



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

LUIZ ANDRÉ CAVALCANTE BRIZENO

ANÁLISE PROTEÔMICA DE SALIVA DE PACIENTES COM LESÕES
POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
INTRAORAIS

FORTALEZA

2018

LUIZ ANDRÉ CAVALCANTE BRIZENO

ANÁLISE PROTEÔMICA DE SALIVA DE PACIENTES COM LESÕES
POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
INTRAORAIS

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

Orientador: Profa. Dra Kyria Santiago do Nascimento

Co-orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

FORTALEZA

2018

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)

- B879a Brizeno, Luiz André Cavalcante.
Análise proteômica de saliva de pacientes com lesões potencialmente malignas e carcinoma de células escamosas intraoral / Luiz André Cavalcante Brizeno. – 2018.
78 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

Coorientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Leucoplasia oral. 3. Saliva. I. Título.

CDD 660.6

LUIZ ANDRÉ CAVALCANTE BRIZENO

ANÁLISE PROTEÔMICA DE SALIVA DE PACIENTES COM LESÕES
POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
INTRAORAIS

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

Aprovada em: __/__/__.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva (Examinador)
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Profa. Dra. Carolina Rodrigues Teófilo (Examinadora)
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Profa. Dra. Juliana Ximenes Damasceno (Examinadora)
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Aos meus pais Fátima e Brizeno,
Ao meu irmão Henrique e irmã Adriana

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora de Fátima.

Aos professores Dra. Kyria Santiago do Nascimento e ao Dr. Benildo Sousa Cavada pelas orientações, pela confiança, por acreditarem no meu potencial, por me permitirem trabalhar no BioMol, pelos ensinamentos e amizade. Sou muito grato por tudo!

Aos professores Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva, Dra. Carolina Rodrigues Teófilo, Dra. Juliana Ximenes Damasceno, Dra. Cleane Gomes Moreira, e Dr. Jorge Luís Almeida Correia por aceitarem compor a banca, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Ao professor Dr Mário Rogério Lima Mota pelo apoio e colaboração.

A Cláudia Figueiredo Lóssio, professora Dra. Maria Gleiciane de Queiroz Martins e Mayara Torquato pela importante participação no desenvolvimento desse trabalho, pelos ensinamentos, pela amizade e paciência.

Aos amigos e professores do Laffin, professora Dra Ana Maria Sampaio Assreuy, Professora Dra Alana Pires, a Gabriela, Juliana, Renata, Pedro Henrique, Lucas pela colaboração e apoio.

A amiga Taciana Matos de Alcântara pelo grande apoio pessoal total e irrestrito.

Ao Luis Vaz Curvo pelos conselhos e suporte sempre nas horas oportunas.

Aos amigos Ivanice, Simoni, Clareane, Mayara Queiroz, Vanir, todos vocês tiveram grande participação na condução desse trabalho. Obrigado pelos ensinamentos, crescimento, dedicação e amizade.

Ao Vinícius da Silva Osterne, obrigado pela contribuição nos experimentos em bioinformática.

A todos os integrantes e amigos do BioMol, Hadson, Neto, Alfa, obrigado por estarem sempre prontos a ajudar e por toda a dedicação; Adolph, William, David, Larissa, Ronniery, Messias, Marliane, Ariany, Lucas a todos do BioMol, obrigado pela amizade e companheirismo.

A minha família, meus pais Fátima e Brizeno pelo apoio em todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

RESUMO

O câncer oral constitui um sério problema de saúde pública no Brasil. O tipo histológico de tumor maligno mais comum em cavidade oral (90 a 95% dos casos) é o Carcinoma de células escamosas (CCE) uma neoplasia epitelial invasiva e agressiva e de sobrevida baixa principalmente pelo diagnóstico tardio. Eventualmente, pode ocorrer o aparecimento de lesões que precedem o surgimento de neoplasias malignas, denominadas de lesões potencialmente malignas (LPM) sendo a leucoplasia oral (LO) a mais comum. Há um interesse crescente pela análise da saliva através de proteômica já que essa é uma fonte não invasiva e rica de informação e que pode propiciar não só um diagnóstico precoce, bem como prognóstico e monitoramento do tratamento. A análise proteômica salivar pode ser dificultada pela presença de proteínas de alta abundância que mascaram ou reduzem a sensibilidade de separação. As lectinas têm sido amplamente utilizadas para remover glicoproteínas de alta abundância que possam eventualmente prejudicar a análise do proteoma. Esse estudo se propôs a avaliar pela primeira vez as proteínas presentes na saliva de pacientes com LO e com CCE oral do estado do Ceará, quando comparados a um grupo controle, através de técnicas proteômicas (eletroforese uni e bidimensional seguida por espectrometria de massas) e de biologia molecular (Western Blot). Para remoção de proteína de alta abundância da saliva (mucina) foi utilizada uma coluna cromatográfica imobilizada com a lectina isolada da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* (BTL) em paralelo foram utilizadas metodologias de bioinformática (modelagem e docking molecular) para a compreensão acerca da patogênese molecular do CCE de boca. Ao todo foram coletados saliva de 5 pacientes de cada grupo com diagnóstico de CCE e LO comprovados por exames histopatológicos e o perfil proteico dos grupos comparados entre si. O presente trabalho demonstrou pela primeira vez o aumento nos níveis de ZG16B no pool de salivas de pacientes com CCE Oral quando comparado ao pool dos grupos LO e Controle, foi verificado também o aumento de citoqueratina 1 no pool de CCE. Através de ensaios de bioinformática verificou-se que a ZG16B se assemelha estruturalmente a lectina de Artin M e liga-se fortemente a glicanos complexos pela porção manosídica. O estudo pode contribuir para descoberta de potenciais biomarcadores salivares no CCE podendo auxiliar no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e prognósticas, influenciando diretamente na sobrevida do paciente e redução nos gastos em saúde pública.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. Leucoplasia oral. Saliva. Proteômica. Docking molecular.

ABSTRACT

Oral cancer is a serious public health problem in Brazil. The most common histological type of malignancy in the oral cavity (90 to 95% of cases) is squamous cell carcinoma (SCC) an invasive and aggressive epithelial neoplasia and low survival mainly due to late diagnosis. Eventually, lesions that precede the appearance of malignant neoplasias, called potentially malignant lesions (PML), may occur, being oral leukoplakia (OL) the most common. There is a growing interest in the analysis of saliva through proteomics since this is a noninvasive and rich source of information and can provide not only an early diagnosis, but also a prognosis and monitoring of the treatment. Salivary proteomic analysis can be hampered by the presence of high abundance proteins that mask or reduce the sensitivity of separation. Lectins have been widely used to remove high abundance glycoproteins that could potentially undermine proteome analysis. This study aimed to evaluate for the first time proteins present in saliva of patients with OL and oral SCC in Ceará State, when compared to a group control, through proteomic techniques (one and two-dimensional electrophoresis followed by mass spectrometry) and molecular biology (Western Blot). A chromatographic column immobilized with the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion triquetrum* (BTL) was used to remove high abundance protein from saliva (mucin). In parallel bioinformatics methodologies were used (modelling and molecular docking) to the comprehension of oral SCC molecular pathogenesis. Saliva pools were collected from 5 patients from each group with a diagnosis of CCE and LO, confirmed by histopathological exams and the protein profile of the groups compared to each other. The present study demonstrated for the first time the increase in the levels of ZG16B in the saliva pool of patients with Oral SCC when compared to the pool of the OL and control groups, it was also verified the increase of cytokeratin 1 in the SCC pool. Through bioinformatics assays ZG16B is structurally similar to the Artin M lectin and binds strongly to complex glycans by the mannide moiety. The study may contribute to the discovery of potentials salivary biomarkers in SCC, which may assist in the development of diagnostic and prognostic tools, directly influencing the patients survival and reduction of public health expenses.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Oral leukoplakia. Saliva. Proteomics. Molecular docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação dos glicanos aplicados no <i>docking</i> molecular.....	41
Figura 2 -	Gel SDS-PAGE 12% contendo proteínas extraídas do pool de saliva de pacientes com CCE oral.....	44
Figura 3 -	Gel SDS-PAGE 12% contendo proteínas extraídas do pool de saliva de pacientes com leucoplasia oral.....	45
Figura 4 -	Gel SDS-PAGE 12% contendo proteínas extraídas do pool de saliva de pacientes do grupo controle.....	46
Figura 5 -	Gel SDS-PAGE 12% contendo proteínas extraídas da saliva dos 3 pools de pacientes (CCE, LO e Controle).....	47
Figura 6 -	Western Blot da proteína ZG16B presente no <i>pool</i> de proteínas totais de saliva de pacientes dos grupos CCE, LO e controle.....	48
Figura 7 -	Os níveis da proteína ZG16B estão aumentados no Carcinoma de Células Escamosas Oral.....	49
Figura 8 -	Géis bidimensionais de poliacrilamida 12,5% das amostras dos <i>pools</i> de CCE, LO e controle.....	50
Figura 9 -	Zoom da região do <i>spot</i> 2048.....	51
Figura 10 -	A proteína citoqueratina 1 está aumentada no <i>pool</i> de saliva de CCE.....	51
Figura 11 -	Interação de ZG16B com manose.....	53
Figura 12 -	Interação da ZG16B com condroitina-sulfato.....	54
Figura 13 -	Sobreposição de ZG16b com a lectina <i>Artin M</i>	55
Figura 14 -	ZG16B estrutura da proteína com os sítios de ligação a carboidrato.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Potenciais biomarcadores salivares para detecção de câncer oral.....	30
Tabela 2 -	Comparação de diferentes biomarcadores para carcinoma espinocelular oral.....	31
Tabela 3 -	Perfil clínico patológico dos pacientes com CCE e LO.....	42
Tabela 4 -	Proteínas identificadas do <i>pool</i> de saliva de pacientes com CCE oral.....	44
Tabela 5 -	Proteínas identificadas do <i>pool</i> de saliva de pacientes com Leucoplasia oral.....	45
Tabela 6 -	Proteínas identificadas do <i>pool</i> de saliva de pacientes do grupo controle.....	46
Tabela 7 -	Escores de <i>docking</i> molecular de ZG16B com N-glicanos, monossacarídeos e glicosaminoglicanos.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE:	Eletroforese bidimensional
AAT:	α -1-antitripsina
BSA:	Albumina Sérica Bovina
BTL:	Lectina de Bryothamnion triquetrum
CCE:	Carcinoma de células escamosas
CEA:	Antígeno carcinoembriogênico
CHAPS:	[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio)]-1-propanesulfonate)
Da e kDa:	Dálton e kilodálton
DRC:	Domínio de reconhecimento a carboidratos
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA:	Ensaio imunossorvente ligado a enzimas
GalNAc:	N-Acetilgalactosamina
HPV:	Papiloma vírus humano
IEC:	Cromatografia de troca iônica
IL-1, 6, 8:	Interleucina 1, 6 e 8
INCA:	Instituto Nacional de Câncer
IPG:	Immobiline DryStrip gels
KM+:	lectina KM+, artrocarpina ou Artim M
LMW:	Marcador de baixo peso molecular
LO:	Leucoplasia oral
LPM:	Lesões potencialmente malignas
m/z:	Relação massa sobre carga
mA:	Miliampere
MALDI:	Ionização dessorção a laser assistida por matriz
M-LAC:	Cromatografia de afinidade com múltiplas lectinas
MS:	Espectrometria de massas
Nm:	Nanômetros

PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoreto
PDB:	Protein Data Bank
pH:	Logaritmo negativo da concentração de íons de hidrogênio
SEC:	Cromatografia de exclusão molecular
SDS-PAGE:	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de docecil sulfato de sódio
TCA:	Ácido tricloroacético
TEMED:	N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina
TFA:	Ácido trifluoroacético
TOF:	Analisador por tempo de voo
TNF-α:	Fator de necrose tumoral α
TTR:	Transtirretina
UV:	Ultravioleta
V e Vh:	Volts e Volt hora
VML:	Lectina de Vatairea macrocarpa
W:	Whatts
w:v:	Peso:volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1	Lesões potencialmente malignas e câncer oral.....	19
3.2	A saliva como ferramenta diagnóstica.....	23
3.3	Proteômica e câncer de boca.....	26
3.3.1	<i>Proteômica aspectos globais</i>	26
3.3.2	<i>Proteômica de câncer oral – Análise salivar</i>	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	Caracterização da Amostra.....	32
4.1.1	<i>Crítérios de Inclusão</i>	33
4.1.2	<i>Crítérios de Exclusão</i>	33
4.2	Cálculo amostral.....	33
4.3	Aspectos Éticos.....	33
4.4	Processamento das amostras de saliva.....	34
4.4.1	<i>Obtenção e Estocagem</i>	34
4.4.2	<i>Precipitação de proteínas por Ácido tricloroacético (TCA)</i>	34
4.4.3	<i>Quantificação das Proteínas solúveis</i>	34
4.4.4	<i>Clean up das amostras de proteínas</i>	34
4.5	Imobilização de BTL em Sepharose 4B ativada por CNBr.....	35
4.6	Cromatografia das proteínas de saliva em coluna de BT imobilizada.....	35
4.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE).....	36
4.8	Eletroforese bidimensional 2D-E.....	36
4.8.1	<i>Análise de Imagem dos Géis Bidimensionais (7 cm)</i>	37
4.9	Digestão proteolítica dos spots e bandas <i>in gel</i>	37
4.10	Análise dos peptídeos por Espectrometria de Massa e Identificação de Proteínas....	38
4.11	Western Blot.....	39
4.12	Bioinformática.....	39
4.12.1	Docking molecular.....	39
4.12.2	Comparação estrutural de ZG16B e <i>Artin M</i>	41
4.13	Análise Estatística.....	41
5	RESULTADOS.....	42
5.1	Dados Demográficos e Clínico-Patológicos dos pacientes selecionados.....	42
5.2	Cromatografia de afinidade em coluna de BTL imobilizada.....	43
5.3	SDS-PAGE e identificação de proteínas por espectrometria de massas.....	43
5.4	A proteína ZG16B está aumentando no pool de saliva dos pacientes com CCE.....	47
5.5	Eletroforese bidimensional 2D-E dos pools de saliva dos pacientes com CCE, LO e controle.....	49
5.6	Docking molecular.....	52

5.7	A lectina de <i>Artin M</i> e a proteína ZG16B apresentam semelhança estrutural.....	54
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	77
	APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 2...	78

1 INTRODUÇÃO

Na busca de marcadores moleculares que auxiliem no diagnóstico precoce e no tratamento de várias doenças humanas, dentre elas o câncer, vários estudos têm focado em alterações nos genes, seus transcritos e produtos proteicos envolvidos em processos celulares importantes. As abordagens metodológicas recentes permitem uma análise ampla da expressão gênica que incluem a técnica de microarranjos de cDNA (De RISI et al., 1996), a análise da expressão gênica/SAGE (VELCULESCU et al., 1995) e as técnicas de sequenciamento em larga escala (FULLWOOD et al., 2009). O estudo da expressão gênica com tais técnicas permite obter um perfil molecular e fornecem oportunidades para identificação de importantes alterações que ocorrem no nível de RNA. Entretanto, a análise dos transcritos é prejudicada pela sua susceptibilidade à degradação e pela falta de concordância entre suas concentrações e a de proteínas (GYGI et al., 1999). Além disso, informações sobre processos que modulam a função e atividade proteica, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, transporte e degradação, são perdidas na análise de RNA (GSTAIGER et al., 2009). Por esse motivo, para entendimento dos mecanismos envolvidos em doenças humanas com consequentes benefícios para os pacientes, é importante que, em paralelo aos dados derivados do genoma e aos dados clínicos, sejam também obtidas informações sobre as diferenças proteicas entre tecidos e/ou fluidos corporais normais e alterados.

A expressão dos padrões de proteína em células e tecidos é característica do seu desenvolvimento, fisiologia ou estado patológico. Assim, é muito importante determinar os perfis de expressão destas proteínas e as alterações de um estágio não patológico para um estágio específico da doença (RIVERSOS, 2009). A proteômica está relacionada com o conjunto de tecnologias que tem por objetivos separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas (ISFOR et al., 2002).

Nos últimos anos, vários métodos de quantificação absoluta e relativa de proteínas em amostras avaliadas por espectrometria de massa (MS) têm sido desenvolvidos. Originalmente, a única plataforma disponível era o gel 2-DE, uma técnica que apesar das limitações permite avaliar algumas centenas ou milhares de spots proteicos (VALLEDOR et al., 2011). Entre todas as técnicas de proteoma de uso atual, uma das mais utilizada é a eletroforese bidimensional (2D-PAGE), acoplada a espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Muitas das técnicas empregadas em proteômica têm como foco a identificação de biomarcadores, mas são limitadas. A primeira, também denominado shotgun (AHRENS, et

al., 2010) inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão trípica de soluções proteicas complexas, seguida de análise por espectrometria de massas (MS). O top-down, ao contrário, é um processo no qual as proteínas intactas (e não os peptídeos) são submetidas à análise por MS. As abordagens bottom-up possuem muitas vantagens, como sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo para proteomas complexos como os de soro e lisados celulares. Entretanto, as respostas obtidas são fragmentos de um todo e, embora seja possível a identificação de uma proteína com base em alguns peptídeos, as modificações pós-traducionais não são reconhecidas. Além disso, um peptídeo pode ser perdido durante a cromatografia ou não gerar espectros de massas adequados. Por esse motivo, a proteômica top-down tem recebido recentemente grande atenção da comunidade científica. Mais recentemente, alguns métodos utilizam marcação de proteínas ou peptídeos por isótopos ou outros reagentes identificáveis por MS (GYGI et al., 1999; THOMPSON et al., 2003; ONG et al., 2002). Em resumo, duas amostras a serem comparadas são covalentemente modificadas por isótopos e as diferenças nas quantidades das proteínas são determinadas pela razão de intensidades.

Os tecidos afetados na maioria das doenças humanas não são de fácil acesso e dificilmente serão utilizados para análise de rotina. Uma de suas principais limitações é a heterogeneidade celular, que pode levar a resultados imprecisos se uma avaliação histopatológica detalhada não for realizada. Ao contrário, os fluidos corporais apresentam características que superam essas limitações e são adequados para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e prognósticas pouco ou menos invasivas. Além disso, são especialmente apropriados quando um monitoramento longitudinal é necessário (HU et al., 2006).

A saliva é um material biológico bem estudado por abordagens proteômicas. Composta de uma mistura de componentes secretados pelas glândulas salivares e derivados do sangue, ela é provavelmente o fluido mais acessível do nosso organismo (DAWES, 2008). É composta por 99% de água, 0,3% de proteínas e 0,2% de substâncias inorgânicas e orgânicas (LIU; DUAN, 2012). Os componentes inorgânicos mais prevalentes incluem: sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto e carbonatos, enquanto que os componentes orgânicos compreendem amilases, peroxidase, lipase, mucinas, lisozimas, lactoferrinas, calicreínas, cistatinas, hormônios e fatores de crescimento (CHIAPPINET al., 2007). No indivíduo saudável, a secreção salivar diária é entre 0,5 e 1,5 L. (MESE; MATSUO, 2007). Possui um importante papel na manutenção da saúde oral participando de processos como remineralização do esmalte dentário, defesa contra microorganismos, lubrificação, digestão,

modulação de pH e paladar (SUH et al., 2007; DAWES, 2008). O grande interesse na saliva como fluido para diagnóstico tem levado à padronização de processos de coleta e armazenamento (NAVAZESH, 1996) principalmente porque vários fatores afetam seu fluxo e composição. Entre esses fatores estão status fisiológico, medicação, alimentação, odores, ritmo circadiano, sexo, idade, a própria constituição do sangue e o grau de atividade das glândulas salivares (HARDT et al., 2005).

A análise proteômica salivar pode ser dificultada pela presença de proteínas de alta abundância que mascaram ou reduzem a sensibilidade de separação. Na saliva, essas proteínas incluem principalmente a alfa-amilase, mucina, albumina e prolina (75% do proteoma da saliva total). Essas proteínas podem impedir a detecção de proteínas de baixa abundância que possam servir como biomarcadores para determinadas doenças. Existem diversos métodos de remoção de proteínas de alta abundância como método de absorção enzima-substrato usado para remoção de alfa-amilase, imunodepleção e diversos tipos de colunas cromatográficas de afinidade, mas em geral são metodologias extremamente caras (KRIEF et al., 2012).

Como alternativa a essa questão vários pesquisadores tem investido esforços no desenvolvimento e aplicação de técnicas e metodologias para enriquecer amostras de proteínas em diversos tipos de fluidos corporais. As lectinas têm sido amplamente utilizadas em vários estudos glicoproteômicos, como a cromatografia, microarranjos (ZHAO et al., 2007) e técnicas de cromatografia de afinidade com múltiplas lectinas (M-LAC). Nesses estudos são usadas colunas cromatográficas de afinidade para capturar proteínas de baixa abundância ou remover glicoproteínas de alta abundância que possam eventualmente prejudicar a análise do proteoma (WANG; WU; HANCOCK, 2006).

Dessa forma os parâmetros de fluxo e composição salivar têm sido explorados no monitoramento de níveis de doenças, incluindo periodontite (HENSKENS et al., 1994), diabetes mellitus (ANIL et al., 1995) fibrose cística (MANDEL et al., 1967), síndrome de Sjögren (BEN-ARYEH et al., 1981), câncer de mama (STRECKFUS et al., 2000) e câncer oral (OHSHIRO et al., 2007; Winck et al., 2015). Em relação a esse último tipo de câncer, o sítio anatômico oferece à saliva uma importante vantagem em relação a outros fluidos, além da característica não invasiva e da compatibilidade com abordagens proteômicas, pelo fato de estar em contato com o tecido afetado e, portanto, de estar em contato com proteínas secretadas ou derivadas de células mortas, seu potencial vai desde a utilização para detecção em estágios iniciais (DE JONG et al., 2010) até predição de agressividade e prognóstico (WU et al., 2010).

Levando em consideração os fatos acima expostos, é de grande importância estudos que procurem identificar potenciais biomarcadores proteicos em saliva que possam diferenciar os pacientes com câncer oral de pacientes com lesões potencialmente malignas e de indivíduos saudáveis utilizando 2DE-PAGE e MS, abrindo perspectivas para o estabelecimento de metodologias que permitam de forma segura e menos invasiva o diagnóstico precoce dessa patologia, bem como monitoramento do tratamento, influenciando diretamente na sobrevivência do paciente e redução nos gastos em saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o perfil proteico da saliva de pacientes com lesões potencialmente malignas (leucoplasia oral) e carcinoma de células escamosas (CCE) de boca em relação a pacientes saudáveis (controle).

2.2 Objetivos específicos

- Remover a mucina de amostras de saliva utilizando uma coluna com lectina imobilizada;
- Comparar através da metodologia proposta pelo trabalho o proteoma salivar de pacientes saudáveis (sem neoplasias malignas), com leucoplasia oral (LO) e carcinoma de células escamosas (CCE) de cavidade oral de uma população no estado do Ceará;
- Validar a expressão do perfil de proteínas aumentadas ou diminuídas entre os grupos;
- Realizar ensaios sobre possíveis interações moleculares da(s) proteína(s) identificada(s).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Lesões potencialmente malignas e câncer oral.

As neoplasias malignas de cavidade oral constituem um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo. O tipo histológico de tumor maligno mais comum em cavidade

oral, presente entre 90 a 95% dos casos, é o Carcinoma de células escamosas (CCE), também chamado carcinoma epidermóide ou carcinoma espinocelular.

