVA, C.;  
CEROTI, M.; BENDINELLI, B.; CAINI, S.; AIROLDI, L.; PALLI, D. Plasma clusterin as  
a candidate pre-diagnosis marker of colorectal cancer risk in the Florence cohort of  
the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition: a pilot study. **BMC  
Cancer.** 15:56, 2015.
- BICK, R.L. Coagulation abnormalities in malignancy: a review. **Semin Thromb  
Hemost.** 18:353-72, 1992.
- BRAGA, R, C.; TEIXEIRA-SÁ, D. M. A.; RIBEIRO, A. F.; MIRANDA, R. L.; ALMEIDA,  
L. M.; HORTA, A. C. H.; MOREIRA, R. A. Evaluation of *caesalpinia pulcherrima*  
endospermic gum as affinity matrices for galactose - binding lectins interaction. **Braz.  
Arch. Biol. Technol.** 54(2): p. 283-292, 2011.
- BRANDO-LIMA, A. *et al.* Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase-Akt and  
nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. **Int  
Immunopharmacol.** 6(3):465–72, 2006.
- BRAOUDAKI, M.; LAMBROU, G.I.; VOUGAS, K.; KARAMOLEGOU, K.; TSANGARIS,  
G.T.; TZORTZATOU-STATHOPOULOU, F. Protein biomarkers distinguish between  
high- and low-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia in a tissue specific manner.  
**J Hematol Oncol.** 6:52, 2013.
- BRECCIA, M *et al.* Usefulness and prognostic impact on survival of WHO  
reclassification in FAB low risk myelodysplastic syndromes. **Leuk Res.** 30(2):178-82,  
2006.

BUCKERIDGE, M.S.; ROCHA, D.C.; REID, J.S.G.; DIETRICH, S.M.C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. **Physiologia Plantarum**. v.86, p.145-151, 1992.

BURGHHAUS, B.; LANGER, C.; THEDIECK S.; NOWAK-GOTTL, U. Elevated alpha-1 antitrypsin is a risk factor for arterial ischemic stroke in childhood. **Acta Haematol**. 115: 186–91, 2006.

CAMPANA, P.T.; MORAES, D.I.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; BELTRAMINI, L.M. Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin, **Eur. J. Biochem**. 269:753-758, 2002.

CARVALHO, P. *et al.* Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer. **J. bras. patol. med. lab**. 42(6):431-36, 2006.

CAVALCANTE, M.; TORRES-ROMERO, C.; PINTO, M.; MENDES, F.; PRIMO, L.; LIMA, D.; CORREIA, J.; MOREIRA, R.; MONTEIRO-MOREIRA, A. A panel of glycoproteins as candidate biomarkers for early diagnosis and treatment evaluation of B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Biomarker Research**. 4(1): 1-8, 2016.

CHRISTIANSON, J. *et al.* Defining human erad networks through an integrative mapping strategy. **Nat. Cell Biol**.14: 93–105, 2012.

CLARK, D; LI, M. Cancer biomarker discovery: Lectin-based strategies targeting glycoproteins. **Disease Markers**. 33:1–10, 2012.

COHEN, A. *et al.* A mass spectrometry-based plasma protein panel targeting the tumor microenvironment in patients with breast cancer. **Journal of Proteomics**. 81:135-147, 2013.

COLMAN, R.W. Biologic activities of the contact factors in vivo: potentiation of hypotension, inflammation, and fibrinolysis, and inhibition of cell adhesion, angiogenesis and thrombosis. **Thromb Haemost**. 82(6):1568-1577, 1999.

COREY, S. *et al.* Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nat Rev Cancer**. 7(2):118-29, 2007.

DE VASCONCELLOS, A. *et al.* Gastroprotective potential of frutalin, a D-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions. **Fitoterapia**. 83(3):604-8, 2012.

DI MICCO, P., ROMANO, M., NIGLIO, A., NOZZOLILLO, P., FEDERICO, A., PETRONELLA, P., NUNZIATA, L, DI MICCO, B., TORELLA, R. Alteration of haemostasis in non-metastatic gastric cancer. **Dig Liver Dis**. 33:546-50, 2001.

DIEPLINGER, H. *et al.* Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**. 18:1127-1133, 2009.

- DREVENY, I.; DEEVES, S.E.; FULTON, J.; YUE, B.; MESSMER, M.; BHATTACHARYA, A.; COLLINS, H.M.; HEERY, D.M. The double PHD finger domain of MOZ/MYST3 induces  $\alpha$ -helical structure of the histone H3 tail to facilitate acetylation and methylation sampling and modification. **Nucleic Acids Res.** 42, 822–835, 2014.
- EL-AKAWI, Z.J.; ABU-AWAD, A.M.; KHOURI, N.A. Alpha-1 antitrypsin blood levels as indicator for the efficacy of cancer treatment. **World J Oncol.** 4:83-6, 2013.
- EL-AKAWI, Z.J.; AL-HINDAWI, F.K.; BASHIR, N.A. Alpha-1 antitrypsin (alpha1-AT) plasma levels in lung, prostate and breast cancer patients. **Neuro Endocrinol Lett.** 29:482-4, 2010.
- FAN, X. *et al.* Macrophage Surface Expression of Annexins I and II in the Phagocytosis of Apoptotic Lymphocytes. **J Molecular Biol Cell.** 15: 2863-72, 2004.
- FENG, S. *et al.* Enrichment of glycoproteins using nanoscale chelating concanavalin a monolithic capillary chromatography. **Anal Chem.** 81:3776-83, 2009.
- FERREIRA, M. Frutalina lectiana  $\alpha$ -D galactose ligante de Artocarpus incisa L: Um novo marcador celular no estudo da progressao tumoral no c ancer de mama humano. Tese para obtencao do titulo de Doutor em Bioquimica pela Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2001.
- FREITAS, A.; GORIN, P.; NEVES, J.; SIERAKOWSKI, R. A. rheological description of mixtures of a galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches. **Carbohydrate Polymers**, 51, 25–32, 2003.
- FRIDMAN, W.H.; JANSSEN, B.J.; GOODSHIP, T.H.; ATKINSON, J.P. Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. **Blood.** 112(13):4948-52, 2008.
- FU, Y.; LAI, Y.; WANG, Q.; LIU, X.; HE, W.; ZHANG, H.; FAN, C.; YANG, G. Overexpression of clusterin promotes angiogenesis via the vascular endothelial growth factor in primary ovarian cancer. **Mol Med Rep.** 7(6):1726–32, 2013.
- GABIUS, H. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe lectin and galectin-1. **Biochimie.** 83: 659-66. 2001.
- GABIUS, H; GABIUS, S. **Glycosciences**: status and perspectives. Chapman and Hall. London, 1997.
- GALILI, U; CHEN, Z; DEGEEST, K. Expression of  $\alpha$ -gal epitopes on ovarian carcinoma membranes to be used as a novel autologous tumor vaccine. **Gynecologic Oncology.** 90: 100-108, 2003.
- GETTINS, P.G. Serpin structure, mechanism, and function. **Chem Rev.** 102:4751-804, 2002.

GIBSON, L.J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **Journal of the Royal Society Interface**. 9 (76): 2749–2766, 2013.

GOLDSTEIN, A.; ALTER, E.; SEAMAN, J. “Guar gum”, in: *Industrial Gums*. **Academic Press Inc**; Cap 14, 1973.

GOLDSTEIN, I.; HUGHES, R.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin?. **Nature**. 285: 665-6, 1980.

GUO, W.; MA, X.; XUE, C.; LUO, J.; ZHU, X.; XIANG, J.; LU, B.; LI, H. Serum clusterin as a tumor marker and prognostic factor for patients with esophageal cancer. **Dis Markers**. 0278-0240, 2014.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 40, p. 139-168, 1989.