Os fatores de risco para o desenvolvimento do CCE intraoral são, principalmente, fumo associado ao consumo de bebidas alcoólicas (PETTI, 2009). Atualmente, têm-se relacionado também o vírus do papiloma humano (HPV), principalmente para indivíduos que não fazem uso de fumo e álcool (MARTIN-HERNAN et al., 2013).

Eventualmente pode ocorrer o aparecimento de lesões que precedem o surgimento de neoplasias malignas, denominadas de lesões potencialmente malignas. Estas podem permanecer silenciosas por um considerável período de tempo antes de evoluir, ou não, para malignidade e invasão. Cerca de 80% das neoplasias de cavidade oral são precedidas por lesões potencialmente malignas (LPM) (GUPTA, 1989). O percentual de LPM que sofrem transformação maligna pode variar de 0,13 a 36,4% (ARDUINO et al., 2009; HO et al., 2009; LUMERMAN; FREEDMAN; KERPEL, 1995; WARNAKULASURIYA et al., 2016). É de grande importância identificar mudanças no padrão dessas lesões que possam indicar a progressão destas para malignidade, possibilitando tratamento antes que esta transformação ocorra.

As principais lesões potencialmente malignas que acometem a região oral são a eritroplasia, queilose actínica e a leucoplasia oral (LO). A eritroplasia apresenta-se como uma placa eritematosa que não pode ser caracterizada como qualquer outra lesão e histologicamente apresenta a presença de atrofia epitelial e displasia. A queilose actínica é uma alteração causada em lábio associada a exposição solar que apresenta frequente transformação maligna e caracteriza-se, histologicamente, por hiperqueratose, acantose, atrofia epitelial, infiltrado inflamatório crônico, elastose solar e displasia (CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008).

A principal lesão potencialmente maligna que acomete a cavidade oral é a LO. A prevalência global de leucoplasia oral é estimada em 2,60% (intervalo de confiança de 95% 1,72-2,74%) (PETTI, 2003). Leucoplasia é definida como placa esbranquiçada que não pode ser caracterizada como qualquer outra lesão e apresenta-se, histologicamente, como área hiperqueratótica, com acantose, podendo ou não haver displasia (PRADO et al., 2010), sendo considerada potencialmente maligna quando esta última alteração está presente.

As causas da maioria das leucoplasias são o tabaco associado ao álcool e, mais recentemente, a infecção pelo HPV (SYRJANEN et al., 2011). De fato, taxas de transformação maligna de leucoplasia em pacientes não fumantes e etilistas são extremamente raras, entretanto sua história natural e o potencial de transformação maligna ainda

permanecem incertos (ARDUINO et al., 2013). Um dos maiores desafios enfrentados por especialistas em medicina oral é avaliar o status de risco e a real probabilidade dessa lesão evoluir para um CCE de cavidade oral (WARNAKULASURIYA et al., 2016).

Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2016, 11.140 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer da cavidade oral em homens é o quarto mais frequente na Região Sudeste (14,58/100 mil). Nas Regiões Nordeste (6,86/100 mil) e Centro-Oeste, ocupa a quinta posição (9,15/100 mil). Na Região Sul (15,91/100 mil), ocupa a sexta posição, e na Região Norte (3,46/100 mil) é o sétimo mais frequente. Para as mulheres, é o nono mais frequente na Região Nordeste (4,11/100 mil). Na Região Sudeste (5,29/100 mil), ocupa a décima posição. Nas Regiões Norte (1,76/100 mil) e Centro-Oeste (2,79/100 mil) é o 12º mais frequente e na Região Sul (3,32/100 mil) ocupa a 15ª posição (INCA, 2016).

Para o estado do Ceará, no ano de 2016 estimam-se 300 novos casos em homens e 240 novos casos em mulheres, já para capital Fortaleza os números são de 100 novos casos em indivíduos do sexo masculino e 60 novos casos no sexo feminino (INCA, 2016), sendo aproximadamente 95% dessas neoplasias representadas por CCE. Esse tumor representa uma neoplasia epitelial invasiva e agressiva, com graus variáveis de diferenciação escamosa e exibem propensão para desenvolvimento de metástases nodal precoce (CHRISTIAN, 2002).

A etiopatogenia do CCE oral está ligada, além da predisposição genética, a presença de múltiplos fatores carcinogênicos atuando sobre o epitélio normal, o que resulta em um processo de displasia, a qual se caracteriza pela presença de atipias celulares e perda da estratificação normal do tecido. Dentre os agentes carcinogênicos o fumo apresenta importante função na etiologia de tal patologia, visto que em sua composição há presença de substâncias carcinogênicas (alcatrão e nicotina), aumentando em duas vezes o risco para desenvolver tal neoplasia. Além disso, a associação entre fumo e etanol eleva em 141 vezes a possibilidade de desenvolvimento do CCE oral (GAETTI-JARDIM et al., 2010). Estudos recentes associam o HPV como fator de risco para CCE oral principalmente em pacientes mais jovens não etilistas/tabagistas (SYRJANEN et al., 2011).

O quadro clínico do CCE oral é variado podendo manifestar-se como lesões exofídicas, vegetantes, entretanto a forma mais clássica é uma lesão ulcerada persistente, normalmente com endurecimento e infiltração periférica e durante os estágios iniciais geralmente indolor. A língua é o sítio mais comum para o CCE bucal, correspondendo a 44% dos casos, seguido pelo assoalho bucal com 16%. O diagnóstico do CCE oral é realizado

através de exame clínico, seguido por uma biópsia da lesão com exame anatomopatológico. A tomografia computadorizada é realizada para avaliação da extensão do tumor e da presença de metástases em nódulos cervicais (SASSI et al., 2010).

O tratamento do câncer de boca pode ser cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico ou combinações entre estes métodos. Quando uma lesão maligna é diagnosticada em sua fase inicial, ou seja, menor que 2 cm de extensão e sem comprometimento linfonodal, o tratamento cirúrgico local será provavelmente suficiente para curar o paciente. Entretanto, se o diagnóstico não é feito no início, a extensão local certamente ocorrerá, podendo então haver invasão dos linfonodos regionais. Isto altera o estadiamento do câncer e o tratamento deverá incluir radioterapia e em alguns casos, quimioterapia (BRENER et al., 2007).

A sobrevida do CCE de cavidade oral é baixa, variando de 30-57% para sobrevida global, e 43-60% para sobrevida específica para a doença em 5 anos, segundo diferentes estudos. As perspectivas de recuperação são muito mais favoráveis (cerca de 70%) se o tumor é detectado em um estágio inicial (T1/T2). A taxa de sobrevida em 5 anos para pacientes cujos cânceres são descobertos mais tarde (T3/T4) é de 43%, ressaltando a importância do diagnóstico precoce (AFONSO et al., 2015) reforçando a necessidade da descoberta de modos mais sensíveis de diagnósticos moleculares que possam inclusive preceder o aparecimento de lesões detectáveis (HA et al., 2009).

Na maioria dos estudos, os CCE de cabeça e pescoço são considerados como um tipo tumoral único, entretanto tais carcinomas podem se comportar de maneira diferenciada de acordo com as diferentes localizações na região de cabeça e pescoço. Isso se reflete nos diversos padrões de crescimento, comportamento clínico e prognóstico. A variabilidade de comportamento conforme a localização sugere propriedades tumorais intrínsecas distintas. Não obstante, circunstâncias relacionadas à anatomia local também são responsáveis por essas diferenças. Rodrigo e colaboradores, em 2001, demonstraram haver variabilidade das alterações genéticas em diferentes sítios da cabeça e pescoço, através de análise de aneuploidia e perda de heterozigosidade. Além disso, um grupo de pesquisadores, ao estudar o câncer de boca em duas localizações diferentes – língua (HE et al., 2004) e mucosa jugal (CHEN et al., 2004), utilizando a mesma metodologia de análise do proteoma através da espectrometria de massas por MALDI-TOF, encontraram diferentes proteínas com expressão aumentada ou diminuída, indicando diferentes perfis proteicos.

Recentemente, métodos de proteômica, como a eletroforese de gel 2D e espectrometria de massas têm sido usados para estabelecer o proteoma da saliva. A análise de

múltiplos biomarcadores pode estabelecer padrões possivelmente associados ao diagnóstico, prognóstico da doença e a localização do tumor (MASSANO et al., 2006).

3.2 A saliva como ferramenta diagnóstica

A saliva é um fluido claro, ligeiramente ácido (pH = 6,0-7,0) e complexo composto por secreções das glândulas salivares maiores: parótidas, submandibulares e sublinguais, bem como milhares de glândulas menores (labiais, bucais, linguais e palatais), fluido crevicular gengival, debris celulares, secreções brônquicas e nasais, células de revestimento, sangue e substâncias exógenas. Em geral, as glândulas salivares humanas produzem cerca de 1-1,5 litros de saliva por dia (LEE: WONG, 2009). Sua composição é uma mistura de componentes e é provavelmente o fluido mais acessível do nosso organismo. Possui um importante papel na manutenção da saúde oral participando de processos como remineralização do esmalte dentário, defesa contra micro-organismos, lubrificação, digestão, modulação de pH e paladar, mantendo assim o equilíbrio do ecossistema da cavidade oral. (DAWES, 2008). Esses atributos são decorrentes das características de seus componentes, que incluem proteínas, hormônios, pequenas moléculas como ureia, e eletrólitos como cálcio, bicarbonato, fosfato e fluoreto (DAWES, 2008). As proteínas salivares têm sido estudadas por técnicas bioquímicas tradicionais e proteômicas e centenas delas já foram identificadas tanto na saliva total como em secreções de glândulas individuais, embora aquelas expressas em baixos níveis certamente não foram ainda detectadas (MUSUMECI et al., 1993).

Há muitas vantagens no uso da saliva como um fluido biológico. Sua coleta é rápida, fácil, barata e não invasiva. É adequada para coleta domiciliar (sem a necessidade de pessoal qualificado), bem como para pesquisas epidemiológicas. É fácil de armazenar e transportar, não coagula e pode refletir o estado fisiológico e/ou patológico atual de um indivíduo (BUCZKO; ZALEWSKA; SZARMACH, 2015).

Há um interesse crescente em todo o mundo pela análise da saliva através de genômica, transcriptômica e proteômica, já que essa é uma fonte não invasiva de rica informação genética. No caso da saliva, dois aspectos principais do diagnóstico do câncer devem ser diferenciados – sendo um o diagnóstico do câncer de boca (que tem contato direto com a saliva) e outro o diagnóstico do câncer em outras localizações. O câncer de boca em estágio avançado geralmente pode ser detectado pela inspeção da cavidade oral. Por outro lado, os carcinomas orais iniciais não são visíveis facilmente e podem não ser diagnosticados precocemente e tratados a tempo. O proteoma salivar também pode ser usado para a detecção do tumor (FABIAN et al., 2008).

Os biomarcadores foram usados primariamente como indicadores prognósticos para os pacientes com tumores de cabeça e pescoço. Mais recentemente, o papel dos biomarcadores tem sido grandemente expandido para abranger todos os aspectos do cuidado ao paciente, desde o diagnóstico precoce do câncer até o estadiamento mais preciso do tumor e mesmo a seleção daqueles pacientes mais propensos a se beneficiar de terapias específicas, até o monitoramento tumoral pós-tratamento (KACZOR-URBANOWICZ et al., 2017).

Proteínas detectadas na saliva como o antígeno carcinoembriogênico (CEA), defensina-1, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina – 1(IL-1), 6, 8 e o antígeno CD44 demonstraram aumento em sua detecção em pacientes com câncer de boca. A maioria desses estudos se baseou em ensaios imunológicos de produtos gênicos individuais (ARELLANO-GARCIA et al., 2008; JOHN et al., 2004). Espera-se que os biomarcadores proteômicos, quando combinados, aumentem a sensibilidade e especificidade da detecção do câncer humano (HU; LOO; WONG, 2006).

Níveis salivares aumentados de defensina-1, antígeno cancerígeno CA 15-3, proteínas marcadoras tumorais, como c-erb-2 ou CA-125, anticorpos contra a proteína supressora de tumor p53, α -1-antitripsina (AAT), hepatoglobina (HAP), C3 do complemento, hemopexina e transtirretina parecem marcadores promissores do câncer de boca e de outros neoplasmas malignos. No futuro, um perfil proteômico global da saliva com métodos de análise do proteoma recém-desenvolvidos provavelmente resultará em outras sequências de peptídeos candidatos para detecção com alta sensibilidade (HU; LOO; WONG, 2006; FABIAN; FEJERDY; CSERMELY, 2008; JESSIE et al., 2013). Outras proteínas parecem estar presentes apenas na saliva de pacientes com CCE de cabeça e pescoço como α -1-B-glycoproteína e o fator B do complemento (OSHIRO et al., 2007).

Marcadores protéicos na saliva foram bem demonstrados para o diagnóstico da Síndrome de Sjogren. Recentemente, marcadores salivares da parótida foram descobertos para essa doença usando SELDI-TOF-MS e gel 2D DIGE, contudo, as proteínas encontradas como candidatas a biomarcador permanecem por ser validadas, assim como para o líquen plano oral (YANG, 2006), para o monitoramento de níveis de hormônio (LU et al., 1997) e drogas (MASEDA et al., 1986), exposição a poluentes ambientais (GONZALEZ et al., 1997) e infecciosos (LI et al., 1996) e monitoramento de doenças, incluindo periodontite (HENSKENS et al., 1994), diabetes mellitus (ANIL et al., 1995), fibrose cística (MANDEL et al., 1967), câncer de mama (STRECKFUS et al., 2000) e ovário (CHEN; SCHWARTZ; LI, 1990). Estudos atuais com eletroforese e proteômica mostram que na análise da saliva normal

há pouca diversidade em termos de variedade e uma alta complexidade em termos de número de manchas (spots) de proteínas, sendo dois terços das manchas identificadas como amilases, cistatinas e imunoglobulinas (HIRTZ et al., 2005), o que eventualmente pode prejudicar a análise de proteínas salivares, proteínas de alta abundância podem mascarar ou reduzir a sensibilidade de separação e detecção de proteínas de baixo peso molecular ou que estejam presentes em pequenas quantidades (KACZOR-URBANOWICZ et al., 2017).

Alguns estudos de proteômica salivar como ferramenta diagnóstica pontuam como uma das principais dificuldades o fato que muitos analitos informativos estão geralmente presentes em quantidades menores nos fluídos orais, e que o perfil proteico da saliva é dominado por um subgrupo de proteínas abundantes, principalmente α -amilases salivares, albuminas, mucinas e imunoglobulinas que compõem aproximadamente 75% do proteoma total e mascaram potenciais biomarcadores de baixa abundância, esses autores defendem que a remoção dessas proteínas melhora a detecção de potenciais biomarcadores expressos em pequena quantidade (KRIEF et al., 2012).

Existem diversos métodos de remoção de proteínas de alta abundância como método de absorção enzima-substrato usado para remoção de alfa-amilase (KRIEF et al., 2012), imunodepleção e diversos tipos de colunas cromatográficas de afinidade, entretanto em geral são metodologias de alto custo (KRIEF et al., 2012).

As lectinas têm sido amplamente utilizadas em vários estudos glicoproteômicos, como a cromatografia microaaranjos (ZHAO et al., 2007) e técnicas de cromatografia de afinidade com múltiplas lectinas (M-LAC). Nesses estudos são usadas colunas cromatográficas de afinidade para capturar proteínas de baixa abundância ou remover glicoproteínas de alta abundância que possam eventualmente prejudicar a análise do proteoma (WANG; WU; HANCOCK, 2006).

As lectinas são uma classe estrutural diversa de proteínas, possuindo como característica comum a capacidade de se ligar especificamente e reversivelmente a carboidratos e, eventualmente, aglutinar células (SHARON; LIS, 2004; NASCIMENTO et al., 2016). São isoladas de fontes distintas, como vírus, bactérias, fungos, algas, animais e plantas, elas mostram especificidade para carboidratos distintos, como manose, ácido siálico, fucose, N-acetilglucosamina, galactose / Nacetilgalactosamina, glicanos complexos e glicoproteínas. As lectinas podem reconhecer carboidratos e glicoconjugados em células, seções de tecidos e fluidos biológicos, sendo ferramentas valiosas em biotecnologia, incluindo diagnóstico e aplicações farmacológicas e terapêuticas (HASSAN et al., 2015).

Pela propriedade intrínseca de reconhecerem carboidratos ou glicoconjugados, as lectinas são hoje uma das principais fontes usadas na fabricação de ferramentas como microarrays, biosensores, biomarcadores e suportes para cromatografia de afinidade (DAN et al., 2016). A cromatografia por afinidade de lectina destaca-se como uma técnica poderosa e eficaz para isolar glicoproteínas, graças a bioesletividade da lectina para determinados glicoconjugados. A recuperação subsequente da molécula adsorvida ocorre através da eluição por adição de um competidor ou alterações no valor do pH ou força iônica do meio cromatográfico (COELHO et al., 2012) e tem sido útil para remoção de proteínas de alta abundância em fluídos biológicos diversos tais como soro bovino, colostro humano, clara de ovo de galinha e plasma sanguíneo humano (THIAGO et al, 2013) e portanto podem ser ferramentas úteis para remoção de proteínas de alta abundância também em fluídos orais já que muitas dessas proteínas também estão presentes em grande quantidade na saliva (KACZOR-URBANOWICZ et al., 2017).

A lectina isolada da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* (BTL) tem afinidade pela mucina inclusive com os padrões de ligação já estabelecidos, o que a torna uma potencial ferramenta para remoção desta glicoproteína da saliva através da construção de uma coluna cromatográfica de afinidade (AINONZ et al., 1995).

Em paralelo vários outros estudos de proteômica salivar não utilizam nenhuma abordagem para remoção de proteínas de grande abundância (De JONG et al., 2010; JESSIE et al., 2013) e alguns deles utilizam outras estratégias de melhoramento das amostras como o clean-up (KANSHIN; THIBAUT, 2014), mostrando que tais técnicas para remoção de proteínas presentes em grande quantidade melhoram a amostra, entretanto a não utilização delas parece não inviabilizar a análise salivar (JESSIE et al., 2013).

Quando comparado ao sangue e outros fluídos biológicos, a saliva pode expressar marcadores mais sensíveis e específicos para certas doenças da cavidade oral. A saliva contém proteínas expressas localmente distintas do soro que podem ser melhores indicadores de alterações bucais. Há razões convincentes para usar a saliva como fluido diagnóstico para monitorar o início e a progressão do câncer de boca. A saliva é o fluído que está em contato direto com as lesões e observa-se nela o aumento do RNA e das proteínas associadas ao câncer de cavidade oral (WU et al., 2010).

3.3 Proteômica e câncer de boca

3.3.1 Proteômica aspectos globais

O termo proteoma foi usado pela primeira vez em 1995, tendo sido descrito como o conjunto de proteínas expressas por um genoma, uma célula ou um tecido (WASINGER et al., 1995). Nesse sentido a proteômica já existe desde o final da década de 1970 quando cientistas iniciaram a formação de bancos de dados de proteínas utilizando a então recentemente desenvolvida técnica de eletroforese de gel bidimensional (O'FARRELL, 1975). Isso culminou na catalogação exaustiva de manchas (spots) nos géis bidimensionais para se criar bancos de dados das proteínas expressas. Atualmente, existem algumas outras definições para o termo proteoma, uma delas afirma que o termo se refere a análise sistemática de proteínas e suas características, quantidades e funções. A evolução da biotecnologia contribuiu para que o proteoma deixasse de ser uma análise isolada de química de proteínas para que se tornasse uma tecnologia de larga escala que pode ser aplicada às diversas áreas de pesquisas clínicas e biomédicas. A aplicação moderna da espectrometria de massas para identificação de sequências peptídicas fez com que a tecnologia de proteoma tenha se tornado a melhor maneira de analisar a expressão gênica, confrontando-a com a tecnologia dos microarranjos de DNA e RNA (BISH, 2004).

A importância de se analisar as proteínas reside no fato de que elas desempenham funções finais tanto fisiológicas quanto patológicas nas células, além disso, estão sujeitas às modificações pós-traducionais, as quais vão influenciar o enovelamento correto para formação da estrutura tridimensional, a localização, a interação com outras proteínas, formando a estrutura quaternária extremamente importante para se tornarem funcionais. A taxa de transcrição, medida através de RNA mensageiro, nem sempre tem uma relação direta com a atividade biológica da proteína ou das proteínas (no caso de haver clivagem), sua função ou quantidade (BISH, 2004).

A proteômica é uma das metodologias mais significativas para compreender a função do gene, embora seja muito mais complexa do que genômica. Flutuações no nível de expressão gênica podem ser determinadas pela análise do transcriptoma ou proteoma para discriminar entre dois ou mais estados biológicos da célula. Os ensaios de microarranjo foram desenvolvidos para análise em larga escala do transcriptoma inteiro, entretanto, o aumento da síntese de mRNA não pode ser medido diretamente pela técnica. As proteínas são efetoras da função biológica e seus níveis não dependem apenas dos níveis correspondentes de mRNA, mas também do controle e regulação da tradução do hospedeiro. Assim, a proteômica seria considerada o conjunto de dados mais relevante para caracterizar um sistema biológico (COX; MANN, 2007). As técnicas convencionais para purificação de proteínas são as cromatografias, tais como cromatografia de troca iônica (IEC), cromatografia de exclusão

(SEC) e cromatografia de afinidade. Para análise de proteínas seletivas, podem ser utilizados ensaios imunoabsorventes ligados a enzimas (ELISA) e western blotting. As técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), eletroforese em gel bidimensional (2D) e eletroforese em gel diferencial bidimensional (2D-DIGE) são usadas para separação de amostras de proteínas complexas (ASLAM et al., 2017)

Dentre as abordagens mais utilizadas de separação de proteínas estão as separações em gel, tanto unidimensional (SDS-PAGE) quanto bidimensional (2D). Na separação bidimensional a primeira dimensão separa as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (focalização isoelétrica); e na segunda dimensão as proteínas são separadas com base em seus pesos moleculares. Um passo muito importante para a reprodutibilidade e resolução dos géis 2D foi dado quando foi introduzido o gradiente imobilizado de pH (IPG), em que o gel com o gradiente de pH fica imobilizado sobre uma fita de plástico. Atualmente, as fitas IPG estão disponíveis comercialmente. Os géis 2D podem ser corados de várias maneiras, sendo as mais comuns a coloração com azul de Coomassie ou a impregnação com prata. A quantificação pode ser feita através da medida de intensidade da mancha no gel com programas computacionais específicos (BJELLQVIST et al., 1982).

Uma vez identificada um spot no gel 2D de interesse para estudo, essa mancha pode ser excisada e a proteína pode ser digerida com tripsina no gel. A tripsina cliva as ligações peptídicas carboxi terminal nos resíduos de lisina e arginina gerando assim um conjunto de peptídeos característicos de cada proteína. Esses peptídeos resultantes podem ser identificados através de espectrometria de massas, geralmente aplicando-se a metodologia de ionização por dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight), MALDI-TOF. Nesta técnica, os peptídeos são dissolvidos numa solução que seca e cristaliza (matriz) e que é capaz de absorver radiação ultra-violeta. Pulsos dessa radiação fazem com que os peptídeos presos na matriz sejam ionizados, dessorvidos da matriz e acelerados por um campo eletromagnético o qual vai separá-los de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). O analisador de massas detecta o tempo de voo (TOF) dos peptídeos, que é proporcional a sua massa. O resultado da análise é um gráfico ou mapa peptídico (fingerprinting), expresso em relação as suas razões de m/z , que quando comparado com banco de dados disponíveis na internet, fornece dados sobre a identificação e modificações pós-traducionais (fosforilação, glicosilação, acetilação, nitrosilação, ubiquitinação, farnesilação, sulfatação) da proteína em questão. O MALDI-TOF-TOF pode ser considerado uma evolução e realiza a análise em série (in tandem) dos peptídeos, possibilitando o sequenciamento da proteína em questão (ISSAQ; VEENSTRA, 2008).