HERNÁNDEZ, D. *et al.* Aplicaciones de las lectinas. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter**. 15: 91-95, 1999.

HERZBERG, V; FERRARI, C. **Tenho Câncer. E agora?** Enfrentando o câncer sem medos e fantasias. São Paulo: Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, 1998.

HIGASHIYAMA, M.; DOI, O.; KODAMA, K.; YOKOUCHI, H.; TATEISHI, R. An evaluation of the prognostic significance of alpha-1-antitrypsin expression in adenocarcinomas of the lung: an immunohistochemical analysis. **Br J Cancer**. 65:300-2, 1992.

HILLEN, H.F. Thrombosis in cancer patients. **Ann Oncol**. 11:273-6, 2000.

HONGSACHART, P. *et al.* Glycoproteomic analysis of WGA-bound glycoprotein biomarkers in sera from patient with lung adenocarcinoma. **Electrophoresis** 30:1206-20, 2009.

IJSSELSTIJN, L.; DEKKER, L.J.; STINGL, C.; VAN DER WEIDEN, M.M.; HOFMAN, A.; KROS, J.M.; KOUDSTAAL, P.J.; SILLEVIS SMITT, P.A.; IKRAM, M.A.; BRETELER, M.M; LUIDER, T. M. Serum levels of pregnancy zone protein are elevated in presymptomatic Alzheimer's disease. **J Proteome Res**. 10(11):4902-10, 2011.

IKEDA, M.; FURUKAWA, H.; IMAMURA, H.; SHIMIZU, J.; ISHIDA, H.; MASUTANI, S.; TATSUTA, M.; SATOMI, T. Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with gastric cancer. **Ann Surg Oncol**. 9:287-91, 2002.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: Inca, 2011.

JENEY, V.; BALLA, J.; YACHIE, A.; VARGA, Z.; VERCELLOTTI, G. M.; EATON, J. W.; BALLA, G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. **Blood**. 100:879–887, 2002.

JENSEN, L.J.; KUHN, M.; STARK, M.; CHAFFRON, S.; CREEVEY, C.; MULLER, J.; DOERKS, T.; JULIEN, P.; ROTH, A.; SIMONOVIC, M.; BORK, P.; VON MERING, C. "STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms". **Nucleic Acids Res**. 37 (Database issue): D412-6, 2009.

JERABEK-WILLEMSEN, M.; ANDRÉ, T.; WANNER, R.; ROTH, H. M.; DUHR, S.; BAASKE, P.; BREITSPRECHER, D. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. **Journal of Molecular Structure**. 1077, 101-11, 2014.

**JEYAPRAKASH, A.A.**; KATIYAR, S.; SWAMINATHAN, C.P.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Structural Basis of the Carbohydrate Specificities of Jacalin: An X-ray and Modeling Study. **J Mol Biol**. 332(1):217-28, 2003.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **J Immunol Methods**. 212(2):193-211, 1998.

KILPATRICK, D. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim Biophys Acta**. 1572:187– 197, 2002.

KOBATA, A. **Glycoprotein Glycan Structures**. Comprehensive Glycocience. Pp: 40-50. 2007.

KOBAYASHI, H., FUKUOKA, A. Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. **Green Chem**. 15, 1740-1763, 2013.

KOMROKJI, R; ZHANG, L; BENEDETTI, J. Myelodysplastic Syndromes Classification and Risk Stratification. **Hematol Oncol Clin**. 24: 443–57, 2010.

KULLOLLI, M; HANCOCK, W; HINCAPIE, M. Preparation of a high-performance multi-lectin affinity chromatography (HPM- LAC) adsorbent for the analysis of human plasma glycoproteins. **J Sep Sci**. 31: 2733-39. 2008.

KWON, H.C.; OH, S.Y; LEE, S.; KIM S.H.; HAN, J.Y.; KOH, R.Y.; KIM, M.C.; KIM, H.J. Plasma levels of prothrombin fragment F112, D-dimer and prothrombin time correlate with clinical stage and lymph node metastasis in operable gastric cancer patients. **Jpn J Clin Oncol**. 38:2-7, 2008.