A proteômica tem demonstrado resultados promissores na busca por biomarcadores e os padrões detectados e as proteínas identificadas podem ser usados para caracterizar os tumores, assim como prover novos achados em relação aos mecanismos envolvidos na patogênese de várias doenças. Contudo, ainda são esperados avanços principalmente na área de bioinformática para melhor compreensão dos dados gerados nos estudos de proteômica, o que poderá permitir o diagnóstico precoce, resposta à terapia e recorrência por um simples exame de sangue ou análise da saliva (HA et al., 2009).

3.3.2 Proteômica de câncer oral – Análise salivar

Em resposta ao apelo para a detecção precoce do câncer, vários meios de diagnóstico têm sido desenvolvidos, ou atualmente estão em desenvolvimento, incluindo o uso de constituintes que refletem o estado fisiológico ou patológico do corpo humano e, portanto, podem ser utilizados para fins de diagnóstico (WONG, 2006). A procura de biomarcadores salivares para a detecção precoce do CCE tem se desenvolvido rapidamente, estimulado pelo fato de que a coleta de saliva é relativamente fácil e não-invasiva, em comparação com o sangue. A partir do final da década de 1990 até o presente, mais de 40 estudos de investigação foram publicados e diversas proteínas salivares diferentes têm sido sugeridas como potenciais biomarcadores para o carcinoma de células escamosas (CHENG; REES; WRIGHT, 2014).

Um estudo em 2013, detectou níveis aumentados das proteínas AAT (alfa 1 antitripsina), HAP (haptoglobina), fator C3 do complemento, hemopexina e transtirretina em saliva pacientes com CCE de cavidade oral. A metodologia empregada para detecção das proteínas foi a separação por eletroforese 2D seguida de espectrometria de massas, para isso foram coletadas saliva total não estimulada de pacientes saudáveis, sem história de doenças crônicas (n=20) e pacientes diagnosticados com CCE de cavidade oral (n=20). A validação do aumento dos níveis das proteínas na saliva foi confirmada por ELISA e imunohistoquímica dos tecidos tumorais coletados dos pacientes (JESSIE et al., 2013). Algumas proteínas ainda parecem estar presentes apenas em pacientes portadores de CCE de cabeça e pescoço, com o caso da α -1- β glicoproteína e fator B do complemento de acordo com uma pesquisa realizada na universidade do Texas (OSHIRO et al., 2007). Outro estudo conseguiu apontar um painel com cinco candidatos a biomarcadores salivares protéicos: Proteína de ligação a Mac-2 (M2BP), proteína ligante de cálcio (MRP-14), proteína reguladora do complemento (CD59), catalase e profilina para o CCE de cavidade oral com 90% de sensibilidade e 83% de especificidade (HU et al., 2008).

De fato o aumento dos níveis de diversas proteínas salivares em pacientes portadores de neoplasias malignas em cavidade oral tem sido relatado na literatura nos últimos anos (tabela 1), confirmando o potencial biotecnológico deste fluido na busca de biomarcadores que possam auxiliar não só no diagnóstico precoce, mas também no monitoramento, resposta a terapia e compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença.

Tabela 1 - Potenciais biomarcadores salivares para detecção de câncer oral (adaptado de CHENG; REES; WRIGHT, 2014).

<i>Biomolécula</i>	<i>Potencial biomarcador</i>	<i>Autores – Ano</i>
<i>Peptídeo</i>	Defensina-1	Mizukawa et al./1998
<i>Proteínas</i>	P53	Warnakulasuriya et al./2000
	α-amilase	Chen et al./2002
	IL-8	St. John et al./2004; Rhodus et al./2005; Arellano-Garcia et al./2008
	TNF-α	Rhodus et al./2005
	IL-1	Rhodus et al./2005
	IL-6	Rhodus et al./2005; Katakura et al./2007; Saheb-Jamee et al./2008
	Fator de crescimento de fibroblasto beta (FGF-β)	Vucicevic et al./2005; Gorugantula et al./2012
	Statherin	Contucci et al./2005
	Cyfra 21.1 e TPA	Nagler et al./2006
	Antígeno cancerígeno 125 (CA125)	Nagler et al./2006; Balan et al./2012
	Endotelina-1	Pickering et al./2007; Cheng et al./2011
	Interleucina-1-beta (IL-1β)	Katakura et al./2007; Brinkmann et al./2011; Elashoff et al./2012
	Transferrina	Jou et al./2010
	AAT, HAP, fator C3 do complemento, hemopexina e transtirretina	Jessie et al./2013
	CD44	Franzmann et al./2007

Alguns estudos detectam também a diminuição de algumas proteínas no câncer oral, Yang e colaboradores em 2014 relataram a diminuição dos níveis de SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) tanto no carcinoma espinocelular quanto nas lesões potencialmente malignas. A proteína em questão impede a transcrição de NF-kB um fator de transcrição envolvido na produção de citocinas inflamatórias. Outro fato importante é o trabalho levar em consideração a análise das LPM (lesões potencialmente malignas), pois a

busca de biomarcadores nessa condição pode permitir o diagnóstico de lesões antes do aparecimento da neoplasia maligna (YANG et al., 2014).

Um recente trabalho mostrou que as proteínas salivares diferencialmente expressas no CCE oral e em pacientes normais podem estar relacionadas a respostas imunes humorais, que por sua vez podem ser importantes para o desenvolvimento e progressão do tumor. O trabalho também mostrou que o proteoma salivar detectou a presença de proteínas com funções relacionadas a resposta inflamatória, transporte de metais, crescimento e proliferação celular. A proteína PPIA (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A) menos abundante na saliva dos pacientes com CEC é a proteína candidata prognóstica de melhor desempenho. Estudos anteriores sugerem que a PPIA desempenha um papel importante em vários mecanismos, incluindo o folding de proteínas e ativação de células T (WINK et al., 2015).

Apesar de inúmeros trabalhos na literatura nos últimos 15 anos terem identificado várias proteínas ou grupo de proteínas que parecem aumentadas ou diminuídas no câncer oral, muitos desses candidatos a biomarcadores ainda precisam ser validados (tabela 2) em estudos clínicos populacionais com uma amostragem robusta (DAHIYA; DHANKHAR, 2016).

Tabela 2 - Comparação de diferentes biomarcadores para carcinoma espinocelular oral (adaptado de DAHIYA; DHANKHAR, 2016).

Biomarcador	Mecanismo	Fonte	Papel	Limitações
Receptores de quimiocinas	Expressão diminuída em tecido tumoral	Biópsia	Metástese e prognóstico	Validação clínica necessária
HPV	Aumento de oncoproteínas	Tecido tumoral	Diagnóstico e prognóstico	Baixa sensibilidade e especificidade
Marcadores de metilação	Inativação do gene seguida de hipermetilação em região promotora	Saliva e soro	Diagnóstico precoce	Baixa sensibilidade e especificidade/metodologia complexa
Metaloproteinases	Crescimento tumoral, degradam matriz extracelular promovendo migração tumoral	Tecido tumoral/Saliva	Diagnóstico precoce	Baixa especificidade
Interleucinas	Crescimento tumoral e metástase	Tecido tumoral, sobrenadante de células, saliva e soro	Diagnóstico precoce	Baixa sensibilidade e especificidade
Micro RNAs	Regulação da expressão gênica	Tecido tumoral e saliva	Diagnóstico precoce, prognóstico e terapia alvo	Validação clínica necessária

Gene associado ao melanoma (MAGE)	Supressão da apoptose	Saliva e biópsia	Prognóstico e terapia alvo	Validação clínica necessária
Centrossomos	Mutação devido a hiperamplificação	Tecido tumoral	Diagnóstico precoce	Compreensão do mecanismo molecular
Actina e miosina	Metástase	Tecido tumoral e saliva	Diagnóstico precoce	Baixa sensibilidade e especificidade
Citoqueratinas	Progressão tumoral	Tecido tumoral, saliva e soro	Diagnóstico precoce e prognóstico	Validação clínica necessária
p53	Apoptose e reparo de DNA	Tecido tumoral	Diagnóstico e prognóstico	Mecanismo em câncer oral não completamente esclarecido
Fator de tradução eucariótica 4E (eIF4E)	transformação de fibroblastos e células epiteliais	Tecido tumoral	Prognóstico	Baixa sensibilidade e especificidade

Outros entraves apontados nos estudos como a falta de padronização para a coleta de amostras de saliva, processamento, e armazenagem, grande variabilidade nos níveis de potenciais biomarcadores salivares em indivíduos saudáveis e pacientes com tumores, indivíduos com doença inflamatória crônica oral ou outros tipos de cânceres, podem apresentar níveis aumentados de algumas das proteínas envolvidas no processo de carcinogênese oral podendo gerar diagnósticos falso-positivos. Portanto mais estudos são necessários neste campo de investigação para apontar uma eventual padronização, além de pesquisas especialmente sobre variação biológica individual e populacional e alterações fisiológicas que possam afetar os potenciais biomarcadores protéicos salivares de câncer bucal (CHENG; REES; WRIGHT, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da Amostra

Trata-se de um estudo observacional e quantitativo, utilizando saliva coletada a partir de janeiro 2015 até dezembro de 2015.

Os casos de CCE de cavidade oral, lesões potencialmente malignas (leucoplasia oral) e controle (pacientes normossistêmicos) foram selecionados dentre os pacientes que procuraram a clínica de estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, Campus Fortaleza, que após esclarecimento, aceitaram participar do estudo. Destes pacientes, foram coletadas amostras de saliva.

4.1.1 Critérios de Inclusão

Com finalidade de tornar o grupo de portadores de CCE homogêneo, foram incluídos no estudo:

1. Pacientes de ambos os sexos, acima de 40 anos.
2. Pacientes com tumor primário de CCE de cavidade oral e LO com diagnóstico confirmado por exame anátomo-patológico.

4.1.2 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão constaram de:

- 1- Pacientes que apresentassem síndromes genéticas.
- 2- Pacientes com deficiência mental.
- 3- Pacientes com doenças de deficiência imunológica e inflamatória crônica.

4.2 Cálculo amostral

Baseado na diferença entre as médias da proteína de TTR observada por pacientes saudáveis (0.4 ± 0.01) ou com CEC oral (1.0 ± 0.2) observado por JESSIE et al., 2013, se faz necessário avaliar um *pool* de 5 pacientes por grupo (CCE, LO e controle) de estudo afim de obter um perfil de proteômica salivar que rejeite a hipótese de nulidade, tendo como base um poder de 90% e uma confiança de 95%.

4.3 Aspectos Éticos

Antes de iniciar a coleta, todos os pacientes envolvidos na pesquisa foram esclarecidos acerca da possibilidade de aceitar ou não a participação no estudo, sem prejuízo a seu tratamento. Os que concordaram participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXOS 1 E 2).

Todos os procedimentos da pesquisa foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinque e do Código de Nuremberg, obedecidas as Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 466/12) do Conselho Nacional de Saúde, respeitando as normas éticas e os direitos dos pacientes. Os dados foram coletados após o consentimento dos pacientes e assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido.

Esse projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal do Ceará e aprovado com o número de parecer 888.612.

4.4 Processamento das amostras de saliva

4.4.1 Obtenção e Estocagem

As amostras de saliva total não estimulada foram coletadas entre 9 e 10 horas da manhã. Os doadores foram orientados a não se alimentar, fumar, beber água, ingerir medicação e escovar os dentes pelo menos uma hora antes do procedimento. Foi solicitado ao participante que recolhesse a saliva produzida durante o período de cinco minutos num recipiente estéril descartável cedido pelo examinador e mantida em gelo até o processamento. No laboratório, foi adicionado à saliva inibidores de protease (PMSF 0,1 mg/mL e EDTA 0,5M e 20µl de Protease Inhibitor Cocktail por ml de saliva) para minimizar a degradação proteica e, em seguida, a mesma foi centrifugada a 13.000 x g por 15 minutos à 4o C. O precipitado foi separado e o sobrenadante coletado e estocado a -80 °C, até que toda a amostra estivesse pronta para análise.

4.4.2 Precipitação de proteínas por Ácido tricloroacético (TCA)

As amostras de saliva foram submetidas a precipitação de proteínas pelo método de TCA em acetona (-20 °C), com adição de DTT 0,12% na amostra, com volume (5:1). As amostras foram deixadas em repouso durante a noite (*overnight*) a -20 °C e depois submetidas à centrifugação a 13.000 x g por 15 minutos à 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µl de acetona 90% + DTT 0,2% (-20 °C) por duas vezes. Após a precipitação proteica, as amostras foram ressuspensas em 500 µl de solução de uréia 7M e tiouréia 2M. Antes do uso das amostras, foi preparado um pool de saliva de 5 doadores de cada grupo com a mesma concentração de proteínas por µl de saliva. Após obtenção dos 3 pools, foi feita nova dosagem de proteínas e os três pools foram novamente deixados na mesma concentração de proteínas por µl de saliva.

4.4.3 Quantificação das Proteínas Solúveis

Uma alíquota do sobrenadante de cada amostra e de cada *pool* foi retirada para quantificação solúveis totais através do método de Bradford utilizando o kit DC Assay Protein Bio-Rad (CAT# 500-0116) em triplicata. BSA foi utilizada como proteína padrão e a análise espectrofotométrica foi feita à 595 nm (BRADFORD, 1976). A concentração final de cada *pool* foi de 0,76µg/µl. As amostras foram ressuspensas em uréia 7M e tiouréia 2M.

4.4.4 Clean up das amostras de proteínas

Para eliminar ou reduzir contaminantes da amostra proteica foi realizado um procedimento de limpeza (clean up) dos pools de saliva utilizando o 2-D Clean-Up Kit GE Healthcare, 80-6484-51. Para isso, foi adicionado 300µl de solução precipitante para cada 100µl de amostra, seguido de mistura da amostra com auxílio de vortex e incubação em gelo por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 300 µl de solução coprecipitante e o material centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos a 40C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 40 µl do coprecipitante, seguido de incubação em gelo por 5 minutos. Em seguida a amostra foi centrifugada na mesma condição descrita anteriormente e descartado o sobrenadante. Ao pellet foi adicionado 25µl de água MilliQ, 1ml de acetona gelada e 5µl do *wash aditive* sendo as amostras misturadas com auxílio de vortex em períodos cíclicos de 20 a 30 segundos por um total de 30 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet seco por 5 minutos. Ao final, os pellets foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,6.

4.5 Imobilização de BTL em Sepharose 4B ativada por CNBr

Matriz de de Sepharose 4B (Sigma Aldrich) ativado por brometo de cianogénio foi lavada utilizando uma solução fria de HCl 1 mM. O gel foi então filtrado e lavado com água destilada. O filtrado foi transferido para uma solução de NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3, com NaCl 0,5 M em que foi adicionado a lectina de BTL (20mg) e colocado sob agitação suave durante 2 horas. A suspensão resultante foi lavada com 3 ciclos de acetato de sódio a 0,1 M, pH 4,0, com NaCl a 0,5 M, seguido por Tris-HCl a 0,1 M, pH 8,0, com NaCl a 0,5 M. A capacidade da matriz BT - Sepharose 4B para reter glicoproteínas foi testada aplicando uma solução de fetuína (2 mg / mL) na matriz BT-sepharose previamente equilibrada com Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,5 M. A fetuína retida foi eluída utilizando uma solução de acetato de sódio a 0,1 M, pH 4,0, com NaCl a 0,5 M. A eficiência de ligação foi calculada pela diferença de absorbância (280 nm) entre a amostra de fetuína aplicada e a retida. As frações eluídas foram monitorizadas com um espectofotômetro a uma absorbância de 280 nm.

4.6 Cromatografia das proteínas de saliva em coluna de BT-Sepharose 4B

Para a remoção da glicoproteína mucina das amostras de proteoma de saliva foi realizada uma cromatografia de afinidade em coluna de lectina BTL imobilizada. O extrato foi preparado por precipitação da fração proteica 0-100% com sulfato de amônio, dialisado

contra água destilada por 6 trocas, sendo a última troca realizada em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,6 contendo NaCl 0,5 M. O extrato foi, então, centrifugado a 9000 x g por 20 min a 4 °C e aplicado na proporção de 1:3 em relação ao volume da coluna, que tinha sido previamente lavada com água miliQ e equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,6. O pico não retido (P1) foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio e o pico retido (P2) foi eluído com acetato 0,1 M pH 4,0. Foram coletadas frações de 0,5 mL e a leitura das frações eluídas foi monitorada na absorbância de 280 nm. Após a cromatografia, foi realizada a quantificação das proteínas solúveis de P1 e P2 através do método de Bradford, assim como uma SDS-PAGE para avaliação da remoção da mucina.

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE)

Foram preparados géis de SDS-PAGE a 12% para verificação da qualidade das proteínas das amostras de saliva e identificação destas por espectrometria de massa. Para isso, foram preparadas soluções, gel de empilhamento e o gel de resolução de acordo com o protocolo de Laemmli. A montagem do gel foi feita no sistema Mini-PROTEAN da BIO-RAD, onde primeiramente foi colocado o gel de resolução a 12% entre as placas, deixado polimerizar durante 20 minutos seguido da adição do gel de empilhamento a 5% e deixado polimerizar por mais 20 minutos. Aos poços do gel de empilhamento foram aplicadas as amostras proteicas extraídas dos pools de saliva. Cada amostra continham 20 µg das proteínas misturadas ao tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; DTT 100 mM; SDS 2% m/v; azul de bromofenol 0,1% m/v; glicerol 10% v/v). Como marcador de peso molecular foi utilizado BenchMarch™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen – cat. 10748-010).

Para corrida eletroforética foi utilizado o tampão de corrida Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM e Glicina 250 mM, pH 8,3) e SDS (0,1% m/v) com os seguintes parâmetros de corrida: voltagem de 40 V por 10 minutos e 120 V.

Ao final da corrida, os géis foram corados com solução de Coomassie R-250 (0,25g de Coomassie R-250 em 90 mL de metanol 50% (água destilada 1:1, v/v) e 10 mL de ácido acético por pelo menos 1 hora em agitação. A descoloração dos géis foi realizada em solução de etanol 70% (trocas sucessivas). Por fim, os géis foram digitalizados em fotodocumentador (BioRad) e armazenados em envelope plástico a 4°C com 5 ml de solução de ácido acético a 1%.

4.8 Eletroforese bidimensional 2D-E

Para focalização isoeétrica foram utilizadas fitas comercializadas IPG (Immobilized pH Gradients, GE Healthcare) com faixa de pH de 3-10NL e tamanho de 7 cm e aplicados

125 µl do *pool* de proteína de cada grupo com a mesma concentração de proteínas por volume de amostra. As fitas foram reidratadas em solução contendo uréia 7 M/tiouréia 2 M, CHAPS 1%, DTT 1%, IPG Buffer pH 3-10 0,5% e traços de azul de bromofenol por 16h em temperatura ambiente (25°C). As proteínas foram focalizadas no focalizador EttanIPGphor III IEF System (GE Healthcare) com os parâmetros sugeridos pelo fabricante. Após a focalização, a fita foi equilibrada com a solução de equilíbrio (Uréia 6M, Tris-HCl pH 8,8 50mM, Glicerol 30 %, SDS 2 %, azul de bromofenol) adicionando DTT 1% p/v por 15 min e em seguida adicionando Iodoacetamida 3 % p/v por 15 minutos. Subsequentemente, a amostra na fita foi separada pelo peso molecular (segunda dimensão), sendo colocada em contato com o gel de poliacrilamida 12,5%. A separação na segunda dimensão foi realizada na unidade de eletroforese Mini-PROTEAN® Electrophoresis System (BIO-RAD). Após a corrida, o gel foi corado com Comassie Colloidal G-250 por 16h sob agitação e posteriormente descorado com água. Os géis foram feitos em triplicata e os escaneados através do ImageScanner III (GE Healthcare). Como marcador de peso molecular foi utilizado BenchMarch™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen – cat. 10748-010).

4.8.1 Análise de Imagem dos Géis Bidimensionais (7 cm)

Os géis digitalizados foram analisados pelo programa Image Master 2D Platinum (GE Healthcare). Foi feita a normalização das imagens para realizar a análise semiquantitativa da intensidade das manchas proteicas (*spots*) e para minimizar a variação de coloração entre os géis. Para isso, os parâmetros utilizados foram: saliência; aplainamento e área mínima. Após a detecção dos *spots* de proteínas, foram selecionados os *spots* de referência (*landmarks*) para orientar a sobreposição das imagens dos géis. Para analisar a expressão das proteínas, a triplicata de géis 2D de cada grupo (CCE, LO e controle) foram comparadas aos três géis controle, assim como entre os grupos. Os *spots* com diferença de abundância estatisticamente significativa, assim como aqueles presentes apenas em um grupo (exclusivas de um determinado grupo) foram selecionados para serem identificados.

4.9 Digestão proteolítica dos spots e bandas proteicas *in gel*

Os spots proteicos obtidos de géis 2D e bandas proteicas obtidas de PAGE-SDS foram excisados dos géis, cortados em pedaços de aproximadamente 1 mm e transferidos separadamente para microtubos. Foi utilizada uma cópia com a imagem dos géis impressos em papel vegetal em tamanho próximo ao real para facilitar na localização e corte dos *spots* e bandas. Foi retirado um *spot* e banda conhecidos para ser usado como controle positivo e um

pedaço do gel para ser o controle negativo. O descoramento das amostras foi feito com uma solução contendo bicarbonato de amônio 100mM em acetonitrila (1:1 v/v) e a desidratação foi realizada com acetonitrila pura. Para a clivagem proteolítica, foram utilizadas soluções de tripsina (Promega, Madison, WI, USA) em bicarbonato de amônio 50 mM. Os peptídeos obtidos foram extraídos em ácido fórmico 5%/acetonitrila (1:2 v/v) e secos em SpeedVac (Shevchenko et al. 2006).

Os peptídeos secos foram ressuspensos em ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% e preparados em placa de MALDI com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em proporção de 1:2 (v/v). A matriz foi preparada a uma concentração 10 mg/mL e solubilizadas em TFA 0,3% em acetonitrila (1:1 v/v).

4.10 Análise dos peptídeos por Espectrometria de Massa e Identificação das Proteínas

As análises dos peptídeos dos grupos obtidos através da digestão trípica foram realizadas através do espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (ABI 4700 Applied Biosystem), que utiliza o MALDI como método de ionização e o TOF como analisador. Um volume de 0,5 μ L de cada amostra foi aplicado individualmente na placa de MALDI, seguido pela imediata aplicação de 0,5 μ L da matrix (Aldrich, Milwaukee, WI) (ácido α -ciano-4-hidroxinâmico, 10 mg/mL em acetonitrila 50 % v/v / ácido trifluoroacético 0,1 % v/v) e secagem à temperatura ambiente.

Os espectros MS foram obtidos no 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA), no modo positivo com reflectron, utilizando-se 1600 pulsos de laser por spot no modo MS e 2400 pulso no modo MS/MS, ambos adquiridos com um laser neodímio-doped yttrio alumínio garnet (Nd:YAG) com a taxa de repetição de 200-Hz. Os espectros foram calibrados internamente com peptídeos da autólise da tripsina. O máximo de oito íons-precursos mais abundantes foram selecionados para fragmentação e posterior análise por MS/MS. A calibração externa foi feita no modo MS usando uma mistura de quatro peptídeos: des-Arg1-bradicinina ($m/z = 904,468$), angiotensina I ($m/z = 1.296,685$), Glu1-fibrinopeptídeo B ($m/z = 1.570,677$) e ACTH (18-39) ($m/z = 2.465,199$). No modo MS/MS, os espectros foram calibrados externamente com fragmentos conhecidos do espectro MS/MS de angiotensina I.

As massas dos fragmentos das amostras geradas foram submetidas à pesquisa contra o banco de dados não-redundante do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), com o auxílio do programa MASCOT (versão 2.1, Matrix Science, Londres, Inglaterra; disponível na internet em <http://www.matrixscience.com/>). Os parâmetros usados na busca

foram: uma clivagem de tripsina perdida, $\pm 1,2$ Da de erro no modo MS, $\pm 0,3$ Da de erro no modo MS/MS e as seguintes modificações variáveis: carbamidometilação de cisteína, oxidação de metionina, histidina e triptofano, fosforilação de treonina, serina ou tirosina e propionamidação.

Ao fim da análise, os resultados foram conferidos manualmente com os seguintes critérios para identificação da proteína: escore do peptídeo superior a 30 e identificação feita em organismo *Homo sapiens*. Cada uma dessas etapas foi realizada sequencialmente para os grupos de LO, CCE e controle que posteriormente foram comparados entre si.

4.11 Western Blot

O conteúdo proteico foi determinado através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras proteicas dos 3 grupos (CCE, LO e controle) com iguais concentrações de proteínas (0,76 μ g de proteína por μ l de saliva), foram submetidas a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, em presença de SDS. Após a separação eletroforética, foram eletro-transferidas para membrana de PVDF (Immobilion-P - Milipore) usando 500mA *overnight* (Fonte Power Pac Universal, BioRad). Após a transferência, a membrana foi incubada com o seguinte anticorpo primário: anti-ZG16B (GenOne Biotechnologies). Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina e a ligação específica do anticorpo foi revelada utilizando um kit quimioluminescente (CDP star, Applied Biosystem) e quantificada por quimioluminescência (Chemi Doc XRS+, Bio Rad). Finalmente, as bandas foram analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade usando-se o programa ImageLab™ Software – Bio-Rad. Os valores obtidos da densitometria óptica foram normalizados pelos valores de densidade das proteínas totais de cada grupo, usada como controle de “loading”.

4.12 Bioinformática

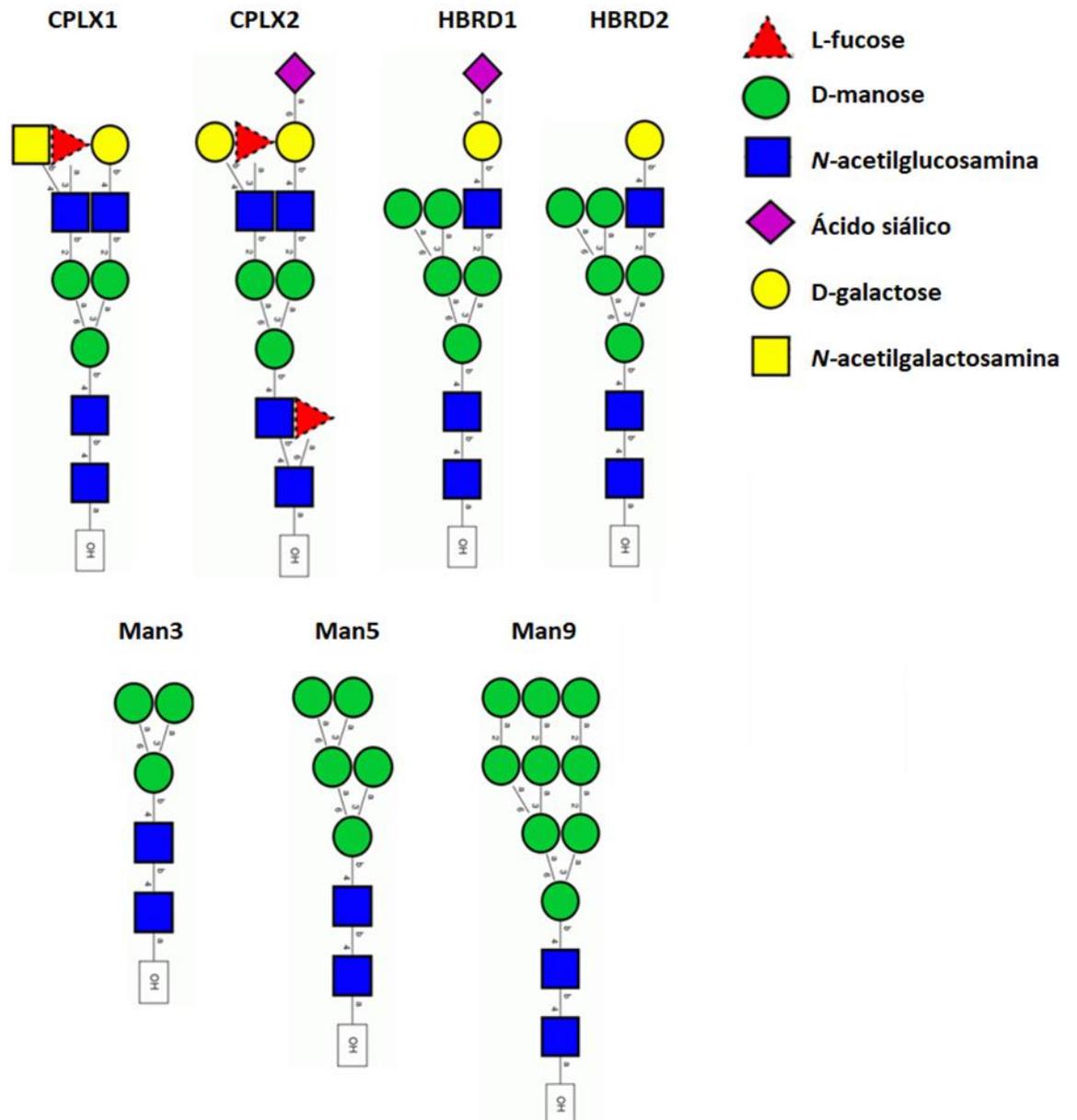
4.12.1 Docking molecular

O docking molecular da proteína detectada no western blot foi aplicado para prever a capacidade de ZG16B (PDB id: 3AQG) (KANAGAWA et al., 2011) interagir com diversos carboidratos. Para realizar os dockings, as estruturas dos carboidratos com energia minimizada foram obtidas do PubChem (KIM et al., 2015). Para monossacarídeos, as simulações foram realizadas com auxílio do software CLC Drug Discovery Workbench v.3.0, uma plataforma para a predição da interação entre proteínas e ligantes. O raio selecionado foi

11 Å ao redor do domínio de reconhecimento a carboidratos e o máximo de interações foi determinado como 5000. Os açúcares testados estão listados na tabela 7. A possibilidade de interação entre a proteína e o ligante foi expressa na forma de um escore em unidades arbitrárias (Valores mais negativos indicam uma interação mais forte). As imagens do *docking* foram feitas com o programa PyMol (Schrodinger).

A estrutura de ZG16B também foi submetida ao *docking* molecular com glicosaminoglicanos e vários N-glicanos e comumente encontrados em glicoproteínas. As estruturas dos glicanos foram obtidas de vários trabalhos científicos (STANLEY et al., 2009; BROCKHAUSEN et al., 2009; PARKER et al., 2012) e elaboradas com a ferramenta de construção de carboidratos da Glycam-Web. Todos os glicanos foram submetidos a minimizações de energia usando o AMBER12 (CASE et al., 2012) com campo de força GLYCAM_06j-1 (KIRSHNER et al., 2008). Adição de átomos de hidrogênio e correções dos tipos de ligações foram realizadas pelo módulo de preparação de ligantes do software Hermes v. 1.9.1. As representações das estruturas dos glicanos são mostradas na Figura 1. Simulações de *docking* foram realizadas com o software GOLD v. 5.6.1 (CCDC, Cambridge, Inglaterra). O GOLD implementa um algoritmo genérico para acoplar os ligantes aos sítios de ligação de proteínas, explorando uma grande variedade de conformações de ligantes com flexibilidade parcial das proteínas (JONES et al., 1997). A lectina foi preparada para *docking* por remoção de moléculas de solvente e ligantes. O local de ligação foi definido no centro do domínio de reconhecimento de carboidratos e todos os átomos compreendendo 12 Å de raio. Para todos os ligantes, 20 poses foram geradas e filtradas pelo escore de docking, geometria dos oligossacarídeos, ligações de hidrogênio e coerência das interações hidrofóbicas. Para todos os *dockings*, o PLANTSPLP foi escolhido como função de escore (KORB et al., 2009).

Figura 1 - Representação dos glicanos aplicados no docking molecular.



Fonte - Elaborado pelo autor.

4.12.2 Comparação estrutural de ZG16b e Artin M

A sobreposição entre as proteínas foi realizada com auxílio do programa PyMol (Schrodinger). A estrutura da *Artin M* foi obtida de trabalho científico (PRATAP et al., 2002)

4.13 Análise Estatística

A comparação dos três grupos independentes de variáveis numéricas foi procedida por meio do teste de ANOVA. Foi realizado o teste estatístico na análise de imagens pelo programa Image Master 2D Platinum (GE Healthcare) para avaliar a expressão dos dos *spots* proteicos presentes ao mesmo tempo nos grupos analisados. O teste estatístico avalia a diferença de volume entre os spots pareadas nos grupos analisados, indicando se ele está aumentado ou diminuído, gerando um valor numérico para essa variação e analisando se a diferença foi significativa. O valor de $p < 0.05$ será considerado significativo para proteínas com diferença de pelo menos 2 vezes entre os grupos.

Para a estatística da análise de Western Blot foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguido de pós – teste de Turkey's. Valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos. A análise foi realizada no programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Dados Demográficos e Clínico-Patológicos dos pacientes selecionados

No período de 09 de janeiro de 2015 a 20 de dezembro de 2015 foram identificados na Clínica de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, Campus Fortaleza 5 pacientes diagnosticados clínica e histopatologicamente como portadores de leucoplasia oral e 5 pacientes diagnosticados clínica e histopatologicamente como portadores de CCE. Como grupo controle foram selecionados 5 pacientes sem nenhuma patologia sistêmica ou oral detectável (tabela 3)

Tabela 3 - Perfil clínico patológico dos pacientes com CCE e LO

Grupos	Idade (anos)	Sexo	Raça	Local da lesão	Tamanho da lesão(cm)	Histopatológico	Metástase regional
CÂNCÊR							
Paciente 1	85	F	Leucoderma	Língua	3,5	CCE	+
Paciente 2	68	M	Melanoderma	Assoalho bucal	4	CCE	+
Paciente 3	65	M	Melanoderma	Língua	4	CCE	+
Paciente 4	59	M	Melanoderma	Língua	4,2	CCE	+
Paciente 5	69	F	Melanoderma	Assoalho bucal	3,5	CCE	+
LEUCOPLASIA							
Paciente 1	66	M	Leucoderma	Língua	1,5	Leucoplasia	
Paciente 2	49	M	Melanoderma	Retromolar	1	Leucoplasia	
Paciente 3	68	F	Leucoderma	Rebordo alveolar	1,2	Leucoplasia	
Paciente 4	52	F	Leucoderma	Palato	1,6	Leucoplasia	
Paciente 5	62	M	Melanoderma	Rebordo alveolar	1	Leucoplasia	

No grupo CCE 3 pacientes eram do sexo masculino e 2 do sexo feminino, a média de idade foi de 69,2 anos. Os locais de acometimento da neoplasia foram língua (3 lesões) e assoalho bucal (2 lesões). As lesões variavam de 3,5 a 5 cm, e em todos os casos os pacientes apresentavam metástases regionais (submandibular) palpáveis. Em relação a classificação histológica todos os casos era de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado.

No grupo de LO 3 pacientes eram do sexo masculino e 2 do sexo feminino, a média de idade foi de 60 anos. Os locais de acometimento da neoplasia foram língua (1 lesão), região retromolar (1 lesão), palato duro (1 lesão) e rebordo alveolar (2 lesões). As lesões variavam de 1 a 1,6 cm e nos 5 casos os pacientes apresentavam displasia epitelial leve.

No grupo controle para deixar as amostras mais uniformes, foram selecionados 3 pacientes do sexo masculino e 2 pacientes do sexo feminino, a média de idade foi de 54 anos.

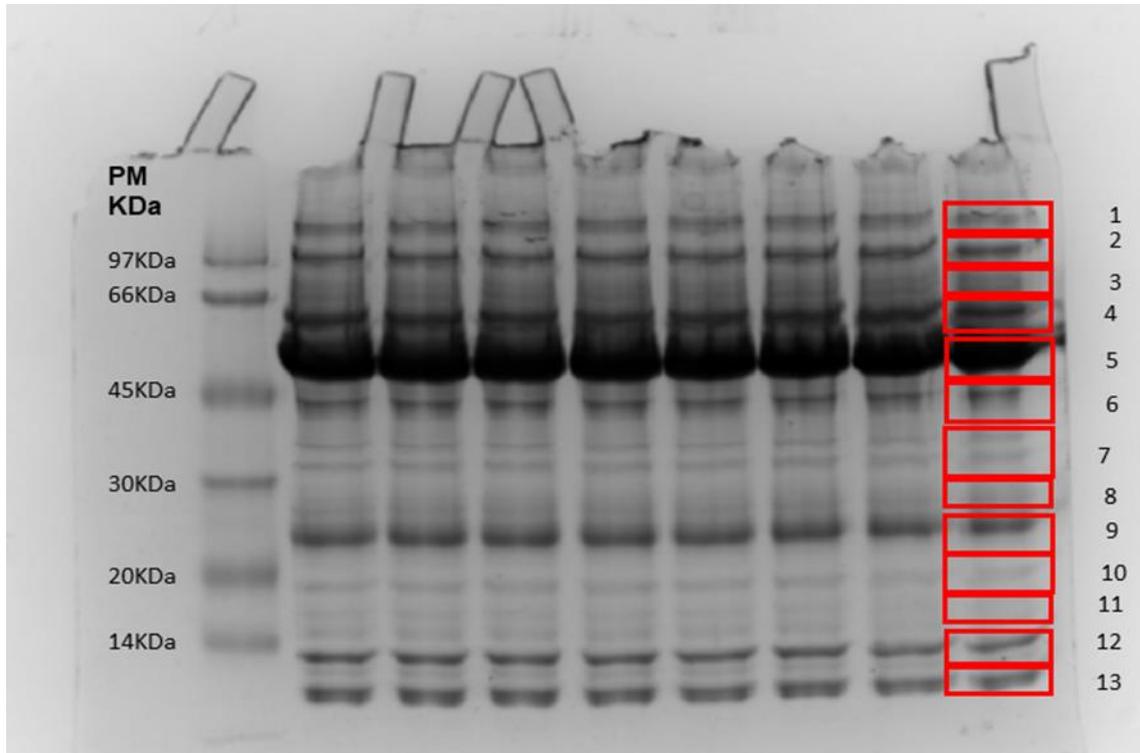
5.2 Cromatografia de afinidade em coluna de BTL imobilizada

A matriz cromatográfica de BTL-Sepharose obtida a partir do protocolo de CNBr apresentou um volume de menos de 1 mL. O volume de proteína aplicado na coluna foi de 200 uL. O perfil da cromatografia realizada mostrou que não houve separação efetiva da glicoproteína mucina do proteoma de saliva. A quantificação das proteínas solúveis por Bradford mostrou que só havia conteúdo proteico no P1, assim como os resultados de SDS-PAGE (dados não mostrados).

5.3 SDS-PAGE e identificação por espectrometria de massas

Os géis de poliacrilamida unidimensionais permitiram visualizar a integridade das proteínas presentes nas amostras e foram também utilizados para identificação de proteínas por espectrometria de massa. Foram realizadas corridas dos grupos *de pools* de proteínas dos grupos CCE (figura 2; tabela 4), LO (Figura 3; Tabela 5) e Controle (Figura 4; Tabela 6) separadamente para a análise da qualidade das proteínas e identificação das bandas por espectrometria de massa.

Figura 2 – Gel SDS-PAGE 12% contendo proteínas extraídas do *pool* de saliva de pacientes com CCE oral



Foram aplicados 12 µl de proteínas totais da saliva dos pacientes com CCE oral em cada poço. PM – Padrão de peso molecular. Foram selecionadas 13 bandas (1 a 13), recortadas e digeridas com tripsina para análise de peptídeos por espectrometria de massa. Coloração por Coomassie R-250.

Das 13 bandas recortadas foram identificadas 6 proteínas do *pool* de saliva dos pacientes com CCE oral (tabela 4)

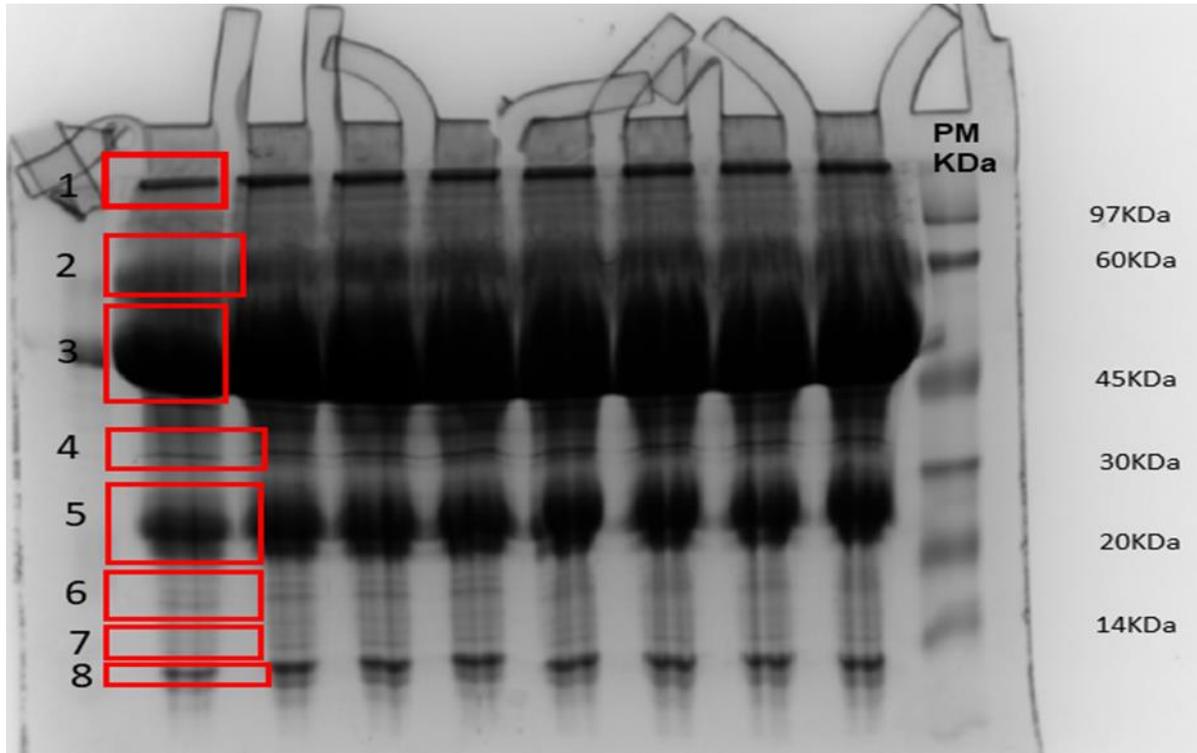
Tabela 4 – Proteínas identificadas do *pool* de saliva de pacientes com CCE oral .

Nº da Banda	Proteína	Escore
1	AMY1_HUMAN (Alfa-amilase 1)	41
2	AMY2B_HUMAN (Alfa-amilase 2B)	41
4	ALBU_HUMAN (Albumina)	40
5	AMY1_HUMAN (Alfa-amilase 1)	41
8	ZG16B_HUMAN (Proteína de grânulos de zimogênio 16B)	50
13	HBB_HUMAN (Hemoglobina)	45

A identificação das proteínas foi feita a partir dos espectros de peptídeos obtidos pela espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF). O espectro de massas dos fragmentos das amostras geradas foram submetidas à pesquisa no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando o programa MASCOT.

Das 8 bandas enumeradas no gel do *pool* de saliva dos pacientes com LO (figura 3) foram identificadas 3 proteínas (tabela 5).

Figura 3 - Gel SDS-PAGE 12% contendo proteínas extraídas do *pool* de saliva de pacientes com leucoplasia oral



Foram aplicados 12 μ l do *pool* de proteínas totais da saliva dos pacientes com Leucoplasia oral em cada poço. PM – Padrão de peso molecular. Foram selecionadas 8 bandas (1 a 8), recortadas e digeridas com tripsina para análise por espectrometria de massa. Coloração por Coomassie R-250.

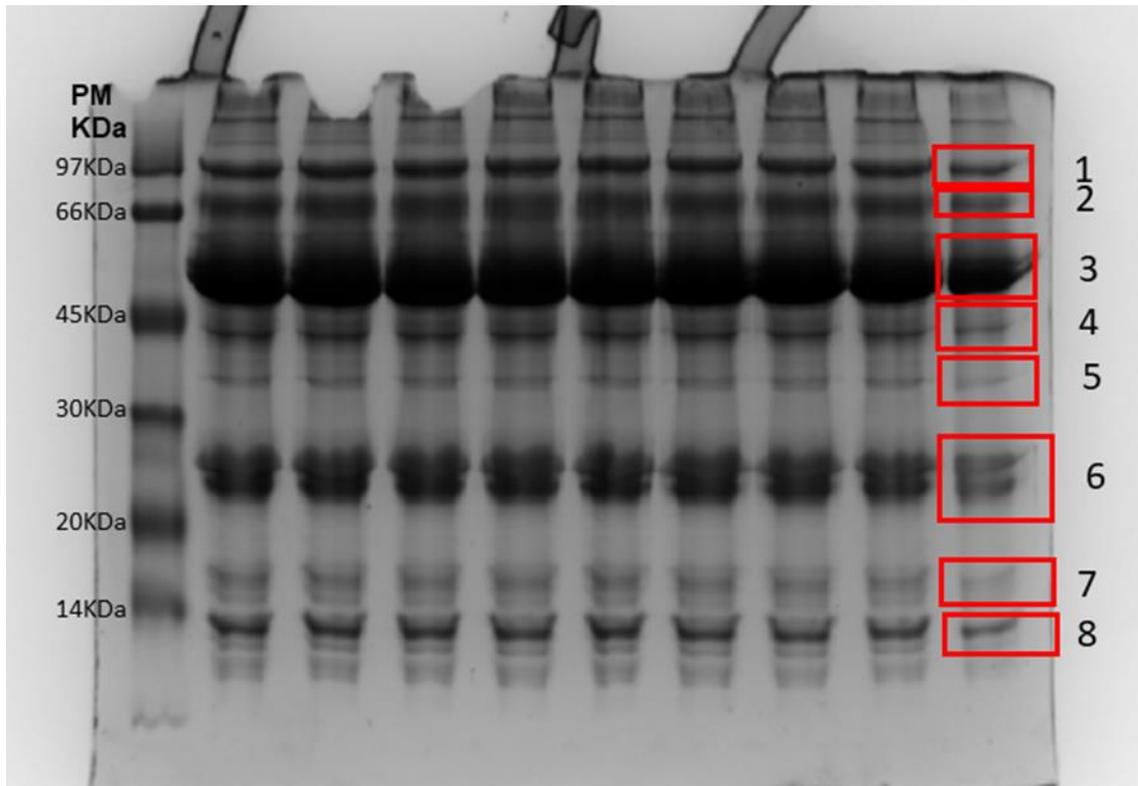
Tabela 5 – Proteínas identificadas do *pool* de saliva de pacientes com Leucoplasia oral.