LEAL, R. *et al.* Efeito neuroprotetor de lectinas frente à neurotoxicidade glutamatérgica, Seminário/ IC/UFSC, 2011.

LEE, H. *et al.* Simple method for quantitative analysis of n-linked glycoproteins in hepatocellular carcinoma specimens. **J Proteome Res**. 9:308-18, 2010.

LEE, J.H.; RYU, K.W.; KIM, S.; BAE, J.M. Preoperative plasma fibrinogen levels in gastric cancer patients correlate with extent of tumor. **Hepatogastroenterology**. 51:1860-3, 2004.

LI, C.; ZOLOTAREVSKY, E.; THOMPSON, I.; ANDERSON, M.A.; SIMEONE, D.M.; CASPER, J.M.; MULLENIX, M.C.; LUBMAN, D.M. A multiplexed bead assay for profiling glycosylation patterns on serum protein biomarkers of pancreatic cancer. **Electrophoresis**. 32:2028-2035, 2011.

LI, H.; D'ANJOU, M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. **Curr Opin Biotechnol**. 20(6): 678-84, 2009.

LIENER, I.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. The Lectins – Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. **J Biology**, 1986.

LIMA, N.N.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M.R. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa* (Jatobá). **Cien. Cult.** 45(1):22–26, 1993.

LIMA, R.D.N.; LIMA, J.R.; DE SALIS, C.R.; MOREIRA, R.A. Cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) exudates gum: A novel bioligand tool. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 35:45-53, 2002.

LOTAN, E., SKUTELSKY, E., DANON, N. The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). **Journal of Biological Chemistry**. 250: 8518-23, 1986.

MAXWELL ANDERSON, J.; STIMSON, W.H.; CETTINGBY, G.; IHUNJHUNWALA, S.K.; BURT, R.W. Detection of mammary micrometastases by pregnancy-associated  $\alpha_2$ -glycoprotein (PAC,  $\alpha$ -PAC or PAM) and carcinoembryonic antigen (CEA). **Eur J Cancer**. 2(5):709-14, 1979.

MIILLER, T.; BOWEN, M.; DE MELLO, J.; PIDCOCK, N.B.; COOPER, E.H. Limitations of using Pregnancy-associated  $\alpha_2$  glycoprotein as a tumor marker. **Eur J Cancer Clin Oncol**.18:327-32,1982.

MOGHIMI, S. M.; PATEL, H. M. Differential properties of organ-specific serum opsonins for liver and spleen macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**. 984(3), 379-383, 1989.

MOREIRA, R.A.; CASTELO-BRANCO, C.C.; MONTEIRO, A.C.O; TAVARES, R.O.; BELTRAMINE, L.M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**. vol. 47, pp.1183-1188, 1998.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Indicadores e dados básicos – Brasil. **Indicadores de mortalidade**: Mortalidade proporcional por grupos de causas. DATASUS. 2015. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c04.def> (acesso em 01 dez 2015), 2015.

MUKHERJEE S. **O imperador de todos os males: Uma biografia do câncer.** São Paulo: Companhia das Letras, 2012.

NIEHANS, G.A.; CHERWITZ, D.L.; STALEY, N.A.; KNAPP, D.J; DALMASSO, A.P. Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin). **Am J Pathol.** 149:129-42, 1996.

NISHIOKA, K.; KAWAMURA, K.; HIRAYAMA, T.; KAWASHIMA, T.; SHIMADA, K. The complement system in tumor immunity: significance of elevated levels of complement in tumor bearing hosts. **Ann NY Acad Sci.** 276:303-15, 1976.

NOWAK-GÖTTL, U.; KENET, G.; MITCHELL, L.G. Thrombosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia: epidemiology, aetiology, diagnosis, prevention and treatment. **Best Pract Res Clin Haematol.** 22(1):103-14, 2009.