Nº da Banda	Proteína	Escore
3	AMY1_HUMAN (Alfa-amilase 1)	41
6	ZG16B_HUMAN (Proteína de grânulos de zimogênio 16B)	50
8	CYTB_HUMAN (Cistatina B)	30

A identificação das proteínas foi feita a partir dos espectros de peptídeos obtidos pela espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF). O espectro de massas dos fragmentos das amostras geradas foram submetidas à pesquisa no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando o programa MASCOT.

No *pool* das salivas do gel do grupo controle (figura 4) das 8 bandas excisadas e digeridas foram identificadas 2 proteínas (Tabela 6).

Figura 4 - Gel SDS-PAGE 12% contendo proteínas extraídas do *pool* de saliva de pacientes do grupo controle.



Foram aplicados 12 μ l do pool de proteínas totais de saliva dos pacientes do grupo controle em cada coluna. PM – Padrão de peso molecular. Oito (8) bandas de proteínas (1 a 8) foram selecionadas, recortadas e digeridas com tripsina para análise por espectrometria de massa. Coloração por Coomassie R-250.

Tabela 6 – Proteínas identificadas do *pool* de saliva de pacientes do grupo controle.

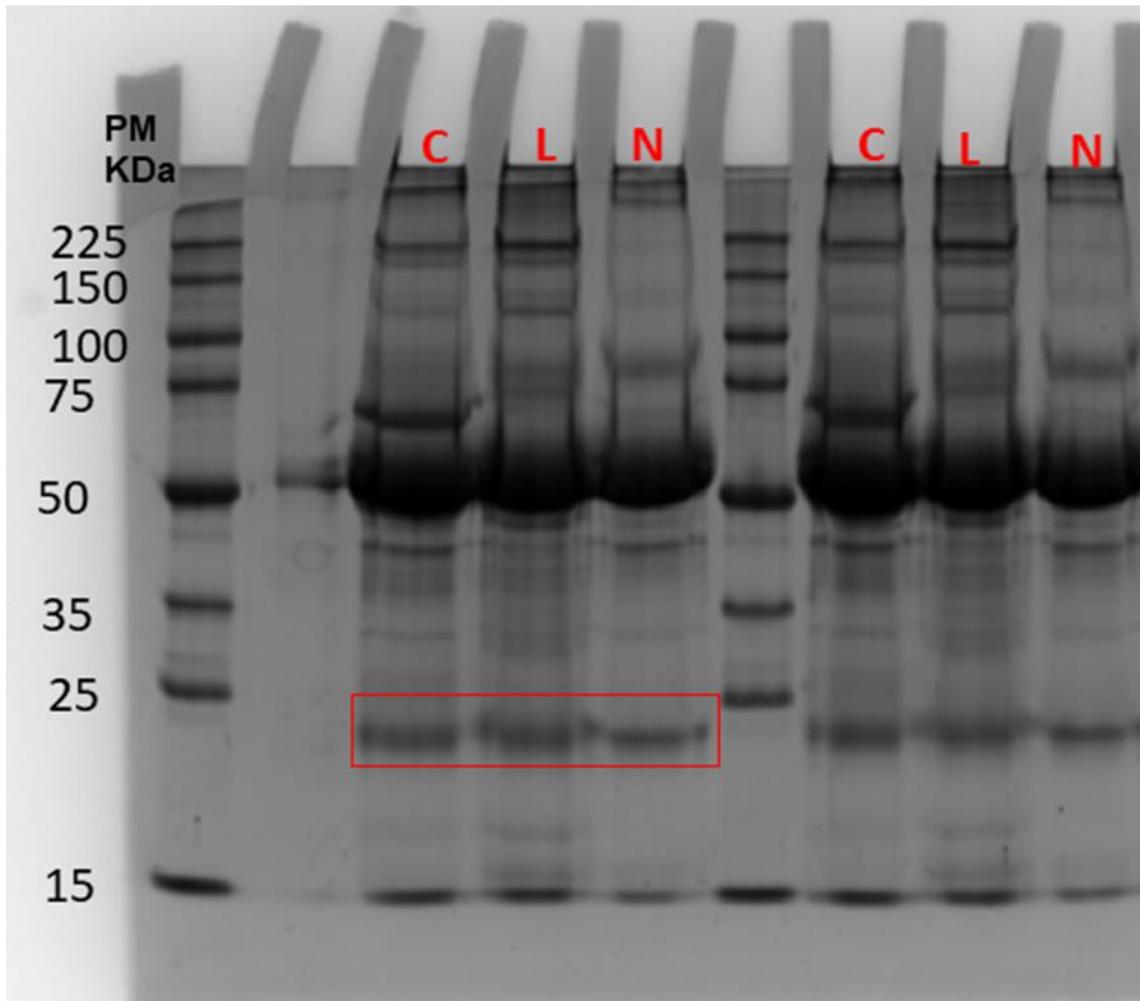
Nº da Banda	Proteína	Escore
5	G3P_HUMAN (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)	40
6	ZG16B_HUMAN (Proteína de grânulos de zimogênio 16B)	50

A identificação das proteínas foi feita partir dos espectros de peptídeos obtidos pela espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF). O espectro de massas dos fragmentos das amostras geradas foram submetidas à pesquisa no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando o programa MASCOT.

O grupo do CCE foi o que apresentou o maior número de bandas proteicas visíveis (13 bandas), seguidas do grupo LO e controle (8 Bandas cada grupo). O grupo CCE foi o que apresentou também o maior número de identificações nos géis de SDS-PAGE (6 proteínas) seguido do grupo LO (3 proteínas) e do grupo controle (2 proteínas). Entre as proteínas identificadas nos *pools* dos 3 grupos (CCE, LO e controle) apenas a proteína de grânulos de zimogênio 16B (ZG16B) foi detectada nas 3 amostras. Buscando uma melhor visualização da proteína ZG16B em relação a quantificação e massa aparente, foram feitos 2 géis SDS-PAGE

colocando cada grupo de pools de proteínas de saliva em poços vizinhos, onde um dos géis foi corado com comassie R-250 (figura 5). O outro foi armazenado para o teste de *Western Blot*. A identificação da proteína ZG16B foi feita pela massa molecular 22,739 KDa e posteriormente confirmada por Western Blot (figura 6).

Figura 5 - Gel SDS-PAGE 12% contendo proteínas extraídas da saliva dos 3 *pools* de pacientes (CCE, LO e Controle).



Foram aplicados 12 μ l do pool de proteínas totais de saliva dos pacientes dos 3 grupos (C – CCE; L – LO; N – Controle) em cada poço. PM: Padrão de peso molecular e quadro vermelho: proteínas ZG16B. Coloração por Coomassie R-250.

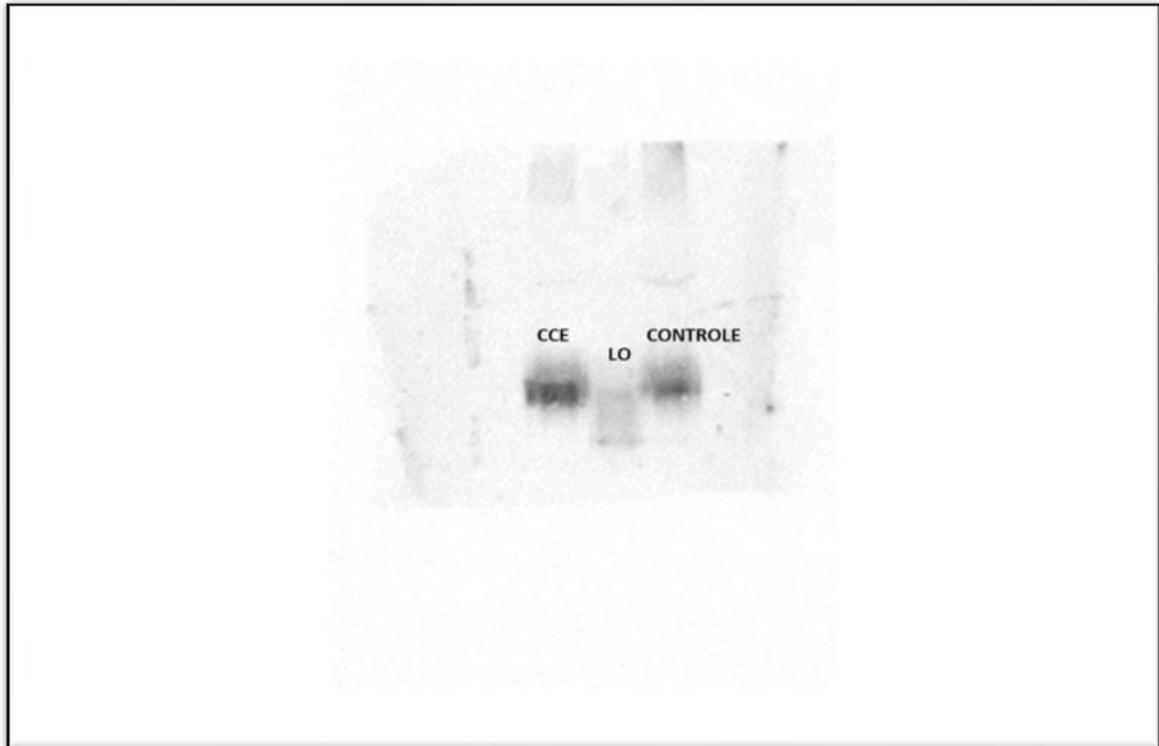
5.4 A proteína ZG16B está aumentada no *pool* de proteínas totais de saliva dos pacientes com CCE

As amostras proteicas dos 3 grupos (CCE, LO e Controle) com iguais concentrações (0,76 μ g de proteína por μ l de saliva), foram submetidas a separação por eletroforese em gel

de poliacrilamida 12%, em presença de SDS e o gel foi submetido a técnica de Western Blot utilizando o anticorpo para proteína ZG16B.

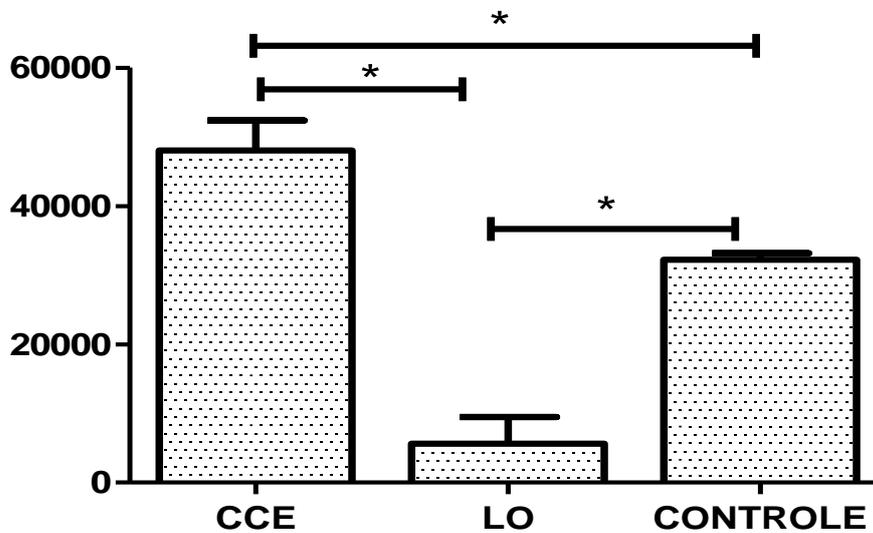
Verificou-se o aumento do nível de ZG16B no *pool* de proteína total de saliva dos pacientes pertencentes ao grupo CCE (figura 6 e 7)

Figura 6 – Western Blot da proteína ZG16B presente no *pool* de proteínas totais de saliva de pacientes dos grupos CCE, LO e controle.



Western Blotting para ZG16B da saliva de pacientes com CCE (Carcinoma de Células Escamosas); LO (Leucoplasia Oral) e Controle. Amostras de saliva dos 3 grupos (12 μ l) foram carregadas em um gel de poliacrilamida (12%), eletrotransferidas e marcadas com anticorpo anti-ZG16B.

Figura 7 - Os níveis da proteína ZG16B estão aumentados no Carcinoma de Células Escamosas Oral



CCE (Carcinoma de Células Escamosas); LO (leucoplasia Oral). Os valores da densitometria óptica foram normalizados pelos valores de densidade das proteínas totais de cada grupo (controle de “loading”). Os asteriscos indicam diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$, ANOVA seguido de pos – teste de Turkey’s).

5.5 Eletroforese bidimensional 2D-E dos pools de saliva dos pacientes com CCE, LO e controle

Os 3 geis dos *pools* de pacientes com CCE, LO e controle foram reprodutíveis, foram visualizadas um número maior de *spots* no gel de CCE (502), seguido pelo controle (179) e LO (138) respectivamente (figura 8). Após a realização dos *matches* (43) nos 3 grupos, foram considerados para análise somente aqueles com diferença estatística em relação a intensidade das manchas (9 *matches*). Destes 1 proteína estava presente apenas no gel do *pool* de CCE (figura 9), entretanto não foi identificada por espectrometria de massas e 1 proteína (citoqueratina 1) estava aumentada no *pool* de CCE quando comparada aos grupos LO e controle (figura 10).

Figura 8 - Géis bidimensionais de poliácridamida 12,5% das amostras dos *pools* de CCE (A), LO (B) e controle (C).

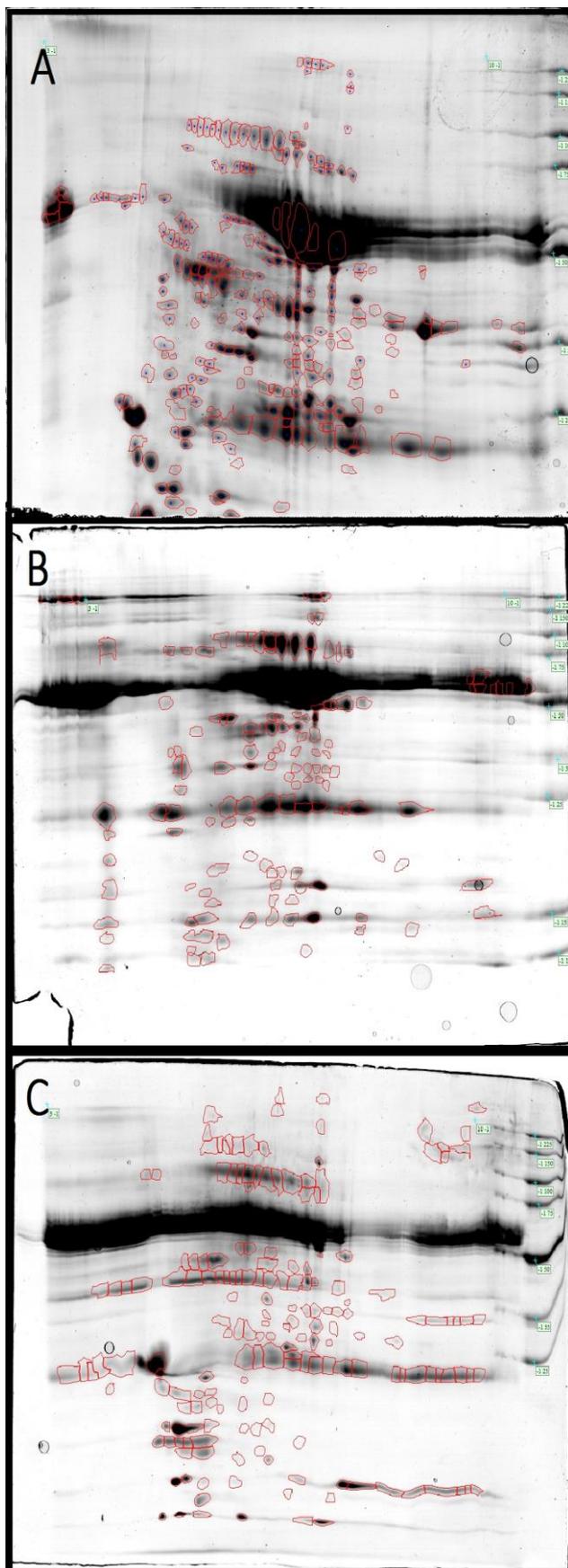
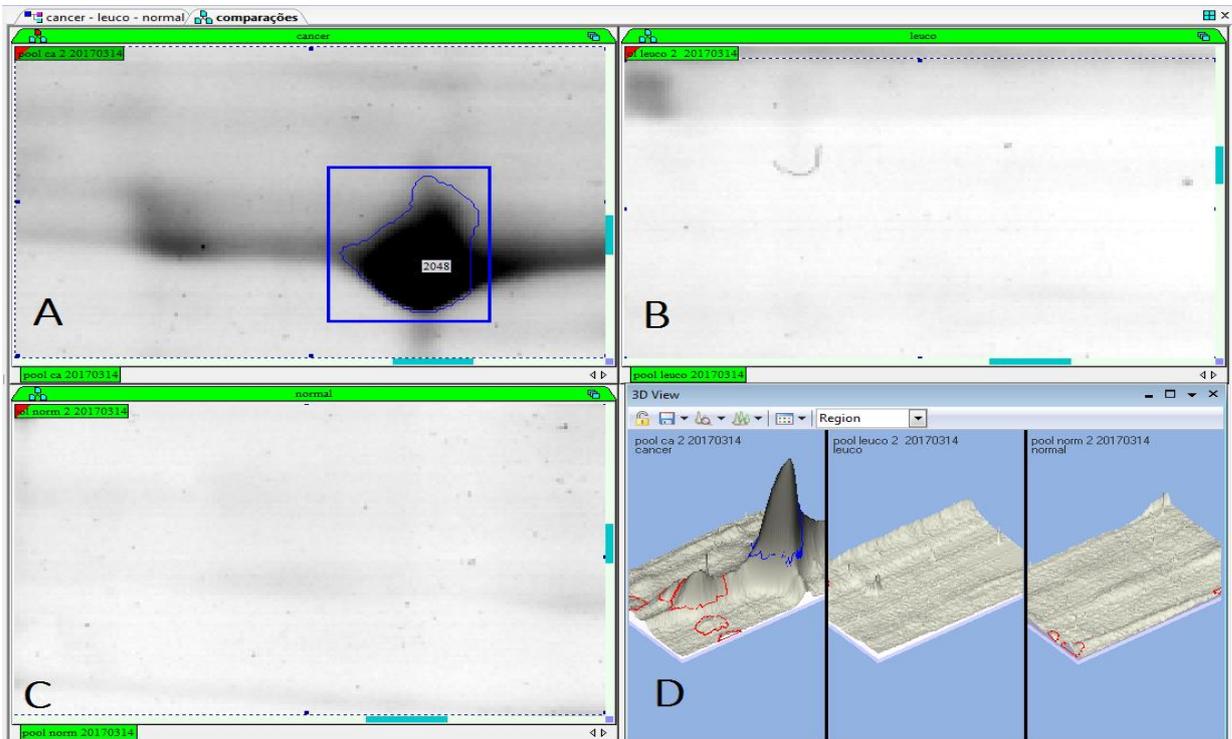
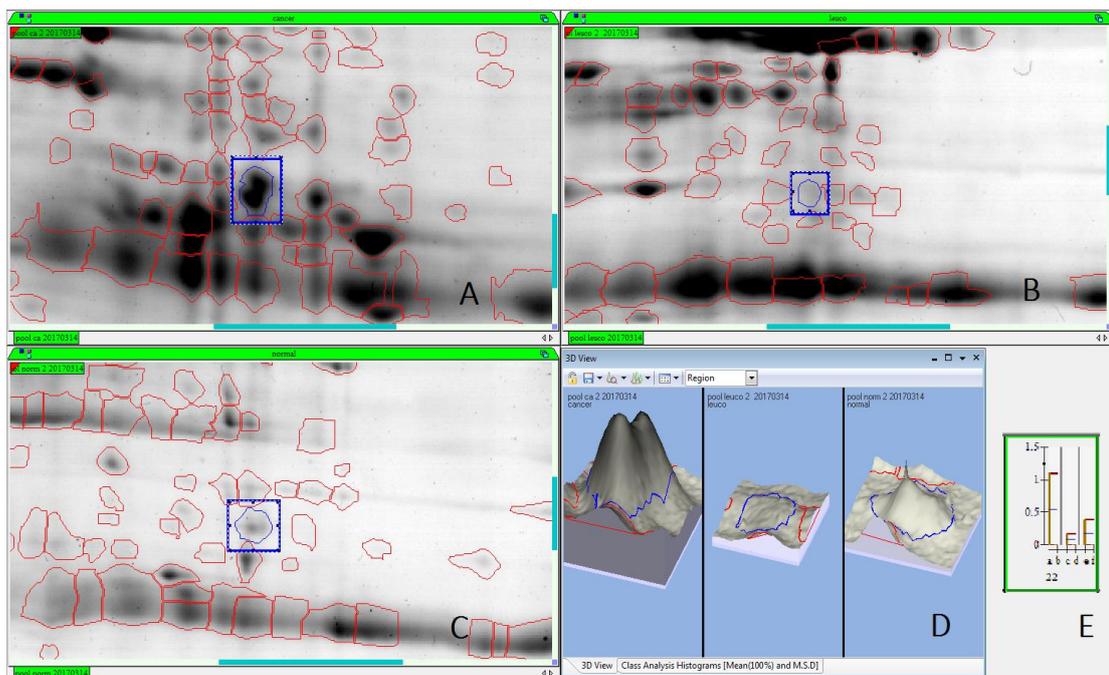


Figura 9 – Zoom da região do *spot* 2048.



(A) Gel do *pool* de CCE, com o *spot* 2048. (B) e (C) Geis dos *pools* de LO e controle sem a presença do *spot* 2048, respectivamente. (D) Análise da região analisada em vista tridimensional.

Figura 10 – A proteína citoqueratina 1 está aumentada no *pool* de saliva de CCE



Diferenças no nível de expressão da citoqueratina 1 (circulada em azul). (A) Gel do *pool* de CCE. (B) Gel do *pool* de LO. (C) Gel do *pool* controle. (D) Vista tridimensional do *spot* da proteína citoqueratina 1 nos 3 grupos. (E) Histograma indicando a diferença de expressão citoqueratina 1 nos 3 grupos.

5.6 Docking molecular

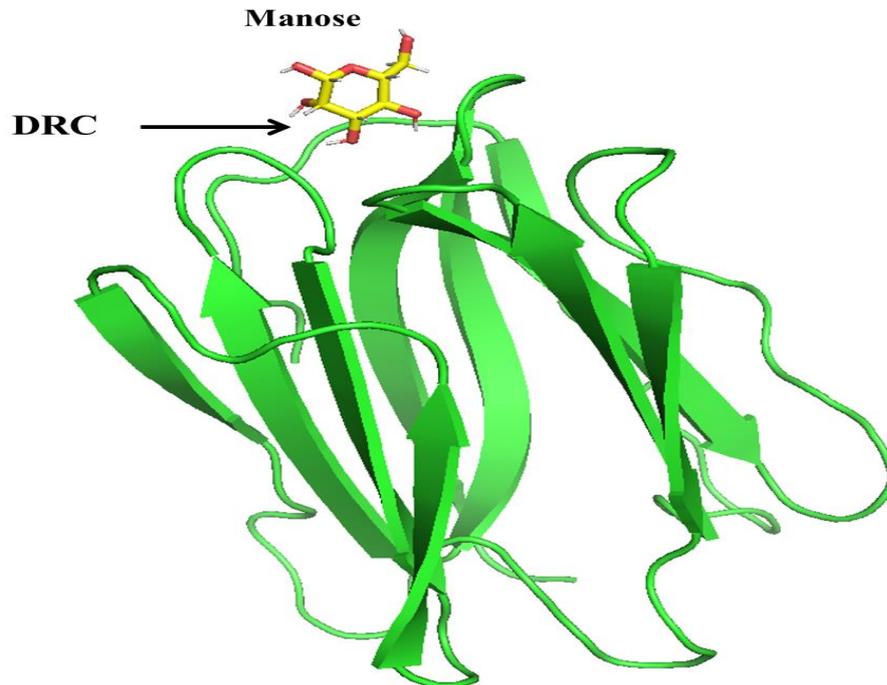
Os escores de docking de ZG16b com N-glicanos, monossacarídeos e glicosaminoglicanos estão mostrados na tabela 7.

Tabela 7 – Escores de docking molecular de ZG16B com N-glicanos (preto), monossacarídeos (azul) e glicosaminoglicanos (vermelho).

Carboidrato/glicano	Escore
Man3	-45,37
Man5	-46,58
Man9	-48,12
HBRD1	-47,02
HBRD2	-45,03
CPLX1	-34,97
CPLX2	-33,24
α -D-manose	-37,69
α -D-glucose	-37,06
<i>N</i> -acetilglucosamina	-37,41
α -metil-D-manosídeo	-34,85
α -D-galactose	-31,73
Condroitina-sulfato	-38,16
Heparan-sulfato	-37,99

Dentre os monossacarídeos testados, essa proteína demonstrou interações favoráveis com manose (Figura 8), glucose e GlcNAc. A interação foi considerada baixa com a galactose.

Figura 11 – Interação da ZG16B com manose



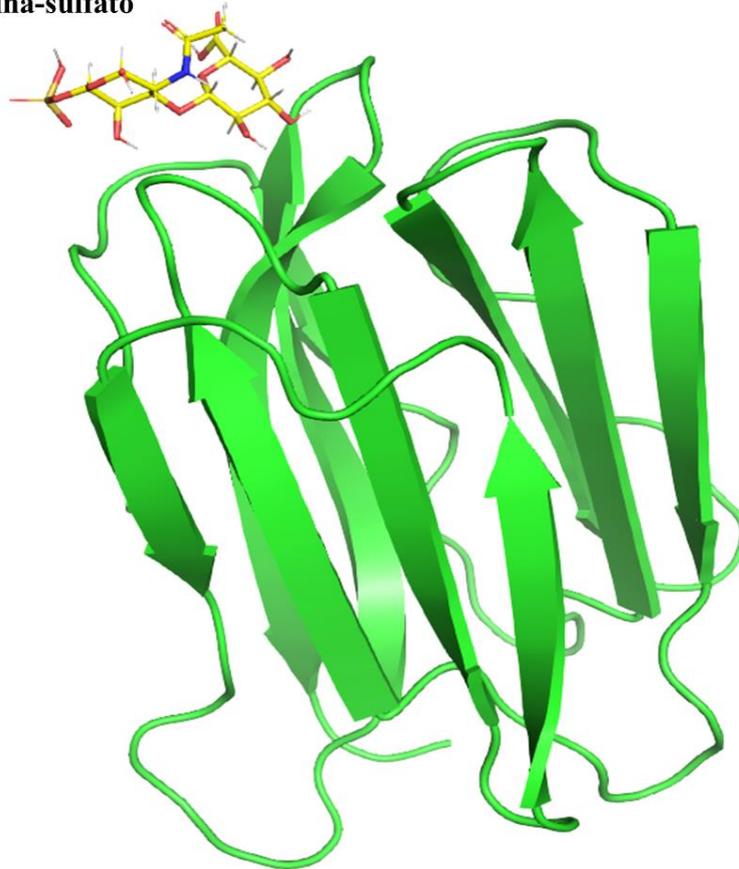
Estrutura da ZG16B (cartoon em verde), a seta preta aponta o Domínio de reconhecimento a carboidrato (DRC). O ligante está representado em sticks com carbonos em amarelo.

Para prever a capacidade de ZG16b de interagir com glicoproteínas, um total de 7 N-glicanos foram escolhidos para *docking* molecular baseando-se primariamente na sua relevância e relativa alta presença em glicoproteínas. Entre esses glicanos, ZG16b demonstrou capacidade de interagir com glicanos contendo resíduos de manose na posição terminal como mostrado pelos escores relativamente altos com os glicanos *high-mannose*: Man3 (Escore: -45,37), Man5 (Escore: -46,58) e Man9 (Escore: -48,12). Similarmente, os N-glicanos híbridos testados também apresentaram interações favoráveis com ZG16B devido a presença dos resíduos de manose na posição terminal. O resíduo de ácido siálico não alterou significativamente o escore. Os glicanos complexos comparativamente com os demais não interagiram tão fortemente, o que pode ser explicado pela ausência de resíduos de manose na posição terminal.

Em relação aos glicosaminos glicanos testados, ZG16B interagiu bem com ambos, sendo a maior interação com a condroitina-sulfato (Escore: -38,16) (figura 9) e um pouco menor com o heparan-sulfato (Escore: -37,99).

Figura 12 – Interação da ZG16B com condroitina-sulfato

Condroitina-sulfato

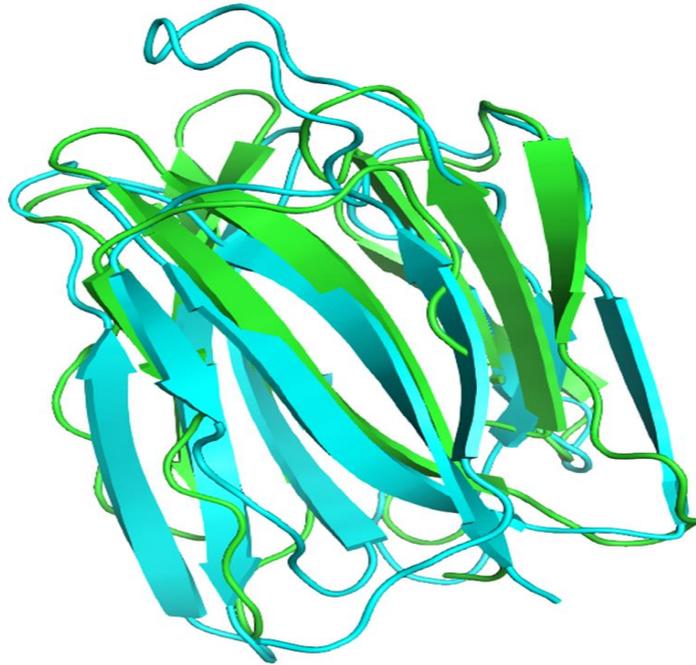


Estrutura da ZG16B (cartoon em verde). O ligante está representado em sticks com carbonos em amarelo.

5.7 A lectina de *Artin M* e a proteína ZG16B apresentam semelhança estrutural

Foi realizada uma sobreposição das estruturas de ZG16B e da lectina isolada de sementes de *Artocarpus integrifolia* ligante de manose e denominada *Artin M*. Pela comparação estrutural é possível verificar que o enovelamento geral apresentado pelas proteínas é consideravelmente semelhante indicando que a proteína ZG16B apresenta o domínio lectínico jacalina-like composto por um beta prisma (figura 9).

Figura 13 - Sobreposição de ZG16b com a lectina *Artin M*



Cartoon verde representa a estrutura de ZG16B e azul a estrutura da lectina *Artin M*.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou o aumento nos níveis da proteína ZG16B no *pool* de proteínas totais de salivas de pacientes portadores de Carcinoma de Células Escamosas Oral quando comparado ao *pool* dos grupos de pacientes com Leucoplasia oral e pacientes controle.

Alguns estudos de proteômica apontam como vantagem a remoção de proteínas abundantes da saliva (α -amilase, albumina, mucina e imunoglobulina) durante a fase de preparo da amostra para que sejam melhor identificados analitos informativos, que porventura, estejam presentes em quantidades menores nos fluídos orais (OSHIRO et al., 2007; KRIEF et al., 2012).

Dentre as várias opções existentes para remoção dessas proteínas, tem se utilizado biomoléculas que se mostram eficientes e geralmente apresentam custos menos elevados quando comparadas a colunas cromatográficas pré-fabricadas (WANG et al., 2016). Na intenção de remover a mucina das amostras de saliva foi realizada, nesse estudo, produzida em laboratório uma coluna cromatográfica de afinidade utilizando a lectina isolada da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* (BTL) mucina específica (AINONZ et al., 1995). Não obtivemos sucesso, entretanto, na remoção do conteúdo de mucina das amostras de saliva. Alguns fatores podem ter sido determinantes para esse resultado como: baixo rendimento da lectina, sazonalidade da alga o que dificulta uma coleta mais efetiva e em maior quantidade de lectina pura obtida, pequeno volume de coluna gerado (por conta do baixo rendimento de

proteína pura). No entanto, como alternativa para viabilização da coluna, a produção da lectina recombinante de BTL poderia solucionar os problemas em relação a sazonalidade e rendimento (HAN et al., 2015). Vale ressaltar, no entanto, que o fato de não remover o conteúdo proteico abundante, a obtenção de amostra de proteínas totais a partir de saliva de pacientes para o estudo proteômico não foi inviabilizada. Vários trabalhos na literatura demonstram esse fato inclusive com a descoberta de proteínas que podem servir como potenciais biomarcadores de várias patologias incluindo o câncer oral (MANDEL et al., 1967; BEN-ARYEH et al., 1981; HENSKENS et al., 1994; ANIL et al., 1995; STRECKFUS et al., 2000; WINCK et al., 2015).

Outras alternativas para obtenção de uma amostra de qualidade para análise proteômica sem envolver etapas de remoção de proteínas de grande abundância podem ser utilizadas. Neste trabalho, uma destas estratégias utilizadas com sucesso foi uma limpeza da amostra com uso do kit Clean-up. Tal estratégia tem se mostrado eficiente para eliminar impurezas que são coextraídas com as proteínas, como por exemplo, os lipídios, carboidratos e também ácidos nucleicos, que podem interferir de sobremaneira no método analítico (KANSHIN; THIBAUT, 2014).

Na análise dos géis 2D dos 3 grupos foram detectados 9 matches com diferença estatística. Desses, a proteína citoqueratina 1 mostrou-se aumentada no CCE. Diversos trabalhos na literatura relatam o aumento do padrão de algumas citoqueratinas nas lesões potencialmente malignas (leucoplasia) e CCE, o aumento de algumas citoqueratinas parece está relacionado a uma predisposição para transformação maligna, em relação a citoqueratina 1 foi observado o aumento da expressão dessa proteína em bochechas de ratos tratados com um agente carcinogênico DMBA (7,12 dimetilbenzantraceno) a medida que a lesão ia progredindo para malignidade (SHEARER; MCMILLAN; JENKINSON, 1997; YOSHIDA et al., 2015; CAMISASCA et al., 2017), podendo este fato está relacionado ao aumento dessa proteína verificado nesse trabalho.

A proteína de grânulos de zimogênio 16B (ZG16B) também conhecida como fator suprarregulado de adenocarcinoma pancreático (PAUF) ou proteína salivar comum humana 1 (CSP1) foi originalmente identificada por imunosscreening de uma biblioteca de expressão de cDNA de pâncreas de rato com um anticorpo contra membranas de grânulos de zimogênio. É uma proteína secretora, e sua função parece está relacionada a condensação de enzimas pancreáticas para a membrana do grânulo do zimogênio em células acinares pancreáticas (CRONSHAGEN; VOLAND; KERN, 1994).

Thévenod e colaboradores propuseram uma função adicional do ZG16B. Eles sugeriram um papel regulador para o ZG16B no acoplamento direto entre a fusão dos grânulos de zimogênio e a membrana plasmática da célula acinar e a ativação de canais de potássio, que poderiam promover uma "descarga" do conteúdo granular (ou seja, enzimas ou mucinas) durante a exocitose em células acinares pancreáticas e em células calciformes intestinais (THEVENOD; BRAUN, 2000). Um estudo mais recente demonstrou que a ZG16B humana se liga a espécies patogênicas de *Candida* e *Malassezia* fortemente revestidas com manana. Como a ZG16B foi detectada em células produtoras de muco, como as células

acinares da glândula parótida, células acinares do pâncreas e as células caliciformes do intestino, que estão envolvidas na autodefesa contra patógenos invasores, essas observações implicam um papel de ZG16B no reconhecimento de fungos patogênicos através de especificidade única para manose, afinidade essa confirmada por *docking* molecular neste trabalho. Resíduos de manose são uma assinatura chave de microorganismos não-próprios no sistema digestivo. Assim, o ZG16B pode também estar envolvido em outras funções celulares potencialmente dependentes do seu domínio lectínico (TATENO et al., 2012).

Em relação a sua classificação a ZG16B é uma lectina secretada de mamíferos e sua estrutura só foi descoberta em 2011. Apesar das lectinas animais diferirem em sequência e estrutura das lectinas de planta, a ZG16B apresenta uma homologia de sequência e estrutural significativa com a lectina de planta Jacalina, que se liga especificamente a Galb1-3GalNAc. Entretanto, no mesmo estudo, o autor relata que ensaios de competição com mono e dissacarídeos mostram que a adição de 10 mM de galactose tem um efeito inibitório fraco sobre a ZG16B e ensaios realizados demonstraram uma afinidade maior com manosídios, mostrando que a proteína se comporta de forma parecida com as lectinas de Jacalina manose específicas. A capacidade de ZG16B se ligar à açucar se deve a existência de três loops diferentes (*loop* GG, *loop* de reconhecimento e *loop* de ligação), todos localizados na estrutura β -prisma da proteína, que atuam juntos como um motivo (figura 14). Este motivo é bem conservado e é compartilhado por todas as lectinas relacionadas à jacalina manose específica. O estudo ainda revela que a ZG16B não possui um domínio transmembranar e a interação com a membrana provavelmente é mediada pelo domínio lectínico (KANAGAWA et al., 2011).

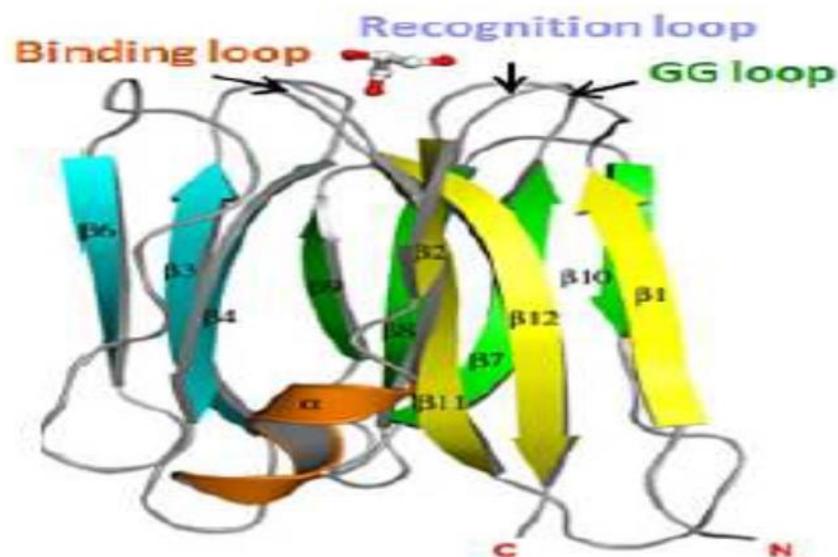


Figura 14 - ZG16B estrutura da proteína com os sítios de ligação a carboidrato. Adaptado de KANAGAWA et al., 2010.

No que se refere a expressão a ZG16B é encontrada no fígado, pâncreas, intestino e cólon, onde, no intestino delgado, a proteína é expressa no jejuno e no íleo, mas no duodeno e pedúnculo cerebelar apresenta baixa expressão. Curiosamente, a ZG16B não foi significativamente detectada em tecidos fetais, incluindo fígado fetal. O padrão de expressão do tecido implicava que a proteína poderia estar envolvida no desenvolvimento e nas funções do fígado (ZHOU et al., 2007). Em relação aos tecidos orais, um estudo realizado em 2017 mostrou pela primeira vez, através de técnicas de imunohistoquímica que a ZG16B não está presente em tecido epitelial sadio, mas é detectada no citoplasma dos acinos de glândulas salivares normais (SASAHIRA et al., 2017). Entretanto, vale ressaltar que alguns estudos já detectaram a presença de ZG16B na saliva humana, mas nenhum deles relacionaram o aumento ou diminuição da proteína em relação ao câncer oral. Somente um estudo revela o aumento da proteína salivar comum humana 1 (CSP1) análogo da ZG16B na saliva de pacientes com doença periodontal (VITORINO et al., 2012; HEO et al., 2016).

Em 2009, Kim e colaboradores em um estudo experimental com linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático em hamsters verificaram que os animais *Knockin* para PAUF (ZG16B) apresentavam tumores 3,8 vezes maiores quando comparados aos controles. Os autores confirmaram esse aumento de expressão através de PCR e o aumento dos níveis da proteína pela técnica de Western Blot, paralelo a isso realizaram ensaios de imunohistoquímica com secções de tecidos de adenocarcinoma pancreático humano e constataram o aumento da expressão citoplasmática de ZG16B nesses tecidos. Os autores ainda, através de estudos em linhagem celulares de adenocarcinoma pancreático tratados com um anticorpo contra ZG16B, detectaram a diminuição de migração e invasão celular, mecanismo esse de extrema importância na patogênese das metástases no câncer. Como conclusão os autores relataram pela primeira vez o aumento de PAUF (ZG16B) no câncer de pâncreas e um provável envolvimento da proteína na progressão do adenocarcinoma pancreático. Entretanto estudos em relação a receptores, via de sinalização, modificações pós-traducionais da proteína e mecanismos moleculares do processo de progressão tumoral são necessários para compreender melhor o papel da proteína no câncer pancreático (KIM et al., 2009).

Em 2011 o mesmo grupo de autores demonstrou que a ZG16B se liga ao receptor *toll like 2* (TLR2) e ao receptor de quimiocina (CXCR4), ativando a via de sinalização de ERK (quinase regulada por sinal extracelular) e produzindo diversas citocinas protumorigênicas como o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) e a RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*) promovendo a metástase no adenocarcinoma pancreático (PARK et al., 2011). Já o receptor CXCR4 promove a invasão e migração celular ativando a via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase PI3K (SOTSIOS et al., 1999). A proteína chave dessa via é Akt, proteína serina/treonina quinase multifuncional, uma vez fosforilada, ela é capaz de regular múltiplos substratos que podem desencadear alterações metabólicas e ativar o crescimento, proliferação e sobrevivência celular.

O CXCR4 faz parte de um grupo de proteínas denominadas receptores de quimiocinas e seu ligante, o fator-1 derivado do estroma da medula óssea (SDF-1/CXCL12), desempenham várias funções fisiológicas como embriogênese, vasculogênese, modulação da

resposta inflamatória, etc. Vários estudos demonstraram o aumento de expressão do CXCR4 em diversos tipos de câncer, entre eles o CCE oral (XIA et al., 2012).

Dados recentes da literatura mostram que a via de sinalização PI3K-Akt ativada por CXCR4, está desregulada em vários tipos de cânceres, como de mama, ovário, endométrio, pulmão, tireóide e fígado (MORAL; PARAMIO, 2008). Além disso, há indícios de que essa via de sinalização realmente esteja envolvida com o desenvolvimento do CCE oral (DU et al., 2012; GIUDICE; SQUARIZE, 2013).

Em 2005, Pedrero e colaboradores mostraram a amplificação do gene PIK3CA em aproximadamente 40% dos casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, apesar de não encontrar nenhuma correlação clinicopatológica. Já no estudo de Kozaki e colaboradores em 2006, foi demonstrada uma correlação significativa entre estágios mais avançados de CCE e amplificação do gene PIK3CA quando comparados com estágios iniciais da doença. Estudos mais recentes encontram cada vez mais uma associação forte da ativação dessa via com a progressão tumoral do CCE oral (LI et al., 2013).

Recentes estudos sugerem também a participação da Via ERK quinase na patogênese do câncer oral. Um estudo de 2017 demonstrou através de imunohistoquímica e linhagens de células de câncer oral correlacionando os resultados com dados clinicopatológicos, que o aumento da proteína Rab5a (Ras-related protein Rab-5a) no CCE de cavidade oral contribui diretamente no crescimento e invasão de células cancerígenas através da via de sinalização ERK / MMP-2 (ZHANG; CHANGLONG; HONGJUN, 2017).

Além de promover crescimento e invasão, a proteína ZG16B está relacionada ao aumento da angiogênese *in vivo* e *in vitro* através do aumento da expressão de CXCR4 em células endoteliais e potencialização das respostas angiogênicas ao fator derivado do estroma da medula óssea (SDF-1), contribuindo de forma importante para a angiogênese tumoral (KIM et al., 2013).

Estes dados poderiam explicar o aumento dos níveis da proteína ZG16B no câncer oral observados neste trabalho, já que através da ligação dela ao CXCR4 as vias de sinalização ERK e PI3K-Akt bem como respostas angiogênicas podem ser ativadas, sobretudo nos estágios mais avançados dessa patologia como verificado no presente estudo onde os doadores de saliva com CCE oral apresentavam tumores de grandes proporções associados a metástases regionais.

Outros estudos relatam o aumento dos níveis de ZG16B em alguns tipos de câncer que não o de pâncreas, como câncer de ovário (KIM et al., 2014), colorretal (BARDERAS et al., 2013) e oral (SASAHIRA et al., 2017) todos eles associando o aumento dos níveis da proteína à mecanismos de invasão e progressão do tumor, ou seja, apenas em casos avançados, de pior prognóstico e comumente associados a metástases.

Tal fato pode ajudar a explicar os níveis menores de ZG16B encontrados nos *pools* de proteínas extraídas da saliva dos pacientes do grupo controle e com LO descritos nesse estudo. No entanto, vale ressaltar que o único trabalho na literatura que cita o aumento dos

níveis da proteína ZG16B no CCE de cavidade oral (SASAHIRA et al., 2017), o fez através de técnicas de imunistoquímica em tecidos de pacientes com câncer oral em estágios avançados quando comparados a pacientes em estágios iniciais e pacientes sem a doença, não verificando também em lesões potencialmente malignas como a LO oral. Portanto, apesar de vários outros trabalhos terem detectado a presença de ZG16B na saliva (VITORINO et al., 2012; HEO et al., 2016) esse é o primeiro trabalho a verificar o aumento dos níveis dessa proteína na saliva de pacientes com CCE de cavidade oral com metástase regional.