O'CONNOR, N.; GOZZARD, D. I.; LOVE, E. M.; YIN, J. L.; TURCK, W. P. G. Haemostatic abnormalities and malignant disease. **The Lancet.** 327 (8482): 677, 1986.

ONWELUZO, J.C.; RAMESH, H.P.; THARANATHAN N.T. Characterization of free sugars and xyloglucan – type polysaccharide in two tropical legumes. **Carbohydrate Polymers.** 47:253-257, 2002.

PARK, S.; MATHIS, K.W.; LEE, I.K. The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.** 15(1):45–53, 2014.

PARKER, C.; BORCHERS, C. Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation e Quality assurance and control of protein biomarker assays. **Mol Oncol.** 8(4):840-58, 2014.

PELÁEZ, L. M. S.; TORRES, A. M. H. Expresión de vitronectina en cáncer pulmonar primario. **Revista Colombiana de Cancerología.** 17(4), 166-167, 2013.

PETRICOIN, E. *et al.* Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. **Lancet.** 359:572-577, 2002.

PILOBELLO, K. *et al.* Development of a lectin microarray for the rapid analysis of protein glycopatterns. **ChemBio Chem.** 6: 985-89, 2005.

PIN, E; FREDOLINI, C; PETRICOIN, E. The role of proteomics in prostate cancer research: Biomarker discovery and validation. **Clinical Biochemistry.** 46:524-38, 2013.

PIO R. Control of complement activation by cancer cells and its implications in antibody-mediated cancer immunotherapy. **Inmunologia.** 25:173-87, 2006.

PLAVINA, T. *et al.* Combination of abundant protein depletion and multi-lectin affinity chromatography (M-LAC) for plasma protein biomarker discovery. **J Proteome Res.** 662-671, 2007.

POBLETE, M.T.; NUALART, F.; DEL POZO, M.; PEREZ, J.A.; FIGUEROA, C.D. Alpha 1-antitrypsin expression in human thyroid papillary carcinoma. **Am J Surg Pathol.** 20:956-63, 1996.

PUSZTAI, A. **Plant lectins.** Cambridge University Press, Cambridge, 2008.

QIU, X.; ZHU, X.; ZHANG, L.; MAO, Y.; ZHANG, J.; HAO, P.; LI, G.; LV, P.; LI, Z.; SUN, X.; WU, L.; ZHENG, J.; DENG, Y.; HOU, C.; TANG, P.; ZHANG, S.; ZHANG, Y. Human epithelial cancers secrete immunoglobulin g with unidentified specificity to promote growth and survival of tumor cells. **Cancer Res.** 63:6488-6495, 2003.

RAHR, H.B.; SORENSEN, J.V.; LARSEN, J.F.; JENSEN, F.S.; BREDAHL, C. Markers of coagulation and fibrinolysis in portal blood from patients with and without gastric malignancy. **Scand J Gastroenterol.** 29:516-21, 1994.

RAU, J.C.; BEAULIEU, L.M.; HUNTINGTON, J.A.; CHURCH, F.C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. **J Thromb Haemost.** 5:102-115, 2007.

REID, J.S.G. Cell wall storage carbohydrates in seeds. Biochemistry of the seed "gums" and "hemicelluloses". **Advances in Botanical Research.** 11:125-155, 1985.

RIJNBOUTT, S., JANSEN, G., POSTHUMA, G., HYNES, J. B., SCHORNAGEL, J. H., & STROUS, G. J. Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor-alpha. **The Journal of cell biology.** 132(1):35-47, 1996.

ROBERTS, L.M.; LAMB, F.I.; PAPPIN, D.J.; LORD, J.M. The primary sequence of *Ricinus communis* agglutinin. Comparison with ricin. **The Journal of Biological Chemistry.** 260:15682-15686, 1985.

ROBYT, J. **General Properties, Occurrence, and Preparation of Carbohydrates.** Chemistry and Chemical Biology, 2008.

RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; DIAZ-GUILLEN, M.A.; HEINE-SUNER, D. An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32. **Mol Immunol.** 36:803-8, 1999.

SAFINA, L. B.; DURAN, M.; ALASELA, B.; DANIELSSON, B. Surface plasmon resonance for real-time study of lectin-carbohydrate interactions for the differentiation and identification of glycoproteins, **Talanta.** 84:1284-1290, 2011.

SAND, O.; FOLKERSEN, J.; WESTERGAARD, J.B.; SOTTRUP-JENSEN, L. Characterization of human pregnancy zone protein. Comparison with human  $\alpha_2$ -macro-globulin. **J Biol Chem.** 260:15723-35, 1985.

SCHEIBE, C. *et al.* Carbohydrate-PNA and aptamer-PNA conjugates for the spatial screening of lectins and lectin assemblies. **Chembiochem.** 14 (2):236-50, 2013.

SEIDEL, S.A.; DIJKMAN, P.M.; LEA, W.A.; VAN DEN BOGAART, G.; JERABEK-WILLEMSEN, M.; LAZIC, A.; KATRITCH, I. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. **Methods**. 59(3), 301-315, 2013.

SERAGLIA, R.; MOLIN, L.; TONIDANDEL, L.; PUCCIARELLI, S.; AGOSTINI, M.; URSO, E.D.; BEDIN, C.; QUAIA, M.; NITTI, D.; TRALDI, P. An investigation on the nature of the peptide at m/z 904, overexpressed in plasma of patients with colorectal cancer and familial adenomatous polyposis. **J Mass Spectrom**. 42(12):1606-1612, 2007.

SESHAGIRIRAO, K.; LEELAVATHI, C.; SASIDHAR, V. Cross-linked *Leucaena* Seed Gum Matrix: An Affinity Chromatography Tool for Galactose-specific Lectins. **J. Biochem. Mol. Biol.** 38:370-372, 2005.

SHAPIRO, S. M.; BHUTANI, V. K.; JOHNSON, L. Hyperbilirubinemia and kernicterus. **Clin. Perinatol.** 33:387–410, 2006.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. 14: 53-62, 2004.

SHARON, N; LIS, H. Lectins cell agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**. 177: 949-58,1972.

SILVA, B. *et al.* Características antineoplásicas da frutalina, lectina de *Artocarpus incisa* em camundongos. [http:// formulario.pibic.ufsc.br/pub/verResumo/124234](http://formulario.pibic.ufsc.br/pub/verResumo/124234), 2010.

SINGH, R; CAMPBELL, B.; YU, L.; FERNIG, D.; MILTON, J.; GOODLAD, R.; FITZGERALD, A.; RHODES, J. Cell surface–expressed Thomsen-Friedenreich antigen in colon cancer is predominantly carried on high molecular weight splice variants of CD44. **Glycobiology**. 11(7): 587-592, 2001.

SPERATI, C.; MOLITERNO, A. Thrombotic Microangiopathy: Focus on Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. **Hematol Oncol Clin North Am**. 29(3):541-559, 2015.

ŠUNDERIĆ, M.; MALENKOVIĆ, V.; NEDIĆ, O. Complexes between insulin-like growth factor binding proteins and alpha-2-macroglobulin in patients with tumor. **Exp Mol Pathol**. 98(2):173-7, 2015.

SVAROVSKY, S; JOSHI, L. Cancer glycan biomarkers and their detection – past, present and future. **Analytical Methods**. 6:3918-3936, 2014.

TANEMURA, M.; OGAWA, H.; YIN, D.P.; CHEN, Z.C.; DISESA, V.J.; GALILI, U.; Elimination of anti-Gal B cells by alpha-Gal ricin1. **Transplantation**. 73:1859-1868, 2002.

TAO, S. *et al.* Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan markers. **Glycobiology**. 18: 761-9, 2008.

TEIXEIRA-SÁ, D.; REICHER, F.; BRAGA, R.C.; BELTRAMINI, L.M.; DE AZEVEDO MOREIRA, R. Isolation of a lectin and a galactoxyloglucan from *Mucuna sloanei* seeds. **Phytochemistry**. v. 70, p. 1965-1972, 2009.

THULER, L. **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Educação. 2. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

TISCH, R.; ROIFMAN, C.M.; HOZUMI, N.O.B.U.M.I.C.H.I. Functional differences between immunoglobulins M and D expressed on the surface of an immature B-cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 85(18), 6914-6918, 1988.

TOMLINSON, E., & BURGER, J. J. Monolithic albumin particles as drug carriers. **Polymers in Controlled Drug Delivery**. 25-48, 1987.

TONE, F. *et al.* Negatively Affects Ricin Transport. **Toxins**. 5: 969-82, 2013.

TUCCILLO, F *et al.* Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43. **Biomed Res Int**. 20 (14):742-831, 2014.

UMEMURA, H.; TOGAWA, A.; SOGAWA, K.; SATOH, M.; MOGUSHI, K.; NISHIMURA, M.; MATSUSHITA, K.; TANAKA, H.; TAKIZAWA, H; KODERA, Y.; NOMURA, F. Identification of a high molecular weight kininogen fragment as a marker for early gastric cancer by serum proteome analysis. **J Gastroenterol**. 46 (5): 577-585, 2011.

VARDIMAN, J *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**. 114(5):937-51, 2009.

VARSANO, S.; FROLKIS, I.; RASHKOVSKY, L.; OPHIR, D.; FISHELSON, Z. Protection of human nasal respiratory epithelium from complement-mediated lysis by cell-membrane regulators of complement activation. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 15:731-7, 1996.

VARSANO, S.; RASHKOVSKY, L.; SHAPIRO, H; OPHIR, D.; MARK-BENTANKUR, T. Human lung cancer cell lines express cell membrane complement inhibitory proteins and are extremely resistant to complement mediated lysis; a comparison with normal human respiratory epithelium in vitro, and an insight into mechanism (s) of resistance. **Clin Exp Immunol**. 113:173-82, 1998.

VERHAVE, J.C.; WETZELS, J.F.; VAN DE KAR, N.C. Novel aspects of atypical haemolytic uraemic syndrome and the role of eculizumab. **Nephrol Dial Transplant**. Suppl 4:131-41, 2014.

VLACHOS, A *et al.* Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. **Blood**. 119(16):3815-9, 2012.

- VON MERING, C.; JENSEN, L.J.; KUHN, M.; CHAFFRON, S.; DOERKS, T.; KRUGER, B.; SNEL, B.; BORK, P. "STRING 7—recent developments in the integration and prediction of protein interactions". **Nucleic Acids Res** 35 (Database issue): D358-62, 2007.
- WANG, J.; WANG, X.; LIN, S.; CHEN, C.; WANG, C.; MA, Q.; JIANG, B. Identification of kininogen-1 as a serum biomarker for the early detection of advanced colorectal adenoma and colorectal cancer. **PloS one**. 8(7), e70519, 2013.
- WANG, Q.; ELLIS, P.R.; ROSS-MORPHY, S.B.; REID, J.S.G. A new polysaccharide from a traditional Nigerian plant food: Detarium senegalense gmelin. **Carbohydr. Res.** 284:229–239, 1996.
- WANG, Y; PETERSON, S; LORING J. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. **Cell Research**. 24(2):143-160, 2014.
- WELLMANN, A.; THIEBLEMONT, C.; PITTALUGA, S.; SAKAI, A.; JAFFE, E.S.; SIEBERT, P.; RAFFELD, M. Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas. **Blood**. 96:398–404, 2000.
- WOJTUKIEWICZ, M.Z; SIERKO, E.; RAK, J. Contribution of hemostatic system to angiogenesis in cancer. **Semin Thromb Hemost.** 30:5-20, 2004.
- WU, A. M.; WU, J. H.; YANG, Z.; SINGH, T.; GOLDSTEIN, I. J.; SHARON, N. Differential contributions of recognition factors of two plant lectins—Amaranthus caudatus lectin and Arachis hypogea agglutinin, reacting with Thomsen-Friedenreich disaccharide (Gal $\beta$ 1–3GalNAc $\alpha$ 1–Ser/Thr). **Biochimie**. 90(11):1769-1780, 2008.
- WU, J. H.; SINGH, T.; HERP, A.; WU, A. M. Carbohydrate recognition factors of the lectin domain present in the Ricinus communis toxic protein (ricin). **Biochimie**. 88:201-217, 2006.
- YAMAGUCHI, N.; YAMAMURA, Y.; KOYAMA, K.; OHTSUJI, E.; IMANISHI, J.; ASHIHARA, T. Characterization of new human pancreatic cancer cell lines which propagate in a protein-free chemically defined medium. **Cancer Res**. 50:7008-14, 1990.
- YAMASHITA, H.; KITAYAMA, J.; ISHIKAWA, M.; NAGAWA, H. Tissue factor expression is a clinical indicator of lymphatic metastasis and poor prognosis in gastric cancer with intestinal phenotype. **J Surg Oncol**. 95:324-31, 2007.
- YAPIJAKIS, C.; BRAMOS, A.; NIXON, A.M.; RAGOS, V.; VAIRAKTARIS, E. The interplay between hemostasis and malignancy: the oral cancer paradigm. **Anticancer Res**. 32(5):1791-800, 2012.
- YOUSEF G.M., DIAMANDIS, E.P. The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: Structure, Function, and Association to Disease. **Endocr Rev**. 22(2): 184-204, 2001.

YUEN, S.N.; CHOI, S.-M.; PHILLIPS, D. L.; MA, C.-Y. Raman and FTIR spectroscopy study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. **Food Chem.** 114: 1091–1098, 2009.

ZENG, Z. *et al.* A proteomics platform combining depletion, multi-lectin affinity chromatography (M-LAC), and isoelectric focusing to study the breast cancer proteome. **Anal Chem.** 83: 4845-4854, 2011.

ZHENGSHAN, C.; JIANG, G. Immunoglobulin G expression in carcinomas and cancer cell lines. **The FASEB Journal.** 21:2931-2938, 2007.

## ANEXOS

Anexo 1. Proteínas Únicas achadas em Controle e não em AREB na fração retida depois de cromatografia de afinidade em coluna de Frutalina

Accession	Description	Score	
CO4A_HUMAN	Complement C4 A OS Homo sapiens GN C4A PE 1 SV 2	74,96	Controle
A2NJV5_HUMAN	Kappa light chain variable region Fragment OS Homo sapiens GN IGKV A18 PE 4 SV 1	1751,05	Controle
Q6N094_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp686O01196 OS Homo sapiens GN DKFZp686O01196 PE 1 SV 1	2375,3	Controle
CLUS_HUMAN	Clusterin OS Homo sapiens GN CLU PE 1 SV 1	408,71	Controle
Q5T985_HUMAN	Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain H2 OS Homo sapiens GN ITIH2 PE 2 SV 1	1405,32	Controle
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A I OS Homo sapiens GN APOA1 PE 1 SV 1	2419,89	Controle
B2R582_HUMAN	cDNA FLJ92374 highly similar to Homo sapiens C type lectin domain family 3 member B CLEC3B OS Homo sapiens GN CLEC3B PE 1 SV 1	935,75	Controle
VTNC_HUMAN	Vitronectin OS Homo sapiens GN VTN PE 1 SV 1	322,61	Controle

Anexo 2. Proteínas Únicas achadas em Controle e não em ARSA na fração retida depois de cromatografia de afinidade em coluna de Frutalina

Accession	Description	Score	
A8K3E4_HUMAN	cDNA FLJ78367 highly similar to Homo sapiens fibrinogen A alpha polypeptide FGA transcript OS Homo sapiens GN FGA PE 1 SV 1	117,84	Controle