Somente em 2011, Kanagawa e colaboradores propuseram a estrutura cristalográfica da proteína ZG16B. O estudo sugere que a proteína, ao contrário da Jacalina que tem afinidade por galactose, tem afinidade por manosídeos. No intuito de confirmar esse resultado e ampliar a possibilidade de interação da ZG16B com outros açúcares, esse trabalho realizou *docking* molecular com monossacarídeos, com glicosaminoglicanos e com N-glicanos. Dentre os monossacarídeos testados, a proteína demonstrou interações favoráveis com manose (KANAGAWA et al., 2011), entretanto verificou-se também a possibilidade de interação com glicose e N-acetilglucosamina. Em relação a galactose o resultado do *docking* mostra uma interação fraca. Experimentos de competição com mono e dissacarídeos mostram que a adição de 10 mM de galactose tem um efeito inibitório fraco da função de ZG16B no que se refere a condensação de enzimas nos grânulos de zimogênio das células acinares pancreáticas, demonstrando a baixa afinidade da proteína pelo açúcar (KLEENE; DARTSCH; KERN, 1999).

Outro resultado importante descrito nesse estudo foi a capacidade da proteína ZG16B ligar-se a oligossacarídeos. A variabilidade estrutural e a complexidade dos glicanos da superfície celular permitem que eles funcionem como moléculas de sinalização, moléculas de reconhecimento e moléculas de adesão. Como tal, os glicanos da superfície celular estão envolvidos em muitas funções fisiológicas e patológicas importantes que incluem desenvolvimento embrionário normal, diferenciação, crescimento, reconhecimento celular, sinalização celular, interação patógeno-hospedeiro durante a infecção, resposta imune do hospedeiro e metástase. Além das alterações genéticas, as alterações fenotípicas também proporcionam às células malignas a capacidade de provocar o crescimento do tumor e metástase através da angiogênese e invasão. As alterações fenotípicas de interesse são as dos glicanos da superfície celular. Quase todos os tipos de células malignas demonstram alterações nos seus padrões de glicosilação quando comparados com células normais (SHIDA et al, 2009). Nosso estudo demonstrou que a ZG16B tem afinidade de ligação por N-glicanos, sobretudo demonstrou capacidade de interagir com glicanos contendo resíduos de manose na posição terminal como mostrado pelos escores relativamente altos com os glicanos high-mannose: Man3, Man5 e Man9. Similarmente, os N-glicanos híbridos testados também apresentaram interações favoráveis com ZG16B devido a presença dos resíduos de manose na posição terminal e o resíduo de ácido siálico não alterou significativamente o escore. Os glicanos complexos, comparativamente com os demais, não interagiram tão fortemente, o que pode ser explicado pela ausência de resíduos de manose na posição terminal.

A desregulação do processo de N-glicosilação é tema comum na gênese de várias patologias e sua relação com o câncer tem sido cada vez mais evidenciada. Em tumores de

origem epitelial (carcinomas) como o CCE avaliado nesse estudo, a progressão e invasão tumoral estão intimamente associadas a mudanças dramáticas no processo de glicosilação de receptores. A literatura aponta evidências de que mudanças pós-traducionais como N-glicosilação no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) em linhagens celulares de carcinomas epidermóides podem ativar o queratinócito e estimular o processo de proliferação celular. Tal fato pode fornecer evidências de como a proteína ZG16B pode agir estimulando o processo de divisão celular no CCE oral, um tipo de carcinoma epidermóide, já que essa proteína é capaz de reconhecer e se ligar a resíduos de N-glicanos (CUMMINGS; SODERQUIST; CARPENTERS, 1985).

Em 2015, um estudo mostrou que um padrão de N-glicosilação aberrante e o aumento da proteína B7-H3 estava associado ao crescimento e invasão de CCE oral e foi verificado um padrão maior de fucosilação nos N-glicanos das células tumorais quando comparados a células normais (CHEN et al., 2015). Tais fatos evidenciam a importância que a proteína ZG16B pode ter na patogênese do CCE de cavidade oral, por se tratar de uma lectina humana que por definição tem a propriedade de reconhecer e se ligar de forma específica e reversível, a carboidratos ou glicoconjugados provavelmente através do seu sítio de reconhecimento a carboidrato (CRD) e a partir disso desencadear algum tipo de resposta biológica como interferências no processo de adesão celular, proliferação celular, angiogênese, etc. Mecanismos esses intimamente ligados ao processo de tumorigênese (KANAGAWA et al., 2011; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Assim como os N-glicanos, os glicosaminoglicanos que são parte da estrutura dos proteoglicanos não são estruturas passivas. Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos lineares, não-ramificados, constituídos de unidades dissacarídicas que se repetem, nas quais um dos resíduos de açúcar é um ácido urônico (idurônico ou glucurônico) e o outro é uma N-acetil-glucosamina ou N-acetil-galactosamina. Eles participam de vários eventos celulares como adesão, migração, proliferação, diferenciação celular, apoptose e angiogênese através da interação entre as moléculas da matriz extracelular e receptores da superfície celular, fatores de crescimento e citocinas específicas, onde, nessa interação essas moléculas podem ativar vias de sinalização celular (BRAUCHLEA et al., 2018).

Vários trabalhos na literatura sugerem que proteínas que tem afinidade de ligação com glicosaminoglicanos podem ativar vias de sinalização e estimular processos de proliferação celular, angiogênese e invasão celular, mecanismos estes importantes na patogênese de neoplasias malignas como o CCE oral. Esse estudo verificou que a proteína ZG16B é capaz de interagir tanto com condroitina sulfato quanto heparan sulfato, dois glicosaminoglicanos intimamente relacionados a mecanismos de sinalização celular em carcinomas de várias origens, o que poderia explicar seu nível aumentado no CCE demonstrado nesse estudo, entretanto vale ressaltar que ensaios experimentais devem ser realizados, sobretudo em linhagens de CCE oral para confirmar essa hipótese (BRAUCHLEA et al., 2018).

Em 1994, uma nova lectina denominada *KM+*, *Artrocarpina* ou *Artin M*, D-manose-específica foi isolada de sementes de *Artocarpus integrifolia* apresentando diferenças da

jacalina, galactose-específica, isolada da mesma espécie vegetal (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994).

Essa nova lectina com capacidade de induzir migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994) teve sua estrutura a estrutura primária descrita e predição de sua estrutura terciária realizada, por ferramentas de bioinformática, no ano de 1999 (ROSA et al., 1999). Sua estrutura cristalográfica foi obtida em 2002, tendo esse estudo sugerido que diferenças no sítio de ligação a carboidratos eram determinantes para diferença de afinidade dos açúcares apresentada pelas duas lectinas. Uma dessas diferenças seria a presença de resíduos aromáticos no sítio de ligação da *Jacalina* (4 resíduos) mas não no sítio de *Artin M* (PRATAP et al., 2002).

Neste projeto de tese, realizou-se uma comparação estrutural entre a *Artin M* e a ZG16B, já que ambas as proteínas tem afinidade por manose e são *Jacalina-like*. Os resultados da sobreposição estrutural dessas duas lectinas, uma humana e a outra vegetal, mostraram que o enovelamento geral apresentado pelas duas lectinas é consideravelmente similar, o que indica que ZG16B apresenta o domínio lectínico *jacalina-like* composto por uma estrutura β -prisma, mas que difere em relação aos resíduos desse sítio (PRATAP et al., 2002).

A literatura mostra diversos estudos em relação as atividades biológicas da lectina de *Artin M* como: indução da migração de neutrófilos (GANIKO et al., 1998), ativação de linfócitos T (BENOIST et al., 2009) e cicatrização de córnea e mucosa *in vivo* e *in vitro* (CHAHUD et al., 2009; KIM et al., 2013; YEH et al., 2017). Em um estudo relacionado a cicatrização de córnea em coelho, foi demonstrado que a lectina promoveu angiogênese após 24 horas após a sua aplicação pelo aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Outro estudo demonstrou que a *Artin M* promove a cicatrização de úlcera em mucosa palatal de ratos pelo aumento de expressão e dos níveis do Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e VEGF (CHAHUD et al., 2009; KIM et al., 2013).

Recentemente, em um estudo que avaliou as vias de sinalização *in vivo* e *in vitro* pela as quais a lectina de *Artin M* promove melhora do processo cicatricial, os autores mostraram que a lectina promoveu angiogênese ativando a via Akt e P38 (YEH et al., 2017). O processo de angiogênese é etapa fundamental do processo de cicatrização, na qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes. Os novos vasos participam da formação do tecido de granulação provisório e suprem de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento (CHAHUD et al., 2009). Entretanto, o processo de neoformação vascular também está ligado ao desenvolvimento de várias doenças entre elas o câncer. No câncer, as células enviam sinais químicos que estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos e isso é essencial para o desenvolvimento, invasão e disseminação do tumor (RAMJIWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017). No câncer de cavidade oral, sobretudo no CCE, o processo de neoformação vascular ocorre através da liberação de várias citocinas entre elas TGF- β e VEGF (RIVERA, 2015). Devido a semelhança estrutural entre as lectinas ZG16B e *Artin M* é possível que os níveis aumentados de ZG16B no CCE de cavidade oral encontrados nesse estudo favoreçam o processo de angiogênese das células tumorais através da liberação de VEGF e TGF- β .

7 CONCLUSÃO

Não houve sucesso na separação de mucina das proteínas totais extraídas da saliva dos pacientes, utilizando a matriz de afinidade BT-Sepharose-4B produzida neste projeto.

A proteína citoqueratina 1 apresentou níveis aumentados no CCE em relação ao grupo LO e controle.

O presente estudo demonstrou pela primeira vez, em amostras de saliva de pacientes com CCE de cavidade oral com metástase regional, o aumento dos níveis da proteína ZG16B quando comparado aos grupos LO e controle.

Através de docking molecular foi confirmada a interação da proteína ZG16B com manose e sua baixa afinidade a galactose e ainda foi constatada também a possibilidade de interação desta proteína com outros monossacarídeos como glicose e N-acetilglucosamina. Nosso estudo também demonstrou que a proteína ZG16B tem afinidade de ligação por glicosaminoglicanos e N-glicanos, e essa capacidade de interação parece estar relacionada a presença de manose na posição terminal.

Através de sobreposição espacial entre proteínas verificamos a similaridade das estruturas de ZG16B e da lectina *Artin M*.

Todos esses achados juntos podem abrir perspectivas para que a proteína ZG16B e citoqueratina 1 possam ser utilizadas como biomarcadores associados ao diagnóstico, prognóstico e/ou monitoramento do CCE de cavidade oral, influenciando diretamente na sobrevivência do paciente e redução nos gastos em saúde pública. Entretanto estudos experimentais em relação a receptores, vias de sinalização, modificações pós-traducionais das proteínas e mecanismos moleculares do processo de progressão tumoral com o auxílio dos dados de bioinformática gerados nesse trabalho são necessários para compreender melhor o papel da proteína na patogênese do CCE oral.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, V.R. MONTORO, J.R. D.M. C.; FREITAS, L.C.C.; SAGGIORO, F.P.; SOUZA, L.; MAMEDE, R.C.M. Peritumoral infiltrate in the prognosis of epidermoid carcinoma of the oral cavity. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, Sao Paulo, v.81, n.4, p. 416-421, 2015.
- AHRENS, C.H.; BRUNNER, E.; QELI, E.; BASLER, K.; AEBERSOLD, R. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. **Nature reviews Molecular cell biology**, London, v. 11, n. 11, p. 789, 2010.
- AINONZ I.L.; SAMPAIO A.H; FREITAS A.L.P; BENEVIDES N.M.B ;MAPURUNGA S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal (Brazil)**, Londrina, v.7, p. 15–19, 1995.
- ANIL, S.; REMANI, P.; BEENA, V.T.; NAIR, R.G.; VIJAYAKUMAR, T. Immunoglobulins in the saliva of diabetic patients with periodontitis. **Annals of dentistry**, New York, v. 54, n. 1-2, p. 30-33, 1995.
- ARDUINO, P.G. SURACE, A.; CARBONE, M.; ELIA, A.; MASSOLINI, G.; GANDOLFO, S.; BROCCOLETTI, R. Outcome of oral dysplasia: a retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. **Journal of oral pathology & medicine**, Copenhagen, v. 38, n. 6, p. 540-544, 2009.
- ARDUINO, P.G.; BAGAN, J.; EL-NAGGAR A.K.; CARROZZO, M. Urban legends series: oral leukoplakia. **Oral diseases**, Houndmills, v. 19, n. 7, p. 642-659, 2013.
- ARELLANO-GARCIA, M.E.; HU, S.; WANG, J.; HENSON, B.; ZHOU, H.; CHIA, D.; WONG, D.T. Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. **Oral diseases**, Houndmills, v. 14, n. 8, p. 705-712, 2008.
- ASLAM B, BASIT M, NISAR MA, MUHAMMAD MK, RASOOL H. Proteomics: Technologies and Their Applications. **Journal of chromatographic science**, Niles, v. 55, n. 2, p. 182-196, 2017.
- BARDERAS R., MENDES M., TORRESA S., BARTOLOME R. A., LOPEZ-LUCENDO M., VILLAR-VAZQUEZ R., PELAEZ-GARCÍA A., FUENTE E., BONILLAK F., CASALA J. I. In-depth Characterization of the Secretome of Colorectal Cancer Metastatic Cells Identifies Key Proteins in Cell Adhesion, Migration, and Invasion. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 12, n. 6, p. 1602-1620, 2013.
- BEN Y, W.U. S., HANCOCK W.S. *Glycobiology*. 2006; 16:514–523. [PubMed: 16497783]

BEN-ARYEH, H.; SPIELMAN, A.; SZARGEL, R.; GUTMAN, D.; SCHARF, J.; NAHIR M.; Scharf, Y. Sialochemistry for diagnosis of Sjogrens syndrome in xerostomic patients. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, St. Louis, v. 52, n. 5, p. 487-490, 1981.

BENOIST H., CULERRIER R.L., POIROUX G., GUI B.S., JAUNEAU A., VAN DAMME ELS J. M., PEUMANS W. J., BARRE A., ROUGE P. Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display diferente effects on human T lymphocyte activation and cell death. **Journal of leukocyte biology**, Winston-Salem, v. 86, n. 1, p. 103-114, 2009.

BISCH, P. M. Genômica Funcional: Proteômica. **Genômica. São Paulo: Atheneu**, p. 1391162, 2004.

BJELLQVIST, B; EK, K.; RIGHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; GÖRG, A.; WESTERMEIER, R.; POSTEL, W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **Journal of biochemical and biophysical methods**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 317-339, 1982. BRADFORD, M. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA: **Estimativa: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: 2016.

BRAUCHLEA E.; KASPERA J.; DAUMA R.; SCHIERBAUM N.; FALCHE C.; KIRSCHNIAKE A.; SCHÄFFER T. E.; SCHENKE-LAYLANDA K. Biomechanical and biomolecular characterization of extracelular matrix structures in human colon carcinomas. **Matrix Biology**, Stuttgart, 2018.

BRENER, S.; JEUNON, F.A.; BARBOSA, A.A.; GRANDINETTI, H.D.A.M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 1, p. 63-9, 2007.

BROCKHAUSEN, I.; SCHACHTER, H.; STANLEY, P. Chapter 9: O-GalNAc glycans, in: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al., **Essentials of Glycobiology**, 2nd edition, Cold Spring Harbor., New York, 2009.

CAMISASCA D.R., GONÇALVES L.R., SOARES M.R., SANDIM V., NOGUEIRA F.C.S., GARCIA C.H.S., SANTANA R., OLIVEIRA S.P, BUEXM L.A, FARIA P.A.S, DIAS F.L, PEREIRA D.A, ZINGALI R.B., ALVES G., LOURENÇO S.Q.C. A proteomic approach to compare saliva from individuals with and without oral leukoplakia. **Journal of Proteomics**, [S.l.] (sem local), v. 151, p. 43–52, 2017.

CASE, D.A.; DARDEN, T.A.; CHEATHAM, T.E.; SIMMERLING, C.L.; WANG, J.; DUKE, R.E.; MERZ, K.M. Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER) 12. **University of California, San Francisco**, 2012.

CAVALCANTE, A.S.; ANBINDER, A.L.; CARVALHO Y.R. Actinic cheilitis: clinical and histological features. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Edinburgh, v. 66, n. 3, p. 498-503, 2008.

CHAHUD, F.; RAMALHO, L.N.Z.; RAMALHO, F.; HADDAD, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. **International journal of experimental pathology**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 166-173, 2009.

CHEN, D.X.; SCHWARTZ, P.E.; LI, F.Q. Saliva and serum CA 125 assays for detecting malignant ovarian tumors. **Obstetrics and gynecology**, Hagerstown, v. 75, n. 4, p. 701-704, 1990.

CHEN, J.; HE, Q.Y.; YUEN, A.P.W.; CHIU, J.F. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 8, p. 2465-2475, 2004.

CHEN, J.T.; CHEN, C.H.; KUE, K.L.; HSIAO, M.; CHIANG, C.P.; HSU, T.L.; CHEN M.H.; WONG, C.H. Glycoprotein B7-H3 overexpression and aberrant glycosylation in oral cancer and immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 112, n. 42, p. 13057-13062, 2015.

CHENG, Yi-S. L.; REES, T.; WRIGHT, J. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. **Clinical and translational medicine**, [S.l.] (sem local), v. 3, n. 1, p. 3, 2014.

CHIAPPIN, S.; ANTONELLI, G.; GATTI, R.; DE PALO, E.F. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica chimica acta**, Amsterdam, v. 383, n. 1-2, p. 30-40, 2007.

CHRISTIAN, D. C. Computer-assisted analysis of oral brush biopsies at an oral cancer screening program. **The Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 133, n. 3, p. 357-362, 2002.

COELHO, L.C.B.B.; SANTOS, A.F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G. **Protein purification by affinity chromatography**, [S.l.] (sem local), In: Ahmad, R. (ed.) Protein Purification. Rijeka: InTech, 2012. p. 53-72.

COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? **Cell**, Cambridge, v. 130, n. 3, p. 395-398, 2007.

CRONSHAGEN, U.; VOLAND, P.; KERN, H.F. cDNA cloning and characterization of a novel 16 kDa protein located in zymogen granules of rat pancreas and goblet cells of the gut, **European journal of cell biology**, Stuttgart, v. 65, n. 2, p. 366-377, 1994.

CUMMINGS, R.D.; SODERQUIST, A.M.; CARPENTERS, G. The Oligosaccharide Moieties of the Epidermal Growth Factor Receptor in A-431 Cells. Presence of complex-type N-linked chains that contain terminal N-acetylgalactosamine residues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, n. 22, p. 11944-11952, 1985.

DAN, X.; LIU, W.; NG, T.B. Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research. **Medicinal research reviews**, New York, v. 36, n. 2, p. 221-247, 2016.

DAWES C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. **The Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 139, p. 18S-24S, 2008.

DAWES, C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. **The Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 139, p. 18S-24S, 2008.

De JONG, E.P.; XIE, H.; ONSONGO, G.; STONE, M.D.; CHEN, X.B.; KOOREN JA.; REFSLAND, E.W.; GRIFFIN, R.J.; ONDREY, F.G.; WU, B.; LE, C.T.; RHODUS, N.L.; CARLIS, J.V.; GRIFFIN, T.J. Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. **PloS one**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. e11148, 2010.

De RISI, J.; PENLAND, L.; BROWN, P.O.; BITTNER, M.L.; MELTZER, P.S.; RAY M.; CHEN, Y.; SU, Y.A.; TRENT, J.M. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. **Nature Genetics**, New York, v. 14, p. 457-460, 1996.

FABIAN, T. K.; FEJERDY, P.; CSERMELY, P. Salivary Genomics, Transcriptomics and Proteomics: The Emerging Concept of the Oral Ecosystem and their Use in the Early Diagnosis of Cancer and other Diseases. **Current Genomics**, [S.l.] (sem local), v. 9, n. 1, p. 11-21, 2008.

FULLWOOD, M.J.; WEI, C.L.; LIU, E.T.; RUAN, Y. Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. **Genome research**, New York, v. 19, n. 4, p. 521-532, 2009.

GAETTI-JARDIM, E.C. PEREIRA, C.C.S.; GUASTALDI, F.P.S.; SHINOHARA, É.H.; GARCIA-JÚNIOR JÚNIOR, I.R.; GAETTI JARDIM JÚNIOR, E. Carcinoma de células escamosas de grandes dimensões. **Revista Odontologica de Araçatuba**, Araçatuba, v. 31, n. 2, p. 9-13, 2010.

GANIKO, L.; MARTINS, A.R.; ESPREAFICO, E.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM⁺. **Glycoconjugate journal**, London, v. 15, n. 5, p. 527-530, 1998.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S.B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**, Jena, v. 113, n. 3, p. 236-247, 2011.

GIUDICE, F.S., SQUARIZE, C.H. The determinants of head and neck cancer: unmasking the PI3K pathway mutations. **Journal of carcinogenesis & mutagenesis**, [S.l.] (sem local), v. 85, n. 1, p. 1-15, 2013.

GONZALEZ, M.; BANDERAS, J.A.; BAEZ, A.; BELMONT, R. Salivary lead and cádmium in a young population residing in Mexico city. **Toxicology letters**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 55-64, 1997.

- GSTAIGER, M.; AEBERSOLD, R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, n. 9, p. 617, 2009.
- GUPTA, P.C. Leukoplakia and incidence of oral cancer. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v. 18, n. 1, p. 17-17, 1989.
- GYGI, S.P.; RIST, B.; GERBER, S.A.; TURECEK, F.; GELB, M.H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature biotechnology**, New York, v. 17, n. 10, p. 994, 1999.
- GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 19, n. 3, p. 1720-1730, 1999.
- HA, P.K.; Ha, P.K.; Chang, S.S.; Glazer, C.A.; Califano, J.A.; Sidransky, D. Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. **Oral oncology**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 335-339, 2009.
- HAN, J.W.; JUNG, M.G.; SHIM, E.Y.; SHIM, J.B.; KIM, Y.M.; KIM, G.H. Functional recombinants designed from a fetuin/asialofetuin-specific marine algal lectin, rhodobindin. **Marine drugs**, [S.l.] (sem local), v. 13, n. 4, p. 2183-2195, 2015.
- HARDT, M.; WITKOWSKA, H.E.; WEBB, S.; THOMAS, L.R.; DIXON, S.E.; Hall SC.; FISHER, S.J. Assessing the effects of diurnal variation on the composition of human parotid saliva: quantitative analysis of native peptides using iTRAQ reagents. **Analytical chemistry**, Washington, v. 77, n. 15, p. 4947-4954, 2005.
- HASSAN, M.A.; ROUF, R.; TIRALONGO, E.; MAY, T.W.; TIRALONGO, J. "Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease." **International journal of molecular sciences**, [S.l.] (sem local), v. 16, n. 4, p. 7802-7838, 2015.
- HE, Q.Y.; He, Q.Y.; Chen, J.; Kung, H.F.; Yuen, A.P.W.; Chiu, J.F. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 1, p. 271-278, 2004.
- HENSKENS, Y.M.; VEERMAN, E.C.; MANTEL, M.S.; VAN der VELDEN, U. Nieuw Amerongen AV. Cystatins S and C in human whole saliva and in glandular saliva in periodontal health and disease. **Journal of dental research**, Ahmedabad, v. 73, n. 10, p. 1606-1614, 1994.
- HEO, S.M.; LEE, S.; WANG, H.T.; JEONG, H.J., WOOK, OH, S. Levels of common salivary protein 1 in healthy subjects and periodontal patients. **Journal of periodontal & implant science**, [S.l.] (sem local), v. 46, n. 5, p. 320-328, 2016.
- HIRTZ, C.; Chevalier, F.; Centeno, D.; Egea, J.C.; Rossignol, M.; Sommerer, N.; De Périère, D. Complexity of the human whole saliva proteome. **Journal of physiology and biochemistry**, Pamplona, v. 61, n. 3, p. 469, 2005.

HO, P.S.; CHEN, P.L.; WARNAKULASURIYA, S.; SHIEH, T.Y.; CHEN, Y.K.; HUANG, I.Y. Malignant transformation of oral potentially malignant disorders in males: a retrospective cohort study. **Bmc Cancer**, London, v. 9, n. 1, p. 260, 2009.

HU, Q.; NOLL, R.J.; LI, H.; MAKAROV, A.; HARDMAN, M.; GRAHAM COOKS, R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. **Journal of mass spectrometry**, Chichester, v. 40, n. 4, p. 430-443, 2005.

HU, S.; ARELLANO, M.; BOONTHEUNG, P.; WANG, J.; ZHOU, H.; JIANG, J.; ELASHOFF, D.; WEI, R.; LOO, J.A.; WONG, D.T. Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 14, n. 19, p. 6246-6252, 2008.

HU, S.; LOO, J. A.; WONG, D. T. Human body fluid proteome analysis. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 23, p. 6326-6353, 2006.

HUMPHREY, S.P.; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 85, n. 2, p. 162-169, 2001.

ISFOR, R.J. Proteomics analysis of striated muscle. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 771, n. 1-2, p. 155-165, 2002.

ISSAQ, H.; VEENSTRA, T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. **Biotechniques**, Natick, v. 44, n. 5, p. 697, 2008.

JESSIE, K.; JAYAPALAN, J. J.; ONG, K.O.; RAHIM, Z. H. A.; ZAIN, R. M.; WONG, K. T.; HASHIM, O. H. Aberrant proteins in the saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 34, n. 17, p. 2495-2502, 2013.

JOHN, M.A.R.ST.; LI, Y.; ZHOU, X.; DENNY, P.; HO, C. M.; MONTEMAGNO, C.; SHI, W.; QI, F.; WU, B.; SINHA, U.; JORDAN, R.; WOLINSKY, L.; PARK, N.H.; LIU, H.; ABEMAYOR, E.; WONG, D.T.W. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, Chicago, v. 130, n. 8, p. 929-935, 2004.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. **Journal of molecular biology**, London, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

KACZOR-URBANOWICZ, K.E.; MARTIN CARRERAS-PRESAS, C.; ARO, K.; TU, M.; GARCIA-GODOY, F.; WONG, D.T. Saliva diagnostics – Current views and directions. **Experimental Biology and Medicine**, Basel, v. 242, n. 5, p. 459-472, 2017.

KANAGAWA, M.; SATOH, T.; IKEDA, A.; NAKANO, Y.; YAGI, H.; KATO, K.; KOJIMA-AIKAWA, K.; YAMAGUCHI, Y. Crystal structures of human secretory proteins ZG16p and ZG16b reveal a Jacalin-related b-prism fold. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 404, n. 1, p. 201-205, 2011.

KANSHIN, E.; THIBAUT, P. Efficient sample processing for proteomics applications—Are we there yet? **Molecular Systems Biology**, Menlo Park, v.10, n. 758, p. 1, 2014.

KIM, S.A.; LEE, Y.; JUNG, D.E.; PARK, K.H.; PARK, J.Y.; GANG, J.; JEON, S.B.; PARK, E.C.; KIM, Y.G.; LEE, B.; LIU, Q.; ZENG, W.; YERAMILI, S.; LEE, S.; KOH, S.S.; SONG, S.Y. Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF), a novel up-regulated secretory protein in pancreatic ductal adenocarcinoma, **Cancer science**, Tokyo, v. 100, n. 5, p. 828-836, 2009.

KIM, S.J.; LEE, Y.; KIM, N.Y.; HWANG, Y.; HWANG, B.; MIN, J.K.; KOH, S.S. Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor, a novel endothelial activator, promotes angiogenesis and vascular permeability. **Oncogene**, Basingstoke, v. 32, n. 31, p. 3638, 2013.

KIM, S.K.; SONG, S.Y.; KIM, S.; CHO, N.H.; YIM, G.W.; KIM, S.W.; KIM, Y.T.; NAM, E.J. Association of pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor expression in ovarian mucinous adenocarcinoma with poor prognosis. **International journal of clinical and experimental pathology**, [S.l.] (sem local), v. 7, n. 8, p. 5103, 2014.

KIM, Y.J.; CARVALHO, F.C.; SOUZA, J.A.; GONÇALVES, P.C.; NOGUEIRA, A.V.; SPOLIDÓRIO, L.C.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; CIRELLI, J.A. Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF- β and VEGF production. **Wound Repair and Regeneration**, Saint Louis, v. 21, n. 3, p. 456-463, 2013.

KIRSCHNER, K.N.; YONGYE, A.B.; TSCHAMPEL, S.M.; González-Outeiriño, J.; Daniels, C.R.; Foley, B.L.; Woods, R.J. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. Carbohydrates. **Journal of computational chemistry**, [S.l.] (sem local), v. 29, n. 4, p. 622-655, 2008.

KLEENE, R.; DARTSCH, H.; KERN, H.F. The secretory lectin ZG16p mediates sorting of enzyme proteins to the zymogen granule membrane in pancreatic acinar cells. **European journal of cell biology**, Stuttgart, v. 78, n. 2, p. 79-90, 1999.

KOZAKI, K.I.; IMOTO, I.; PIMKHAOKHAM, A.; HASEGAWA, S.; TSUDA, H.; OMURA, K.; INAZAWA, J. PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. **Cancer science**, Tokyo, v. 97, n. 12, p. 1351-1358, 2006.

KRIEF, G.; DEUTSCH, O.; ZAKS, B.; WONG, D.T.; AFRAMIAN, D.J.; PALMON, A. Comparison of diverse affinity based high-abundance protein depletion strategies for improved bio-marker discovery in oral fluids. **Journal of proteomics**, [S.l.] (sem local), v. 75, n. 13, p. 4165-4175, 2012.

KRIEF, G.; DEUTSCH, O.; ZAKS, B.; WONG, D.T.; AFRAMIAN, D.J.; PALMON, A. Comparison of diverse affinity based high-abundance protein depletion strategies for improved bio-marker discovery in oral fluids. **Journal of proteomics**, [S.l.] (sem local), v. 75, n. 13, p. 4165-4175, 2012.

LEE, Y.H.; WONG, D.T.; Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. **American journal of dentistry**, San Antonio, v. 22, n. 4, p. 241, 2009.

LI, C.; HÁ, T.; FERGUSON, D.A.; CHI, D.S.; ZHAO, R.; PATEL, N.R.; KRISHNASWAMY, G.; THOMAS, E. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. **Digestive diseases and sciences**, New York, v. 41, n. 11, p. 2142-2149, 1996.

LIU, J.; DUAN, Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. **Oral oncology**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 569-577, 2012.

LU, Y. C.; BENTLEY, G.R.; GANN, P.H.; HODGES, K.R.; CHATTERTON, R.T. Salivary estradiol and progesterone levels in conception and nonconception cycles in women: evaluation of a new assay for salivary estradiol. **Fertility and sterility**, New York, v. 71, n. 5, p. 863-868, 1999.

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, St. Louis, v. 79, n. 3, p. 321-329, 1995.

MANDEL, I.D.; KUTSCHER, A.; DENNING, C.R.; THOMPSON JR, R.H.; ZEGARELLI, E.V. Salivary studies in cystic fibrosis. **Am J Dis Child**, Chicago, v. 113, n. 4, p. 431-438, 1967.

MARTIN-HERNAN, F.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, J.G.; CANO, J.; CAMPO, J.; DEL ROMERO, J. Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, Valencia, v. 18, n. 3, p. e439, 2013.

MASEDA, C.; HAMA, K.; FUKUI, Y.; MATSUBARA, K.; TAKAHASHI, S.; AKANE A. Detection of delta 9-THC in saliva by capillary GC/ECD after marijuana smoking. **Forensic science international**, Lausanne, v. 32, n. 4, p. 259-266, 1986.

MASSANO, J.; Regateiro, F.S.; Januário, G.; Ferreira, A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, St. Louis, v. 102, n. 1, p. 67-76, 2006.

MESE, H.; MATSUO, R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. **Journal of oral rehabilitation**, Oxford, v. 34, n. 10, p. 711-723, 2007.

MORAL M., PARAMIO J. M. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. **Histology and histopathology**, Murcia, v. 23, n. 10, p. 1269-1278, 2008.

MUSUMECI, V.; CHERUBINI, P.; ZUPPI, C.; ZAPPACOSTA, B.; GHIRLANDA, G.; DI SALVO, S. Aminotransferases and lactate dehydrogenase in saliva of diabetic patients. **Journal of oral pathology & medicine**, Copenhagen, v. 22, n. 2, p. 73-76, 1993.

NAGANO, C.S.; DEBRAY, H.; NASCIMENTO, K.S.; PINTO, V.P.T.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, S.S.; FARIAS, W.L.R.; SAMPAIO, A.; CALVETE, J.J. HCA and HML isolated

from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin Family. **Protein Science**, New York, v. 14, n. 8, p. 2167-2176, 2005.

NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS-FILHO, T.G.; PONTUAL, E.V.; FERREIRA, R.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Affinity Matrices of *Cratylia mollis* Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein Mixtures. **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, v. 171, n. 3, p. 744-755, 2013.

NASCIMENTO, K.S.; NASCIMENTO, F.L.F.; SILVA, M.T.L.; NOBRE, C.B.; MOREIRA, C.G.; BRIZENO, L.A.C.; DA PONTE, E.L.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Purification of a thermostable antinociceptive lectin isolated from *Andira anthelmia*. **Journal of Molecular Recognition**, London, v. 29, n. 6, p. 248-252, 2016.

NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 694, n. 1, p. 72-77, 1993.

O'FARRELL, P.H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Protein. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OHSHIRO, K.; ROSENTHAL, D.I.; KOOMEN, J.M.; STRECKFUS, C.F.; CHAMBERS, M.; KOBAYASHI, R.; EL-NAGGAR, A.K. Proteomic analysis of saliva in head and neck squamous carcinoma. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 30, p. 743-749, 2007.

OHSHIRO, K.; ROSENTHAL, D.I.; KOOMEN, J.M.; STRECKFUS, C.F.; CHAMBERS, M.; KOBAYASHI R.; EL-NAGGAR, A.K. Pre-analytic saliva processing affect proteomic results and biomarker screening of head and neck squamous carcinoma. **International journal of oncology**, Athens, v. 30, n. 3, p. 743-749, 2007.

ONG, S.E.; BLAGOEV, B.; KRATCHMAROVA, I.; KRISTENSEN, D.B.; STEEN, H.; PANDEY, A.; MANN, M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. **Molecular & cellular proteomics**, Bethesda, v. 1, n. 5, p. 376-386, 2002.

PARK, H.D.; LEE, Y.; OH, Y.K.; JUNG, J.G.; PARK, Y.W.; MYUNG, K.; KIM, K.H.; KOH, S.S.; LIM, D.S. Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor promotes metastasis by regulating TLR/CXCR4 activation. **Oncogene**, Basingstoke, v. 30, n. 2, p. 201, 2011.

PARKER, B.L.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; SOLIS, N.; SCOTT, N.E.; LARSEN, M.R.; GRAHAM, M.E.; PACKER, N.H.; CORDWELL, S.J. Site-specific glycan-peptide analysis for determination of N-glycoproteome heterogeneity. **Journal of proteome research**, Washington, v. 12, n. 12, p. 5791-5800, 2013.

PEDRERO, J.M.G.; CARRACEDO, D.G.; PINTO, C.M.; ZAPATERO, A.H.; RODRIGO, J.P.; NIETO, C.S.; GONZALES, M.V. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. **International journal of cancer**, New York, v. 114, n. 2, p. 242-248, 2005.

- PEREZ-RIVEROL, Y.; ALPI, E.; WANG, R.; HERMIAKOB, H.; VIZCAINO, J.A. Making proteomics data accessible and reusable: current state of proteomics databases and repositories; *Proteomics*, (2015); 15(5-6): 930 – 949. **Proteomics**, Weinheim, v. 15, n. 5-6, p. 930-950, 2015.
- PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. **Oral oncology**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 340-350, 2009.
- PETTI, S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. **Oral oncology**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 770-780, 2003
- PRADO, S.M.D.; CEDRÚN, J.L.L.; REY, R.L.; VILLAAMIL, V.M.; GARCÍA, A.Á.; AYERBES, M.V.; APARICIO, L.A. Evaluation of COX-2, EGFR, and p53 as biomarkers of non-dysplastic oral leukoplakias. **Experimental and molecular pathology**, New York, v. 89, n. 2, p. 197-203, 2010.
- PRATAP, J.V.; JEYAPRAKASH, A.A.; RANI, P.G.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Crystal Structures of Artocarpin, a Moraceae Lectin with Mannose Specificity, and its Complex with Methyl- α -D-mannose: Implications to the Generation of Carbohydrate Specificity. **Journal of molecular biology**, London, v. 317, n. 2, p. 237-247, 2002.
- RAMJAWAN, R.R.; GRIFFIOEN, A.W.; DUDA, D.G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy?. **Angiogenesis**, London, v. 20, n. 2, p. 185-204, 2017.
- RIVERA C. Essentials of oral câncer. **International journal of clinical and experimental pathology**, [S.l.] (sem local), v. 8, n. 9, p. 11884, 2015.
- RIVERSOS, A.C.G. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. 2009. 111 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.O.; BELTRA-MINI, L.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **The Journal of Immunology**, [S.l.] (sem local), v. 153, n. 4, p. 1798-1807, 1994.
- SASAHIRA, T.; KURIHARA, M.; NISHIGUCHI, Y.; NAKASHIMA, C.; KIRITA, T.; KUNIYASU, H. Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor has oncogenic functions in oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, Oxford, v. 70, n. 4, p. 539-548, 2017.
- SASSI, L.M.; OLIVEIRA, B.V.; PEDRUZZI, P.A.G.; RAMO, G.H.A.; STRAMANDINOLI, R.T.; GUGELMIN, G.; SALOMÃO, F.S. Carcinoma espinocelular de boca em paciente jovem: relato de caso e avaliação dos fatores de risco. **RSBO (Online) Odontol**, v. 7, n. 1, p. 105-109, 2010.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHEARER B.H., MCMILLAN M.D., JENKINSON H.F. Differential expression of type I cytokeratins in hamster cheek pouch epithelium following treatment with dimethylbenzanthracene. **Journal of oral pathology & medicine**, Copenhagen, v. 26, n. 10, p. 470-476, 1997.

SHEVCHENKO, A.; THOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, London, v. 1, n. 6, p. 2856, 2006

SHIDA, K.; MISONOU, Y.; KOREKANE, H; SEKI, Y; NOURA, S.; OHUE, M.; HONKE, K.; MIYAMOTO, Y. Unusual accumulation of sulfated glycosphingolipids in colon cancer cells. **Glycobiology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 1018-1033, 2009.

SOTSIOS, Y.; WHITTAKER, G. C.; WESTWICK, J.; WARD, S.G. The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, [S.l.] (sem local), v. 163, n. 11, p. 5954-5963, 1999.

STANLEY P, SCHACHTER H, TANIGUCHI. N. Chapter 8: N-Glycans, in: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al., **Essentials of Glycobiology**, 2nd edition, Cold Spring Harbor., New York, 2009.

STRECKFUS, C.; BIGLER, L.; DELLINGER, T.; DAI, X.; KINGMAN, A.; THIGPEN, J.T. The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 6, n. 6, p. 2363-2370, 2000.

SUH, K.I.; LEE, J.Y.; CHUNG, J.W.; KIM, Y.K.; KHO, H.S. Relationship between salivary flow rate and clinical symptoms and behaviours in patients with dry mouth. **Journal of oral rehabilitation**, Oxford, v. 34, n. 10, p. 739-744, 2007.

SYRJÄNEN, S.; LODI, G.; VON BULTZINGSLOWEN, I.; ALIKO, A.; ARDUINO, P.; CAMPISI, G.; CHALLACOMBE, S.; FICARRA, G.; FLAITZ, C.; ZHOU, H.M.; MAEDA, H.; MILLER, C.; JONTELL, M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: A systematic review. **Oral diseases**, Houndmills, v. 17, n. s1, p. 58-72, 2011.

TATENO, H.; YABE, R.; SATO, T.; SHIBAZAKI, A.; SHIKANAI, T.; GONOI, T.; NARIMATSU, H.; HIRABAYASHI, J. "Human ZG16p recognizes pathogenic fungi through non-self polyvalent mannose in the digestive system **Glycobiology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 210-220, 2011.

THEVENOD, F.; BRAUN, M.; ROUSSA, E.; FULLER, C.M. "Molecular characterisation of pancreatic zymogen granule ion channel and regulator proteins involved in exocytosis." **Journal of Korean medical science**, Seoul, v. 15, n. Suppl, p. S51-S52, 2000.

VALLEDOR, L.; JORRIN, J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental

design and statistical analyses. **Journal of proteomics**, [S.l.] (sem local), v. 74, n. 1, p. 1-18, 2011.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, n. 5235, p. 484-487, 1995

VITORINO, R.; GUEDESA, S.; MANADASC, B.; FERREIRA, R.; AMADO, F. Toward a standardized saliva proteome analysis methodology. **Journal of proteomics**, [S.l.] (sem local), v. 75, n. 17, p. 5140-5165, 2012.

WANG, K; PENG E.D; HUANG A.S; XIA D;. VERMONT S.J; LENTINI G; LEBRUN M; WASTLING J.M; BRADLEY P.J. Identification of Novel O-Linked Glycosylated Toxoplasma Proteins by Vicia villosa Lectin Chromatography. **PloS one**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. e0150561, 2016.

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v. 45, n. 3, p. 155-166, 2016.

WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, n. 1, p. 1090-1094, 1995.

WINCK, F.V.; RIBEIRO, A.C.P.; DOMINGUES, R.R.; LING, L.Y.; RIAÑO-PACHÓN, D.M.; RIVERA, C.; BRANDÃO, T.B.; GOUVEA, A.F.; SANTOS-SILVA A.R.; COLETTA, R.D.; LEME, A.F.P. Insights into immune responses in oral cancer through proteomic analysis of saliva and salivar extracellular vesicles. **Scientific reports**, [S.l.] (sem local), v. 5, p. 16305, 2015.

WONG, D.T. Salivary diagnostics for oral cancer. **Journal of the California Dental Association**, Sacramento, v. 34, n. 4, p. 303-308, 2006.

WU, J.Y.; YI, C.; CHUNG, H.R.; WANG, D.J.; CHANG, W.C.; LEE, SY.; LIN, C.T.; YANG, Y.C.; YANG, W.C.V. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 226-231, 2010..

XIA, J.; CHEN, N.; HONG, Y.; CHEN, X.; TAO, X.; CHENG, B.; HUANG, Y. Expressions of CXCL12/CXCR4 in Oral Premalignant and Malignant Lesions. **Mediators of inflammation**, New York, v. 2012, 2012.

YANG, L.L.; LIU, X.Q.; LIU, W.; CHENG, B.; LI, M.T. Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. **Inflammation research**, Basel, v. 55, n. 10, p. 405-407, 2006.

YANG, Y.; RHODUS, N.L.; ONDREY, F.G.; WUERTZ, B.R.K.; CHEN, X.; ZHU, Y.; GRIFFIN, T.J. Quantitative Proteomic Analysis of Oral Brush Biopsies Identifies Secretory

Leukocyte Protease Inhibitor as a Promising, Mechanism-Based Oral Cancer Biomarker. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e95389, 2014.

YEH, C.J.; CHEN, C.C.; LEU, Y.L.; LIN, M.W.; CHIU, M.M.; WANG, S.H. The effects of artocarpin on wound healing: in vitro and in vivo studies. **Scientific reports**, [S.l.] (sem local), v. 7, n. 1, p. 15599, 2017.

YOSHIDA K., SATO K., TONOGI M., TANAKA Y., YAMANE G.Y., KATAKURA A.. Expression of cytokeratin 14 and 19 in process of oral carcinogenesis. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, [S.l.] (sem local), v. 56, n. 2, p. 105-111, 2015.

ZHANG, D.; LU, C.; AI, H. Rab5a is overexpressed in oral cancer and promotes invasion through ERK/MMP signaling. **Molecular medicine reports**, [S.l.] (sem local), v. 16, n. 4, p. 4569-4576, 2017.

ZHAO, J.; QIU, W.; SIMEONE, D.M.; LUBMAN, D.M. **Journal Proteome Res**, Washington, v. 6, p. 1126-1138, 2007.

ZHOU, Y.B.; CAO, J.B.; YANG, H.M.; ZHU, H.; XU, Z.G.; WANG, K.S.; ZHANG, X.; WANG, Z.Q.; HAN, Z.G. Hgz16, a novel human secreted protein expressed in liver, was down-regulated in hepatocellular carcinoma. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 355, n. 3, p. 679-686, 2007.

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado Análise proteômica de saliva de pacientes com lesões potencialmente malignas e carcinoma de células escamosas intraorais e de lábio.

Para tanto, necessitaremos de fragmentos de tecido de pacientes que possuam essas alterações, para que possamos compará-las. Durante o procedimento de biópsia, serão removidos dois fragmentos de tecido da região da lesão, sendo seguido de sutura local, além de coleta de aproximadamente 5 ml de saliva. Este procedimento não trará nenhum prejuízo à cicatrização nem trará qualquer desconforto adicional.

Neste estudo, não há benefício financeiro para o participante. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento na Instituição. Será guardado sigilo total sobre suas informações. Os dados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Luiz André Cavalcante Brizeno, que pode ser encontrado no Laboratório de Biotecnologia de Recursos Naturais Campus Universitário do Pici, Bloco 871, Departamento de Engenharia de Pesca, Rua José Aurélio Câmara, s/n, Fortaleza-Ce CEP: 60440-970. Telefone: 33669221.

O presente trabalho foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, que se localiza à Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 e cujo telefone para contato é 3366-8344.

Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações e concorde em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

 Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

 Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCALRECIDO 2

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado Análise proteômica de saliva de pacientes com lesões potencialmente malignas e carcinoma de células escamosas intraorais e de lábio.

Para tanto, necessitaremos de amostra de saliva de pacientes que não possuam essas alterações, para que possamos compará-los. Durante o exame odontológico, será coletado aproximadamente 5 ml de saliva. Este procedimento não trará nenhum prejuízo à cicatrização nem trará qualquer desconforto adicional.

Neste estudo, não há benefício financeiro para o participante. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento na Instituição. Será guardado sigilo total sobre suas informações. Os dados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Luiz André Cavalcante Brizeno, que pode ser encontrado no Laboratório de Biotecnologia de Recursos Naturais Campus Universitário do Pici, Bloco 871, Departamento de Engenharia de Pesca, Rua José Aurélio Câmara, s/n Fortaleza-Ce CEP: 60440-970. Telefone: 33669221.

O presente trabalho foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, que se localiza à Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 e cujo telefone para contato é 3366-8344.

Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações e concorde em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /