MILENA MONTEIRO DE SOUZA ANTUNES

**O envolvimento das glândulas salivares na doença do enxerto contra o hospedeiro:
estudo bioquímico e análise proteômica**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Antunes, Milena Monteiro de Souza

O envolvimento das glândulas salivares na doença do enxerto contra o hospedeiro: estudo bioquímico e análise proteômica / Milena Monteiro de Souza Antunes. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientadora: Silvia Vanessa Lourenço.

Descritores: 1.Proteômica 2.Transplante de medula óssea 3.Doença enxerto-hospedeiro 4.Saliva 5.Espectrometria de massas 6.Biomarcadores

USP/FM/DBD-125/17

DEDICATÓRIA

A Deus, que me capacitou em cada fase da minha vida, iluminando e guiando os meus caminhos, permitindo desta forma a conclusão de mais uma etapa.

Ao meu querido marido e companheiro, **Cesar**, por me incentivar a ser uma pessoa cada vez melhor, pela compreensão nos momentos difíceis e por todo amor. Sou grata a Deus por sua vida.

Aos melhores pais, **Antônio e Sonia**, se hoje estou concluindo uma nova etapa é porque vocês deram o melhor de vocês para que isso acontecesse. Obrigada pelo incentivo, educação, por todo o tempo de dedicação e carinho.

Aos meus queridos avós, **Antônio e Eunice**, sempre presente em minha vida. Obrigada pelo amor e carinho.

À minha orientadora e amiga, **Dra. Silvia Vanessa Lourenço**, por respeitar o meu tempo de amadurecimento na pesquisa. Pelo apoio, sempre ouvindo e compreendendo não só a mim, mas como todos seus alunos. Você faz parte do meu crescimento profissional e pessoal. Tenho certeza que ainda teremos muitas histórias para viver e contar. Obrigada por tudo.

Aos **pacientes submetidos ao transplante de medula óssea**, que me mostraram o verdadeiro valor da vida, dando sentido a todo trabalho realizado.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. José Otavio Costa Auler Júnior, pela possibilidade de desenvolvimento deste trabalho, permitindo a utilização de toda infraestrutura.

A todos os colegas do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente o LIM06, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek e Dra. Fabiana Martins de Paula, foi um privilégio estar e trabalhar com vocês. Obrigada Fabi por me acolher e me ajudar em momentos decisivos e importantes do meu projeto, sou muito grata por toda a sua disponibilidade.

Ao Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, na pessoa do responsável, Prof. Dr. Marcello Menta Simonsen Nico e à Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço, pela oportunidade em frequentar e participar dos ambulatórios de Estomatologia.

À Dra. Maria Cristina Martins de Almeida Macedo, do Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer, pela contribuição inicial deste trabalho.

A Divisão de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, na pessoa do diretor, Prof. Dr. Vanderson Geraldo Rocha, disponibilizando o acesso aos pacientes, contribuindo com a realização deste trabalho. Agradeço também a equipe do Serviço de Hematologia: Kelly e Juliana, pelo suporte e acolhimentos nas reuniões da divisão de Hematologia.

À pesquisadora Dra. Sonia Aparecida Andrade Chudzinski e ao Instituto Butantan, por contribuir com a fase inicial deste trabalho.

À Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho, sempre com muita disponibilidade.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por todo suporte e aprendizado. Obrigada pela oportunidade de estágio no programa PAE, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. William de Castro Borges, pela grande contribuição no estudo da técnica aplicada. Os seus conhecimentos contribuíram significativamente para o nosso trabalho.

A todos os meus amigos da pós-graduação, essa fase da minha vida proporcionou conhecer pessoas maravilhosas que se tornaram não só amigos no ambiente de trabalho, mas amigos da vida. Cada um de vocês têm um papel importantíssimo para mim e nunca esquecerei os momentos que passamos juntos, Fernanda De Paula, Tathyanne Harumi, Giovanna Florezi, Ricardo Hsieh, Sheyla Lopes, Thaís Borguezan, Wanessa Siqueira Cavalcante, Marcelo Andreetta Corral, Adauto Lopes de Menezes, a todos que contribuíram de alguma forma com o trabalho.

A toda a minha família, na qual compartilhei muitos momentos, que me apoiaram e sempre acreditaram no meu potencial. Vocês são a minha base.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa durante todos esses anos.

“Nunca tive a menor dúvida de que o Deus que iniciou esta grande obra em vocês irá preservá-los e conduzi-los a um final grandioso, no dia em que Cristo Jesus se manifestar. “ **Filipenses 1:6**

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
≥	Maior ou igual
1D	Eletroforese unidimensional
2DE	<i>Two Dimensional gel Electrophoresis</i>
3D	Tridimensional
AAG	Anemia aplástica grave
BCA	Ácido bicinconínico
Ca	Cálcio
CA6	<i>Isoform 2 Carbonic Anhydrase 6</i>
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CatG	<i>Cathepsin G</i>
CCE	Carcinoma de células escamosas
CD3	<i>Cluster of differentiation 3</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CEFAP	Centro de Facilidades para a Pesquisa
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propanesulfonate</i>
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CK1	<i>Cytokeratin 1</i>
CK10	<i>Cytokeratin 10</i>
CK13	<i>Cytokeratin 13</i>
CK14	<i>Cytokeratin 14</i>
CK5	<i>Cytokeratin 5</i>
CK6A	<i>Cytokeratin 6A</i>
cm	Centímetros
CPP	Células progenitoras periféricas
D+100	100 dias após o transplante de células-tronco Hematopoiéticas

D+200	200 dias após o transplante de células-tronco hematopoiéticas
D+30	30 dias após o transplante de células-tronco hematopoiéticas
Da	Daltons
DAMPS	<i>Danger associated molecular patterns</i>
DDA	<i>Data-dependent acquisition</i>
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DECHa	Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda
DECHc	Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
EM	Espectrometria de massa
ESALQ	Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ETD	<i>Electron Transfer Dissociation</i>
eV	Elétron-volt
FT-ICRs	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
g	<i>G-force</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
Gal-3	<i>Galectin 3</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HC-FMUSP	Hospital das clínicas da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo
HCL	Ácido clorídrico
HIV	<i>Humam Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigens</i>
hrs	Horas
IAA	Iodoacetamida
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IEF	Focalização isoeletrica

IFN-gamma	Interferon-gamma
IgA	Imunoglobulina A
IgG2	<i>Ig-gamma-2-chain-C-region</i>
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
IL-12	<i>Interleukin 12</i>
IL-17	<i>Interleukin 17</i>
IL-18	<i>Interleukin 18</i>
IL-21	<i>Interleukin 21</i>
IL-22	<i>Interleukin 22</i>
IL-3	<i>Interleukin 3</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-7	<i>Interleukin 7</i>
IMS	<i>Imaging Mass Spectrometry</i>
kDa	Kilodalton
L	Litro
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LEG1	<i>Liver-Enriched Gene 1</i>
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LP	Líquen plano
LPO	Líquen plano oral
M	Molar
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
m/z	Massa/carga
mA	Microampère
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> / antígenos de Histocompatibilidade menor
min	Minuto
ml	Mililitro

MM	Mieloma múltiplo
MM	Massa molecular
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MO	Medula óssea
MUC5B	<i>Mucin 5B</i>
NH	Nichos hematopoiéticos
NK	<i>Natural killer</i>
nl	Nano litro
nm	Nanômetro
NODs	<i>Nucleotide oligomerization domain</i>
OLL-GVHD	<i>Oral lichenoid lesions of graft-versus-host disease</i>
p/v	Peso/volume
PAMPS	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PANTHER	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>
PDI	<i>Protein disulfide Isomerase</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIP	<i>Prolactin-inducible protein</i>
ppm	Partes por milhão
Pré óbito	Período que os pacientes evoluíram ao óbito
Pré vivo	Período pré transplante de células-tronco hematopoiéticas
PTEN	<i>Tumor suppressor gene</i>
Qs	Quadrupólo
RNA _m	<i>Messenger Ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucleico mensageiro
s	Segundos
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel</i> <i>Electrophoresis</i>
SELDI	<i>Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation</i>
SS	Síndrome de Sjögren
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TCTHa	Transplante de células-tronco hematopoiéticas alôgenico
TFA	Ácido trifluoroacético
TGF-beta	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th1	<i>T helper 1</i>
Th17	<i>T helper 17</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
Tie-2	Receptor de angiopoietina 1
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
Tris	Trisaminometano
V	Volts
v/v	Volume/volume
Wnt	Via de sinalização intracelular
µg	Micrograma
µl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Processo de formação, desenvolvimento e maturação dos elementos do sangue.....	22
Figura 2 -	Exemplo de aspectos clínicos de lesões orais encontrados em pacientes com DECH: A: exulceração do lábio inferior, coberto com uma membrana de fibrina; B: placa queratótica liquenóide sobre a superfície gengival; C e D: erosão e petéquias na mucosa bucal.....	26
Figura 3 -	Fisiopatologia da fase 1. Processo inflamatório desencadeado por meio do tipo de condicionamento utilizado	32
Figura 4 -	Fisiopatologia da fase 2. Ativação e diferenciação dos linfócitos T	33
Figura 5 -	Fisiopatologia da fase 3. Resposta imunológica exacerbada	34
Figura 6 -	Saliva total. Componentes da saliva total humana	41
Figura 7 -	Proteômica <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> . Comparação das metodologias proteômica. Informações adaptadas da referência 35	45
Figura 8 -	Técnicas aplicadas a espectrometria de massa. A espectrometria de massa é composta por três fases: (1°) fontes de ionização, (2°) analisadores de massa e (3°) detectores	48
Figura 9 -	Pacientes com o diagnóstico de DECH. Etapa 1: coleta de saliva de 3 pacientes com o diagnóstico confirmado de DECHc e coleta de saliva de indivíduos saudáveis (grupo controle)	55
Figura 10 -	Períodos de coleta de saliva dos pacientes submetidos ao TCTH. Etapa 2 do estudo com quatro tempos de coleta. DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro (aguda ou crônica); TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas; D+: dias após o TCTH e Pré-TCTH: coletas antes do TCTH (pré-vivo/ pré-óbito)	56
Figura 11 -	Pacientes submetidos ao TCTH. Etapa 2: coleta de saliva de 20 pacientes submetidos ao TCTH.....	56
Figura 12 -	Líquen Plano oral. Etapa 2: coleta de saliva de 10 pacientes com o diagnóstico de Líquen Plano oral	57
Figura 13 -	Variação do fluxo salivar. Média do fluxo salivar de pacientes com DECHc (etapa 1), comparado com o fluxo salivar dos pacientes submetidos ao TCTH, nos períodos avaliados, e LPO (etapa 2).....	67
Figura 14 -	Gel Bidimensional (2DE) das amostras de saliva de pacientes com DECHc e pacientes saudáveis. Géis 2DE: Nas figuras A e B temos a representação do perfil proteômico de pacientes com DECHc e nas figuras C e D é possível visualizar o perfil proteômico de voluntários saudáveis	68
Figura 15 -	Gel Unidimensional (SDS-PAGE) das amostras de saliva de pacientes com DECH e pacientes saudáveis. SDS-PAGE: Na figura temos a representação do perfil proteômico de pacientes com DECHc e o perfil proteômico de voluntários saudáveis	69
Figura 16 -	Diagrama de Venn comparando o perfil das proteínas diferencialmente expressas nas amostras de saliva de pacientes com DECH e de indivíduos saudáveis. Diagrama das proteínas diferencialmente expressas entre pacientes com DECH (150) e voluntários saudáveis (41).....	70

Figura 17 -	Função molecular das proteínas identificadas na DECHc. Abundância das proteínas salivares de acordo com a função molecular (<i>Gene ontology</i>)	80
Figura 18 -	Processo biológico das proteínas identificadas na saliva de pacientes com DECHc. Classificação e distribuição das proteínas de acordo com os processos biológicos - etapa 1 (<i>Gene ontology</i>).....	82
Figura 19 -	Componente Celular das proteínas identificadas na saliva de pacientes com DECHc. Distribuição das proteínas de acordo com sua localização nos componentes celulares - etapa 1 (<i>Gene ontology</i>)	83
Figura 20 -	<i>Heatmap</i> representando a comparação entre as proteínas com DECHc e indivíduos saudáveis. Abundância das proteínas representadas graficamente através de um mapa de calor (<i>Heatmap</i>), onde o nível de proteínas é demonstrada por meio de uma escala de cores: cor verde mostra baixa expressão e o vermelho alta expressão - etapa 1 (<i>Gene ontology</i>).....	85
Figura 21 -	Diagrama de Venn das proteínas identificadas nas amostras dos pacientes submetidos as TCTH. Diagrama das proteínas expressas em comum nos diversos tempo de coleta dos pacientes submetidos ao TCTH	86
Figura 22 -	Função molecular das proteínas identificadas nas amostras dos pacientes submetidos ao TCTH. Abundância das proteínas salivares de acordo com a função molecular - etapa 2 (<i>Gene ontology</i>)	88
Figura 23 -	Processo biológico das proteínas identificadas nas amostras dos pacientes submetidos ao TCTH. Abundância das proteínas salivares de acordo com seu processo biológico - etapa 2 (<i>Gene ontology</i>).....	89
Figura 24 -	Vias de sinalização das proteínas identificadas nas amostras de pacientes submetidos ao TCTH. Via de sinalização que as proteínas estão envolvidas - etapa 2 (<i>Gene ontology</i>)	90
Figura 25 -	Classes das proteínas identificadas nas amostras de pacientes com Líquen Plano oral (LPO). Categorização das classes de proteínas das amostras dos pacientes com LPO - etapa 2 (<i>Gene ontology</i>).....	91
Figura 26 -	Classes das 16 proteínas mais abundantes identificadas nos pacientes com DECHc. Categorização das classes de proteínas identificadas nas amostras de pacientes com DECHc que demonstraram uma maior abundância em relação ao controle saudável (<i>Gene ontology</i>)	92
Figura 27 -	Linha do tempo com a descrição das 7 proteínas identificadas com a maior abundância nos pacientes com DECHc. Descrição das proteínas mais abundantes nas amostras dos pacientes diagnosticados com DECHc em comparação aos tempos de coleta dos pacientes submetidos ao TCTH..	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sinais e sintomas da DECHc.....	28
Tabela 2 -	Células T no envolvimento da DECHc	29
Tabela 3 -	Características clínicas da mucosa bucal e das glândulas salivares na DECH	38
Tabela 4 -	Contribuição da secreção de saliva de cada glândula salivar	43
Tabela 5 -	Características clínicas dos pacientes.....	57
Tabela 6 -	Proteínas identificadas somente nos pacientes com DECHc (total de 150 proteínas).....	70
Tabela 7 -	Comparação do perfil de proteínas na DECH vs indivíduos saudáveis (Gene ontology).....	78
Tabela 8 -	Lista das proteínas em comum nos diversos tempos de coleta dos pacientes submetidos ao TCTH.....	86
Tabela 9 -	Proteínas identificadas com uma maior abundância nas amostras dos pacientes com DECHc comparadas com as amostras de pacientes submetidos ao TCTH nos diferentes momentos pós TCTH.....	93

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

RESUMO

Antunes MMS. O envolvimento das glândulas salivares na doença do enxerto contra o hospedeiro: estudo bioquímico e análise proteômica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma complicação que ocorre após o transplante alogênico de medula óssea. A doença é mediada por células T do enxerto que atacam as células e os tecidos do receptor; um processo inflamatório, que ataca vários órgãos e tecidos, sendo este processo responsável por 15% das causas de óbito após o acometimento da doença. As citocinas estão envolvidas na ativação das células T citotóxicas e células *natural killer* (NK), que causam as lesões nas glândulas salivares e exibem características de morte celular com infiltração de linfócitos conduzindo à apoptose. É conhecido que as unidades secretoras das glândulas salivares, após serem acometidas pela DECH, não recuperam o seu status funcional e a presença do infiltrado inflamatório pode ser um fator importante na fibrose das glândulas salivares e outros tecidos. Há evidências de uma redução significativa do fluxo salivar nos pacientes com DECH e de alterações importantes na proteômica salivar (IgA, IgG, lactoferrina) e polimorfismos que modifiquem a síntese de proteínas que devem ser consideradas para a evolução do paciente. Consequentemente os pacientes apresentam redução de fluxo salivar, com perda variável das unidades secretoras glandulares, comprometendo a qualidade de vida e os resultados do transplante. E para melhor compreensão da DECH, contribuindo para o diagnóstico precoce e na conduta destes pacientes, o presente estudo determinou o perfil proteômico dos pacientes com a doença do enxerto contra o hospedeiro crônica e comparou com o perfil de proteínas dos pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas em cinco diferentes períodos, por meio da coleta de saliva, uma técnica não invasiva, e análise proteômica; além de comparar o perfil com os grupos controles (Líquen plano oral e indivíduos saudáveis). Foram incluídos neste estudo o total de 23 pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas, na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. As amostras foram submetidas a análises prévias em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e gel bidimensional (2-DE) para o conhecimento do perfil proteômico destes pacientes. As análises foram feitas por espectrometria de massa e os dados obtidos foram confrontados com banco de dados humanos. As proteínas do grupo dos pacientes com DECHc foram comparadas com o grupo controle de indivíduos saudáveis, por meio do heatmap, e ressaltamos as proteínas de maior abundância. Portanto 16 proteínas mostraram uma maior expressão, *Ig gamma-1 chain C region*; *Isoform H14 of Myeloperoxidase*; *Isoform 2 of 14-3-3 protein Sigma*; *Fibrinogen beta chain*; *Alpha-1-acidic glycoprotein 1*; *Isoform gamma-A of Fibrinogen gamma chain*; *Hemopexin*; *Keratin type I CK 14*; *Alpha-2-Macroglobulin*; *Thioredoxin*; *Complement C3*; *Vitamin D*; *Keratin type I CK16*; *Lactoperoxidase*; *Cystatin B* e *Neutrophil elastase*. No entanto, ao comparamos estas proteínas com os diversos períodos analisados e os grupos controles, ressaltamos a importância de três proteínas para a doença do enxerto contra o hospedeiro crônica: *Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma*, *Hemopexin* e *CK14*.

Descritores: proteômica; transplante de medula óssea; doença enxerto-hospedeiro; saliva; espectrometria de massas; biomarcadores

ABSTRACT

Antunes MMS. Salivary glands involvement in graft versus host disease: biochemical and proteomic analysis. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Graft versus host disease (GVHD) is a complication that occurred after allogeneic bone marrow transplantation. The disease is mediated by graft T cells that attack as cells and tissues of the recipient; An inflammatory process, which attacks various organs and tissues, being responsible for 15% of the causes of death after the disease. Cytokines are involved in the activation of cytotoxic T cells and natural killer (NK) cells, which cause lesions in salivary glands and exhibit cell death characteristics with lymphocyte infiltration leading to apoptosis. It is known as the secretory units of the salivary glands, after being affected by GVHD, do not recover their functional state and the presence of the inflammatory infiltrate can be an important factor in the fibrosis of the salivary glands and other tissues. There is evidence of a significant reduction in salivary flow in patients with GVHD and significant changes in salivary protein (IgA, IgG, lactoferrin) and polymorphisms that modify a protein symptom that are considered for patient evolution. Consequently, patients with salary reduction, with variable loss of glandular secretory units, compromise quality of life and transplant results. In order to better understand GVHD, contributing to the early diagnosis and in the management of these patients, the present study determined the proteomic profile of patients with graft versus chronic host disease and compared them with the protein profile of patients submitted to cell transplantation Hematopoietic stem cells in five different periods, through the collection of saliva, a noninvasive technique and proteomic analysis; In addition to a profile with the control groups (Lichen planus oral and healthy individuals). Included in this study were the 23 patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation in the Bone Marrow Transplantation Unit of the Hospital das Clínicas of the University of São Paulo. As samples were submitted to previous analyzes on polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS) and 2-dimensional gel (2-DE) to know the proteomic profile of these patients. The analyzes were done by mass spectrometry and the data obtained were compared with human data. The proteins of the group of patients with GVHDc were compared to the control group of healthy individuals by means of the Heatmap, and we emphasized as proteins of greater abundance. Therefore, 16 proteins show a greater expression, Ig gamma-1 chain C region; Isoform H14 of Myeloperoxidase; Isoform 2 of 14-3-3 protein Sigma; Fibrinogen beta chain; Alpha-1-acidic glycoprotein 1; Isoform gamma-A of Fibrinogen gamma chain; Hemopexin; Keratin type I CK 14; Alpha-2-Macroglobulin; Thioredoxin; Complement C3; Vitamin D; Keratin type I CK16; Lactoperoxidase; Cystatin B e Neutrophil elastase. Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma, Hemopexin and CK14. Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma, Hemopexin and CK14. However, when comparing these proteins with the various types of analyzes and the control groups, we emphasize the relevance of three proteins for the graft versus host disease: Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma, Hemopexin and CK14.

Descriptors: proteomics; bone marrow transplantation; graft vs host disease; saliva; mass spectrometry; biomarkers

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 O sistema hematopoiético	21
1.2 Transplante de células-tronco hematopoiéticas	23
1.2.1 Tipos de regime de condicionamento	23
1.2.2 Tipos de transplante de células-tronco hematopoiéticas	24
1.3 Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)	25
1.3.1 Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa)	26
1.3.2 Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc).....	27
1.3.3 A fisiopatologia da DECH.....	30
1.3.4 Aspectos da DECH na cavidade oral.....	36
1.4 Líquen Plano	40
1.5 Saliva	41
1.6 Proteômica.....	44
1.6.1 Espectrometria de massa.....	46
1.7 Biomarcadores	49
2 OBJETIVOS	51
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Desenho do estudo	53
3.1.1 Critérios de inclusão dos pacientes.....	53
3.2 Avaliação clínica.....	53
3.3 Coleta de amostra de saliva e armazenamento.....	54
3.3.1 Coleta de amostras	54

3.4 Análise proteômica	59
3.4.1 Precipitação das proteínas.....	59
3.4.2 Dosagem Proteica	59
3.4.3 Caracterização do perfil de proteínas por Eletroforese SDS-PAGE (<i>Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>) e 2DE (<i>Two Dimensional gel Electrophoresis</i>).....	60
3.4.4 Digestão das amostras de saliva	61
3.4.5 Identificação das proteínas por espectrometria de massa	62
3.5 Análise de dados.....	63
3.5.1 Pesquisa no Banco de Dados	63
3.5.2 Classificação funcional do proteoma.....	64
3.5.3 Análise quantitativa do proteoma.....	64
4 RESULTADOS.....	66
4.1 Características gerais das amostras.....	66
4.2 Avaliação do fluxo salivar	67
4.2.2 Características da Doença do Enxerto contra hospedeiro	67
4.3 Estudo do Proteoma	68
4.3.1 Caracterização do perfil de proteínas	68
4.3.2 Identificação do proteoma salivar – etapa 1	69
4.3.3 Identificação do proteoma salivar - etapa 2.....	85
4.3.4 Correlação dos dados da etapa 1 e etapa 2	92
5 DISCUSSÃO	95
6 CONCLUSÃO.....	105
ANEXOS	107
REFERÊNCIAS	128

1 INTRODUÇÃO

A maior causa de mortalidade e morbidade a longo prazo após o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico (TCTHa) é a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (1). Aproximadamente 25.000 TCTH acontecem a cada ano e em decorrência deste fato, encontrar doadores compatíveis torna-se difícil, aumentando assim a participação de doadores não-compatíveis neste tipo de terapia, ampliando a incidência de DECH aguda e crônica nestes pacientes (2,3).

1.1 O sistema hematopoiético

Hematopoiese é um processo complexo, responsável por gerar aproximadamente, 1×10^9 glóbulos vermelhos e aproximadamente 1×10^8 de glóbulos brancos por hora, além de plaquetas e outras linhagens maduras de células do sangue. O processo ocorre em tecidos especializados, denominados Nichos Hematopoiéticos (NH), que são um dos primeiros tecidos a desenvolver-se em mamíferos (4–6).

As células-tronco hematopoiéticas dão origem a todas as células do sangue por meio de sua capacidade de diferenciação iniciando várias linhagens celulares que têm a propensão de se auto renovar e de se dividir indefinidamente. Visto que as células sanguíneas maduras têm vida-média curta, esta função de diferenciação e renovação celular torna-se importantíssima para a manutenção do sistema hematopoiético (7–9).

A hematopoiese tem um mecanismo denominado sistema hierárquico, onde as células-tronco hematopoiéticas pluripotentes dão origem as células progenitoras, que por sua vez diferenciam-se e produzem células sanguíneas, como: megacariócitos, glóbulos vermelhos, células mieloides e linfócitos (figura 1) (6,7,10,11).

FONTE: a autora

Figura 1 - Processo de formação, desenvolvimento e maturação dos elementos do sangue

A medula óssea é o maior NH na vida adulta, porém a hematopoiese pode ocorrer em outros tecidos como por exemplo: no fígado fetal, no saco vitelino, timo e baço; recentemente a placenta também é considerada um NH. Esses nichos são conhecidos como locais de hematopoiese extra-medular, mudando conforme o desenvolvimento humano (6–8).

A manutenção, assim como a diferenciação e renovação das células dentro dos nichos são controladas por vias moleculares (Wnt, sensores receptores de cálcio, angiopoietina 1, Tie-2 e componentes da matriz extracelular); Citocinas hematopoiéticas, como: stem cell factor (SCF) e insulin-like growth factor 2, são produzidas com a finalidade de controlar a diferenciação das células-tronco hematopoiéticas primitivas. Da mesma forma, outras citocinas são produzidas com a função de diferenciação de células progenitoras e células-tronco hematopoiéticas para linhagem de células comprometidas com a diferenciação;

entre elas estão as citocinas como, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), interleukin 3 (IL-3), IL-7, granulocyte macrophage [(GM)-CSF] e macrophage [(M)-CSF] - essas proteínas são denominadas indutores de crescimento (6,11).

Devidas as suas propriedades regenerativas, as células hematopoiéticas têm sido aplicadas no uso de terapias, como o transplante de células-tronco hematopoiéticas, para o tratamento de diversas doenças genéticas e câncer, com a finalidade de reconstituir todo o sistema sanguíneo do paciente ou receptor (7).

1.2 Transplante de células-tronco hematopoiéticas

O transplante de células-tronco hematopoiéticas, tem como definição a substituição de células-tronco hematopoiéticas doentes a partir de células-tronco hematopoiéticas normais (12), obtidas de diversas fontes como por exemplo, a medula óssea, o sangue periférico e o sangue do cordão umbilical. A técnica foi introduzida em clínicas hospitalares no final da década de 1950 para o histórico tratamento de um paciente diagnosticado com leucemia mieloide aguda (13). Entretanto, somente em 1968, três pacientes foram transplantados com sucesso e isso deveu-se ao desenvolvimento de um protocolo que considerou a importância da tipagem de antígenos dos leucócitos: “human leukocyte antigens” (HLA) como estratégia de seleção dos doadores (13). Com a limitação de irmãos com HLA idênticos, em 1979 foi realizado com êxito o primeiro TCTH com um doador não compatível (13).

O crescente sucesso do transplante de células-tronco hematopoiéticas para o tratamento de doenças neoplásicas e não-neoplásicas deve-se aos critérios estabelecidos: da indicação ao tratamento à terapia do condicionamento escolhida.

1.2.1 Tipos de regime de condicionamento

Com objetivo de eliminar o sistema imunológico do receptor existem três definições, geralmente aceitas, do regime de condicionamento.

O condicionamento mieloablativo é um tratamento com um único agente ou com a combinação de agentes citotóxicos (com ou sem irradiação total do corpo), em doses de alta intensidade, erradicando o sistema hematopoiético do paciente e que, geralmente, permite uma maior velocidade do enxerto das células doadoras. Consequentemente, este regime está associado a causas de toxicidade e mortalidade, afetando tecidos como: mucosa oral e trato gastrointestinal, aumentando o risco da DECH (13,14).

O condicionamento não-mieloablativo é um regime com baixas doses de irradiação total do corpo combinado com agentes citotóxicos, diminuindo a intensidade ablativa do tratamento. Consequentemente à redução da toxicidade, este tipo de condicionamento permite o tratamento de pessoas de idade avançada. (13–15).

O condicionamento de intensidade reduzida não permite a erradicação completa do sistema hematopoiético do paciente, mas fornece imunoablação suficiente para prevenir a rejeição do enxerto, a alta toxicidade e a mortalidade (13–15).

1.2.2 Tipos de transplante de células-tronco hematopoiéticas

Para a realização de um TCTH, alguns fatores são levados em consideração, como a idade do paciente, estágio da doença, histocompatibilidade do doador/receptor entre outros. Por meio destes componentes são avaliados os riscos e a indicação para o TCTH, que por sua vez pode ser dividido em autólogo onde a fonte de células vem do próprio paciente e alogênico (TCTHa), um processo mais complexo no qual o paciente recebe a fonte de células de um doador saudável (16–19).

Estima-se que 40-70% dos pacientes que sobrevivem ao TCTHa desenvolvem DECH, que pode persistir por meses ou anos, exigindo cuidados, sendo esta a causa mais comum de mortalidade não relacionada a doença primária (20,21).

1.3 Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)

A maior complicação do TCTHa, a DECH, é mediada pelos linfócitos T do doador que reagem contra células do hospedeiro, expressando aloantígenos que desencadeiam uma resposta inflamatória intensa. Esta pode afetar um único órgão, mas geralmente, ataca vários órgãos e tecidos, sendo este processo responsável por 15% das causas de óbito após o acometimento da doença, resultado este da incompatibilidade do sistema de antígenos HLA do doador e beneficiário (20,22–24).

O risco de desenvolvimento da DECH aumenta baseado em algumas condições fundamentais como (23,24):

- (A) HLA não compatíveis;
- (B) idade avançada de ambas as partes, doador e receptor;
- (C) alguns tipos de enxerto;
- (D) doador feminino e beneficiário masculino;
- (E) tipos de regimes de condicionamento.

A DECH é classificada em aguda (DECHa) e crônica (DECHc), sendo diferenciada por meio das manifestações clínicas determinantes de cada fase (figura 2).

FONTE: a autora

Figura 2 - Exemplo de aspectos clínicos de lesões orais encontrados em pacientes com DECH: A: exulceração do lábio inferior, coberto com uma membrana de fibrina; B: placa queratótica liquenóide sobre a superfície gengival; C e D: erosão e petéquias na mucosa bucal

1.3.1 Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa)

A forma aguda da doença é usualmente apresentada alguns dias após o TCTHa, definida clinicamente pelo número e a extensão dos órgãos envolvidos (pele, trato gastrointestinal e fígado). Outros sinais e sintomas incluem a febre, diarreia e erupção cutânea. Os sintomas da forma aguda podem persistir por mais tempo, sendo denominada como DECHa de início tardio ou late onset (em inglês); com as mesmas manifestações clínicas, ocorrem 100 dias após o transplante. (20,22–25).

Três fases relacionadas com a fisiopatologia da DECHa (21). Essas fases são mencionadas abaixo para contextualizar a cascata inflamatória que envolve a doença, e descritas e ilustradas com maiores detalhes na sessão “fisiopatologia da DECH”:

- (A) condicionamento;
- (B) ativação e expansão de células alorreativas e
- (C) fase efetora.

Na primeira fase, denominada condicionamento, devida a diferença molecular entre o doador e o hospedeiro, há a ativação de células apresentadoras de antígenos, uma resposta ao dano gerado ao tecido por meio do condicionamento e da doença de base. Quanto mais agressivo for o regime de condicionamento proposto, maior a chance do desenvolvimento da DECH, que está associada às lesões celulares, como resposta do tecido hospedeiro, havendo a liberação de citocinas inflamatórias (21).

Na fase seguinte à ativação e expansão de células alorreativas ocorre a proliferação e a diferenciação dos linfócitos T do doador e do hospedeiro. Há o processo em que os linfócitos T do doador reconhecem os antígenos HLA do hospedeiro como estranho, aumentando a gravidade e o desenvolvimento da DECH (21).

Na ultima fase, após a ativação dos linfócitos T, células efetoras são produzidas e ao entrarem em contato com a corrente sanguínea, migram para os tecidos-alvo do hospedeiro, causando danos por meio da toxicidade e liberação de algumas citocinas (10).

1.3.2 Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc)

A doença do enxerto contra o hospedeiro crônica ocorre em 30% a 70% dos pacientes em um período de meses ou anos após o TCTHa, frequentemente precedida da forma aguda. Clinicamente menos definida do que a DECHa, envolve um processo de fibrose e cicatriz. A pele é acometida em 75% dos pacientes, seguida da mucosa oral entre 51% a 63% e 22% a 51% dos pacientes que sofrem de alterações no trato gastrointestinal, fígado e olhos. Isso resulta na diminuição da capacidade funcional, dor e um grande impacto na qualidade de vida destes pacientes (tabela 1) (2,20,22,23,25). A DECHc

pode ser subclassificada em DECHc clássica e síndrome de sobreposição ou overlap syndrome (em inglês), como o próprio nome diz, diferenciada por meio da sobreposição das manifestações clínicas da DECHa com a DECHc (20). O processo inflamatório, como resultado da liberação de citocinas e quimiocinas por células imunes (linfócitos T) possuem um papel importante no processo, ajudando a entender a biologia da DECHc (tabela 2).

Tabela 1 - Sinais e sintomas da DECHc

Órgão ou tecido	Características do diagnóstico¹	Características distintas²
Pele	Poiquilodermia Liquenificação Esclerose Morfêa secundária	Despigmentação Lesões papuloescamosas
Boca	Lesões liquenóides	Xerostomia Atrofia mucosa Úlceras Pseudomembranas
Fígado	Nenhum	Nenhum
Olho	-	Olhos secos Conjuntivite cicatricial Síndrome de queratoconjuntivite-Sicca
Trato gastrointestinal e esôfago	Teia esofágica Estenoses no esôfago superior	-
Pulmão	Bronquiolite obliterante	estenose e bronquiectasia tomografia computadorizada de tórax
Músculo, fáscia e articulações	Fasciitis Esclerose Rigidez articular	Miosite ou polimiosite
Genitália	Lesões liquenóides	Erosões, Fissuras e Úlceras

¹Sintomas clínicos considerados para o diagnóstico de DECHc, ²Sintomas clínicos que são insuficientes para o diagnóstico de DECHa. Informações adaptadas de *Presland RB, 2016 (20)*

Tabela 2 - Células T no envolvimento da DECHc

Tipo de célula	Subtipos	Citocinas ou marcadores chaves	Resumo do envolvimento da doença
CD4+ T cells	Th1	IFN- γ , TNF- α	Pro-inflamatório. Seu papel na DECHc não é bem estabelecido, mas é importante na DECH aguda
	Th2	IL-4, IL-13	Sua função na DECHc não é definida, mas estimulam a produção de anticorpos
	Th17	IL-17, IL-21, IL-22, TNF- α	Pro-inflamatório. Os níveis de IL-17 estão relacionados com a gravidade da doença
	Tregs	TGF- β	Produzido principalmente no timo. Níveis mais baixos de Tregs são presentes em pacientes com DECHc, associados com perda de auto-tolerância nestes pacientes
	Células auxiliares foliculares T	CCR5, PD-1 e ICOS	Promover a maturação anormal das células B em células plasmáticas e a secreção de IgG
CD8+ T cells	-	CXCL9, CXCL10	Mediar o efeito do enxerto-contratumor do transplante. Níveis séricos elevados de CXCL9 em doentes com DECHc

Descrição das funções das células T na DECHc. Informações adaptadas de *Presland RB, 2016 (20)*

Portanto, a DECHc tem como definição uma desregulação imune causada por um distúrbio multissistêmico, deficiência imunológica e diminuição da sobrevivência. O

tratamento usualmente é realizado com o uso de corticosteroides durante 2 anos ou mais, o que pode predispor o paciente a outras complicações levando até a morte (2,26).

O mecanismo fisiopatológico que envolve os linfócitos T e a desregulação das citocinas, afeta a mucosa oral em mais da 50% dos pacientes com o diagnóstico de DECHc. Estas alterações, segundo alguns estudos comprometem a composição bioquímica e imunológica do fluido salivar, bem como a capacidade funcional da saliva, como a mastigação, controle da flora oral, deglutição, integridade da mucosa oral e a proteção contra proteínas estranhas e infecções (27).

1.3.3 A fisiopatologia da DECH

A DECH foi definida na clássica publicação de Billingham et al, (2012) (28), como uma síndrome cujas células de um doador imunocompetente reconhecem e destroem os tecidos e as células de um receptor alogênico imunocomprometido. Nesse contexto genérico, a DECHa e a DECHc envolvem processos patológicos distintos, onde a primeira se configura com componentes inflamatórios mais agressivos e a segunda mostra um caráter autoimune, crônico e fibrótico.

Na DECHa o processo imunológico predominante é o Th1/Th17, enquanto que na DECHc predomina a resposta Th2, embora esse padrão de resposta não seja absoluto. As informações sobre mecanismos de doença na DECH ganharam maior elucidação com o estudo do processo em modelos animais, embora a doença e o sistema imune em roedores utilizados nas pesquisas não mimetizem fielmente o que ocorre nos seres humanos. Nessa breve consideração acerca da patogenia da doença, discorreremos sobre alguns pontos relevantes no sistema imunológico para a instalação da doença. As informações desse tópico foram interpretadas das excelentes revisões de Blazar et al, (2013) (29); Markey *et al*, (2014) (30) e Socié & Ritz, (2014) (1).

Brevemente, o processo da DECHa vem sendo, experimental e didaticamente descrito em 3 fases, de acordo com a revisão de Markey *et al*, (2014) (30):

A primeira fase, ou a fase do condicionamento para o transplante ocorre devido ao processo inflamatório desencadeado pela quimioterapia mieloablativa ou outros sistemas que induzem a imunossupressão. Esse mecanismo foi largamente estudado em animais, onde foi demonstrada a quebra da homeostasia da mucosa do trato gastrointestinal com exposição de receptores pro inflamatórios (DAMPs e PAMPs - *danger e pathogen associated molecular patterns*), que por sua vez promovem a produção de citocinas pro inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF), com ativação de células apresentadoras de antígenos hematopoiéticas e não-hematopoiéticas e a consequente ativação do tecido linfóide intestinal.

Na segunda fase ocorre a ativação dos linfócitos T do doador, que interagem com as células apresentadoras de antígenos e que levam à ativação e diferenciação de mais linfócitos T. Nesse cenário há a presença de citocinas e interleucinas do tipo Th1, Th2 e Th17 e a diferenciação de linfócitos T-reguladores. Nessa fase, os linfócitos B e macrófagos do paciente receptor regulam a expansão dos linfócitos T, e, as células apresentadoras de antígenos do doador parecem contribuir para a manutenção da DECH. Aqui ainda é importante ressaltar que a diferenciação de linfócitos Th17 parece contribuir de forma efetiva para o estabelecimento das lesões tegumentares (pele e mucosas) e comprometimento pulmonar.

A terceira fase acumula os efeitos do condicionamento e da inflamação, e a diferenciação dos linfócitos T culminam com uma resposta imunológica exagerada, com a produção de citocinas, linfócitos T citolíticos e *natural-killers* que atacam os tecidos-alvo.

Finalmente, a DECHc é caracterizada pela fase final e bem estabelecida do processo inflamatória da doença e mostra a faceta da fibrose de múltiplos tecidos e órgãos. Nessa fase, principalmente na pele e mucosas, há a participação das interleucinas da resposta imunológica Th17 e do TGF-beta, que induz a fibrose. Esses aspectos são ilustrados nas figuras 3, 4 e 5, modificadas de Markey *et al*, (2014) (30).

Fase 1 da fisiopatologia da doença do enxerto contra o hospedeiro - dano tecidual em decorrência do condicionamento

FONTE: a autora

Figura 3 - Fisiopatologia da fase 1. Processo inflamatório desencadeado por meio do tipo de condicionamento utilizado

Fase 2 da fisiopatologia da doença do enxerto contra o hospedeiro - sensibilização e diferenciação de linfócitos

FONTE: a autora

Figura 4 - Fisiopatologia da fase 2. Ativação e diferenciação dos linfócitos T

FONTE: a autora

Figura 5 - Fisiopatologia da fase 3. Resposta imunológica exacerbada

Outras considerações

O sistema imune inato:

A resposta imunológica inata tem sido apontada como o gatilho e a amplificadora da DECHA. Moléculas sensibilizadoras são liberadas do trato gastrointestinal durante o período de condicionamento e ativam receptores da resposta imune inata, como os receptores “toll-like”, causando a liberação de citocinas que favorecem a DECHA. Pesquisadores clínicos mostraram que mutações em receptores toll, polimorfismos de

genes codificadores de domínios de ligação de nucleotídeos, famílias de receptores ricos em receptores em leucinas, como os NODs e TLR são associados com a maior incidência da DECH e podem explicar a natureza imprevisível do curso da DECH. Outras moléculas como lipopolissacarídeos, e a própria flora bacteriana servem como potencializadores da doença. É ainda importante mencionar que mesmo na ausência da sinalização dos receptores “toll-like”, os linfócitos T ainda podem ser ativados e alimentar a DECH.

O papel das células apresentadoras de antígenos:

A apresentação de antígenos de histocompatibilidade menores por meio dos MHC classe I nas células hematopoiéticas apresentadoras de antígenos do recipiente é importante, mas não-determinante para o recrutamento de linfócitos CD8⁺ na DECHa. As células apresentadoras de antígenos do doador podem aumentar essa resposta. À luz do conhecimento recente, as células do parênquima dos tecidos podem adquirir funções de apresentação de antígenos e promovem expansão dos linfócitos T do doador no trato gastrointestinal. Na ausência de células apresentadoras de antígenos profissionais, essas são suficientes na indução da DECH.

Os linfócitos B:

Em pesquisas desenvolvidas em camundongos a depleção de linfócitos B resultam na diminuição da DECHa, talvez devida a diminuição das células apresentadoras de antígenos do recipiente. Paradoxalmente, os linfócitos B também pode ter um efeito protetor na DECH, por meio do controle da diferenciação de linfócitos T em linfócitos T-efetores, inibindo a proliferação de linfócitos T-efetores - aloantígenos específicos, por meio principalmente da secreção de IL-10. Nesse sentido, o controle dos linfócitos B por medicamentos imunobiológicos anti-CD2-, como o rituximab, tem impacto, principalmente, no controle da DECHc.

As respostas dos linfócitos T e as respostas Th1, Th2 e Th17:

Ambos os linfócitos T CD4+ e CD8+ têm papel importante na patogenia da DECH. Assim, as terapias para o controle da DECH são focadas na depleção, tolerização ou incapacitação dessas células provenientes do doador. Os linfócitos T-auxiliadores do doador aparecem ser primordialmente importantes na instalação da DECH, uma vez que podem se diferenciar em células das respostas Th1, Th2 e Th17, que produzem DECH em órgãos específicos.

Os linfócitos da resposta Th1 e as moléculas pro inflamatórias IL-1, IL-6, TNF-alfa, IL-12 e óxido nítrico têm se mostrado importantes na etiologia da indução da DECH. Essa cascata inflamatória resulta em repercussões sistêmicas da doença como perda de peso, diarreia, alterações cutâneas e aumento da morbidade e mortalidade.

A citocinas relacionadas com a resposta imunológica Th2, como a IL-4, podem reduzir a DECHa, mas similarmente os IFN-gama, esse efeito pode depender da fase de sua expressão.

Os linfócitos relacionados à resposta Th17, que é caracterizada pela produção de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, têm sido diretamente implicados na patobiologia da DECH. Os autores das revisões consultadas citam que a proporção diminuída entre linfócitos Th17 e Th1 do material doador induz a exacerbação da DECHa, e que a presença de citocinas da resposta Th17 parecem controlar a DECHa e DECHc.

1.3.4 Aspectos da DECH na cavidade oral

O segundo órgão mais envolvido na DECHc é a cavidade oral, atrás somente da pele com um envolvimento de até 85% dos pacientes. Portanto a cavidade oral é importante para a utilização do estadiamento da doença e também para o seu diagnóstico. As características clínicas incluem eritema, lesões liquenóides, ulceração, atrofia, fibrose perioral e disfunção das glândulas salivares. As alterações podem estar presentes em qualquer localização da cavidade oral, entretanto a língua e mucosa livre usualmente são as mais afetadas (2,21) .

As glândulas salivares são afetadas de 33% a 75% dos pacientes com DECHa e até 80% dos pacientes com DECHc (31); estudos em humanos e modelos animais têm demonstrado que a infiltração dos linfócitos T nas glândulas salivares é acompanhada por uma perda em suas funções, expressadas pela redução do fluxo salivar, o que leva ao sintoma de xerostomia, sendo uma das principais causas de morbidade da DECH (27).

No âmbito das doenças não-neoplásicas a xerostomia é uma das principais repercussões das alterações nas glândulas salivares e consiste na sensação subjetiva de boca seca, consequentemente ou não à diminuição/interrupção da função das glândulas salivares em resposta a diversas causas, que englobam desde alterações psíquicas, medicamentosas, autoimunes, radioterapia, entre outras (32).

A redução da quantidade e a qualidade da saliva são fatores que agravam a integridade da mucosa oral e das glândulas salivares na DECH. Além disso, aumentos nos níveis séricos da Interleucina 18 (IL-18) foram encontrados em pacientes que desenvolvem DECH. A IL-18 é uma citocina com ampla variedade funcional biológica, incluindo não somente a imunidade inata, mas também adquirida, e está envolvida com o desenvolvimento dos linfócitos T citotóxicos e células natural killer (NK), que podem mediar a lesão salivar observada na DECH.

Ainda, os linfócitos T CD4⁺, têm demonstrado um papel importante no desenvolvimento da DECH. Esses linfócitos podem ser subdivididos em conjuntos com funcionalidades imunológicas diferentes: Th1, Th2 e Th17; em particular a resposta Th17 é considerada importante em doenças autoimunes entre elas a DECH, e está envolvida especificamente com o processo inflamatório no tegumento (pele e mucosas) (2).

Os mecanismos que podem ser críticos para atração e recrutamento dos linfócitos T citotóxicos para as glândulas salivares, incluem a produção de proteínas macrófago-inflamatórias-1-alfa, expressão de antígenos de histocompatibilidade e a acessibilidade das glândulas aos linfócitos patogênicos (27). Apesar dessas evidências, até o momento, os mecanismos subjacentes à destruição do tecido glandular observada nos doentes com DECH ainda é motivo de especulação.

A saliva tem um papel importante na mucosa oral e qualquer acometimento da glândula salivar pode afetar a qualidade de vida do paciente em diversos aspectos, como dificuldades na mastigação e deglutição, paladar, fala, remineralização dos dentes, manutenção do equilíbrio do pH bucal e prevenção de infecções orais, que por sua vez aumentam o risco dos pacientes desenvolverem doenças secundárias e oportunistas (2,32).

O tratamento da DECHc oral é instituído por meio da administração de terapias tópicas (tabela 3) como o uso de corticosteroides, levando em consideração alguns fatores como: paliação da dor, tratamento das doenças de mucosa, controle dos sintomas que afetam a qualidade de vida, abrangendo à boca seca (2); desta forma a eficácia do tratamento será estabelecida com a escolha do agente, sua formulação e a frequência e duração da aplicação. Para o controle dos sintomas das glândulas salivares afetadas, o uso de enxaguantes, sprays, géis e estimulantes de saliva são utilizados para minimizar as manifestações da xerostomia (32).

Tabela 3 - Características clínicas da mucosa bucal e das glândulas salivares na DECH

DECHc da mucosa oral		DECHc nas glândulas salivares	
Sinais	Sintomas	Sinais	Sintomas
Lesões liquenóides	Sensibilidade a alimentos	Saliva espessa, pegajosa ou espumosa	Xerostomia
Placas hiperqueratóticas	-	Mucosa atrófica	Sensibilidade a alimentos/bebidas
Eritema / atrofia	Sensibilidade ao escovar os dentes e a pasta dental com sabor hortelã	Candidíase orofaringe	Dificuldade em falar
Ulcerações com pseudomembranas	-	Beber água frequentemente	Dificuldade para mastigar
Glossite atrófica	Alteração no paladar	Língua “clitando” ao falar	Dificuldade em engolir
Mucoceles superficiais			

continua

Tabela 3 - Características clínicas da mucosa bucal e das glândulas salivares na DECH

DECHc da mucosa oral		DECHc nas glândulas salivares	
Sinais	Sintomas	Sinais	Sintomas
		Resíduos alimentares dentro da boca	Acordar à noite devido secura severa
		Incapacidade de comer alimentos secos	Alteração no paladar

Informações adaptadas de Rochberg Mc, 2001 (33)

Vários são os critérios utilizados para a avaliação das alterações glandulares na DECH e seus processos inflamatórios. Um dos critérios inclui o nível de produção salivar que pode ser avaliado medindo-se as taxas de fluxo com ou sem estímulo. Entretanto, esses testes carecem de especificidade para a DECH, visto que muitas condições provocam diminuição da produção e alteração na qualidade da saliva. A cintilografia das glândulas salivares, a sialografia secretória, a ultrassonografia, a ressonância magnética das glândulas parótidas e a biopsia de glândula salivar, que avalia a infiltração de linfócitos (CD3+, CD8+, CD4+) em DECHc, apesar de úteis para demonstrar a anatomia e a função glandulares, possuem papel limitado na prática clínica rotineira (2,33).

Os linfócitos na DECHc oral têm um papel importante nas lesões, como descrito anteriormente, fazendo com que as manifestações clínicas e histológicas sejam semelhantes a outras doenças autoimunes, como o líquen plano (LP), considerado morfologicamente, no âmbito dos diagnósticos diferenciais da DECH.

1.4 Líquen Plano

O líquen plano é uma doença inflamatória crônica, mais comumente diagnosticada em mulheres brancas de meia idade (entre 30 a 70 anos); atinge 0,5% - 2,2% da população, tendo sua prevalência observada no subcontinente indiano. A apresentação do LP é observada no envolvimento cutâneo (variando de subtipo conforme a configuração ou lesão encontrada na pele), cabelos, unhas e no envolvimento oral que representa 30 - 70% dos pacientes com o diagnóstico de LP (34); suas lesões estão presente na língua e na mucosa bucal, sendo caracterizadas por: manchas, lesões reticulares, úlceras ou erosões dolorosas (21,34,35).

Sua etiologia é caracterizada pela indução da ativação dos receptores apoptóticos à lesão através dos linfócitos T CD8+, nas glândulas salivares os infiltrados linfocitários são encontrados nos ductos excretores de saliva, da mesma forma é observado na patogênese e lesões da DECHc oral, onde também são encontrados infiltrados de linfócitos T, porém em menor intensidade (34,36,37).

Portanto, estas lesões na DECH são denominadas como: lesões liquenóides orais da doença do enxerto contra o hospedeiro. Sua incidência na DECH, independente da fonte de células-tronco hematopoiéticas é de 85%; porém pode variar de acordo com as fontes de células-tronco hematopoiéticas, afetando 70% dos pacientes que recebem células-tronco periféricas e 53% dos receptores de células-tronco derivadas da medula óssea (38,39).

Desta forma, infere-se que a patogenia do envolvimento das glândulas salivares e os processos inflamatórios nessas doenças, ainda é desconhecida. Estudos comparativos das alterações das glândulas salivares menores nas doenças ainda são pouco elucidativos. Além disso, sabe-se que a saliva tem um papel importante na cavidade oral com função protetora, lubrificante além de ajudar na percepção de textura dos alimentos, levando o paciente a baixa qualidade de vida, prejudicando sua fala e alimentação (35); além disso a grande variedade de moléculas presentes na saliva possibilita o conhecimento da patogênese de doenças sistêmicas.

1.5 Saliva

A saliva lubrifica a cavidade oral com uma mistura de água (99%), íons, proteínas (como mucinas, proteínas ricas em prolina, amilase e imunoglobulinas), lipídios e outras moléculas que são secretadas por três pares de glândulas salivares principais (submandibular, sublingual e parótida) com o reforço das glândulas salivares menores, do fluido crevicular gengival e células descamadas do epitélio oral, constituindo a saliva total (figura 6). Cada glândula secreta um tipo diferente de saliva variando de acordo com suas propriedades reológicas, com o horário do dia e a estimulação realizada; o fluido salivar possui uma função biológica fundamental para a manutenção da saúde bucal, percepção sensorial, na ajuda da mastigação, deglutição e digestão dos alimentos (40–44).

FONTE: a autora

Figura 6 - Saliva total. Componentes da saliva total humana

Os componentes da saliva desempenham um papel importante na função salivar; o bicarbonato está relacionado ao tamponamento do pH (neutro) impossibilitando a decomposição do mineral do dente, facilitando também a solubilização de macromoléculas e alterando as propriedades (solubilidade e reológica) das mucinas. Da mesma forma o cálcio e o fosfato são importantes na funcionalidade da saliva, realizando um papel crucial na mineralização dos tecidos duros e na conformação e reticulação das mucinas (45) .

Formada nas células acinares e armazenadas nos grânulos salivares até a sua estimulação, a saliva, ao ser estimulada, principalmente pelo sistema nervoso autônomo, passa do lúmen das células acinares para os ductos e entra na cavidade oral; a taxa do

fluxo salivar de um indivíduo saudável pode variar entre 0,1 – 2 ml/min (1-2L por dia), esse fluxo pode ser alterado conforme alguns fatores como: hidratação do indivíduo, tabagismo, medicação, postura corporal e ritmos circadianos (41,44,46).

As concentrações de alguns componentes salivares podem sofrer alterações caso haja algum tipo de estímulo mecânico (tabela 4), como por exemplo a mastigação de parafilm®. Há uma diminuição na concentração de proteínas na saliva estimulada, por outro lado há o aumento de outros componentes como: bicarbonato, sódio e cloreto (47).

Tabela 4 – Contribuição da secreção de saliva de cada glândula salivar

Glândula	Volume de saliva não estimulada	Volume de saliva estimulada
submandibular	Aprox. 65%	Aprox. 35%
parótida	Aprox. 20%	>50%
sublingual	Aprox. 5%	Aprox. 7-8%
menor	Aprox. 10%	Aprox. 7-8%

Informações adaptadas de Nunes L, *et. al.* 2015 (46)

A saliva humana é um fluido filtrado do sangue e apresenta muitas moléculas também encontradas no plasma. A saliva é hipotônica comparada ao plasma e está envolvida nas trocas de íons, por este motivo a composição da saliva tem sido observada na identificação de biomarcadores devido a esta influência nas mudanças sistêmicas das doenças, logo, retrata o equilíbrio de fontes locais e sistêmicas que hoje são utilizados, através de diversas técnicas, como uso de diagnóstico (41,44) .

Existe um método que passou a ser utilizado recentemente para se avaliar a expressão de proteína na saliva de pacientes com doenças reumatológicas e que tem demonstrado um grande impacto tanto no diagnóstico quanto no estudo molecular das doenças sistêmicas autoimunes. Este método, conhecido como proteoma, tem o potencial de identificar novos biomarcadores específicos de doenças (48). A análise proteômica da saliva leva em consideração o fato deste fluido conter inúmeras proteínas informativas que podem ser

usadas para a detecção de doenças. Além disso, a saliva é um fluido diagnóstico atrativo uma vez que é de fácil coleta e processamento, permitindo a realização de procedimentos não invasivos e de baixo custo para o estudo (49).

1.6 Proteômica

Originado da palavra grega: *proteios*, nome dado por Berzelius em 1838, que significa *o primeiro posto* em inglês: *the first hank*, as proteínas são moléculas encontradas no corpo humano e cada proteína possui um papel funcional específico, como: regulatório, proteínas transdutoras, estrutural (participam da estrutura do tecido), catalítico (moléculas reguladoras das reações biológicas), transporte e armazenamento (transporte de substâncias como o oxigênio) (50).

A organização estrutural das proteínas é tridimensional (3D) devido à formação de vinte diferentes aminoácidos que codificam 61 códons; os aminoácidos são unidos entre eles através de ligações peptídicas, sugerindo que sua função seja estabelecida conforme sua organização 3D e sua dinâmica conformacional (51–53). A informação genética segue do ácido desoxirribonucleico (DNA) para o ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e enfim para a proteína (53).

Em 1961 o termo proteoma começou a ser estudado, com o objetivo de entender e identificar a função de uma mistura de proteínas presentes nas células, nos tecidos e nos fluidos corporais em condições ou em momentos específicos, para auxiliar no diagnóstico e no tratamento de doenças humanas. Porém somente em 1996, a palavra proteômica foi utilizada, termo derivado das palavras: PROTEÍnas e genOMA (50); deste modo podemos definir a proteômica como o estudo da distribuição e interação das proteínas e um determinado tempo e espaço na célula, organismos ou um ecossistema, traduzindo a soma dos produtos das sequências genômicas, resultados de processos pós transcricionais, traducionais e complexos formados por biomoléculas; entendendo assim como a estrutura dessas proteínas mudam e interatuam com outras proteínas e como isso reflete em um organismo saudável ou doente (50,51,54,55).

A proteômica é o método mais relevante para a caracterização de um sistema biológico e sua técnica consiste na extração de proteínas, separação, quantificação, identificação por espectrometria de massas (EM) e bioinformática para análise de dados (55). Sendo classificada em *top-down* e *bottom-up*. Na técnica *top-down*, a proteína é submetida à análise de forma intacta (estrutura primária da proteína) ao processo de separação, fragmentação e identificação por espectrometria de massa e, na técnica *bottom-up*, também conhecido como *Shotgun*, envolve a análise do peptídeo, sendo necessário o processo de digestão (geralmente por meio do uso da enzima tripsina) para ser submetida à separação por cromatografia líquida, fragmentação e identificação por EM (figura 7)(50,51,54–56).

FONTE: a autora

Figura 7 - Proteômica *top-down* e *bottom-up*. Comparação das metodologias proteômica. Informações adaptadas da referência 35

Na análise *bottom-up*, géis desnaturantes (eletroforese uni [1D] e bidimensional [2DE]) podem ser utilizados para separação seguidos de cromatografia, para isso passam por um processo de solubilização, desagregação, desnaturação e agentes redutores de pontes de dissulfeto. Na eletroforese 2DE a separação das proteínas é caracterizada por duas etapas: a primeira dimensão a focalização isoeletrica (IEF) permite que as moléculas migrem no gel de poliacrilamida baseada no número de carga específica de cada proteína, a segunda dimensão é determinada pela massa molecular (MM) da proteína em um gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Semelhante à eletroforese 1D as proteínas são separadas de acordo com suas MM, diferenciando-se por serem aplicadas diretamente ao gel SDS-PAGE. As bandas geradas a partir das especificações dos géis 1D e 2DE, representam as proteínas, portanto qualquer banda de interesse pode ser cortada para futura identificação por EM (54,57,58).

Há um outro método utilizado para a separação das proteínas com o intuito de reduzir a complexidade da amostra e/ou complementar a separação dos géis, denominada cromatografia líquida (LC), onde os analitos (proteínas) são purificados ou fracionados (54).

1.6.1 Espectrometria de massa

A técnica de espectrometria de massa tem como objetivo obter informações qualitativas e quantitativas das estruturas e peso moleculares das proteínas analisadas, obtidos de fluidos corporais como: urina, líquido cérebro-espinhal, lágrima, saliva, soro/plasma, entre outros. A EM é formada por três componentes: (1°) fontes de ionização, (2°) analisadores de massa e (3°) detectores.

O primeiro componente: a fonte de ionização, é conhecida por dois principais, métodos, denominados *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI), que é utilizado para amostras em estado sólido, onde os peptídeos são cocrystalizados em uma matriz, e após serem atingidos por uma fonte de energia laser, a matriz é sublimada fazendo com o que os íons transfiram suas cargas para os seus analitos, resultando na formação de íons peptídicos. MALDI é considerado eficiente para a detecção de pequenos peptídeos, mas sua eficiência diminui para peptídeos maiores de 100.000Da. Essa técnica possui

variações menos utilizadas, conhecidas como: *Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation* (SELDI) e o *Imaging Mass Spectrometry* (IMS).

Outra fonte de ionização, o *Electrospray Ionization* (ESI) é utilizada para a análise de proteínas em amostras no estado líquido que contém uma mistura de analito e um solvente, que por sua vez atravessam uma agulha capilar com alta voltagem, então consequentemente, a solução é ejetada como uma névoa com pequenas gotas carregadas que após evaporação geram formas ionizadas do analito. Esta técnica preserva a estrutura do analito conforme são transferidos da fase condensada para a gasosa (54,57,59).

Em seguida, os próximos componentes conhecidos como analisadores de massa, são classificados em três principais técnicas. O *Time of Flight* (TOF) que determina a massa do analito através do tempo percorrido entre a ionização e a detecção, o resultado final é um espectro MS analisados e comparados com bancos de dados disponíveis, identificando a proteína de interesse. O *Íon Trap*, um analisador que filtra e aprisiona os íons de interesse em um campo elétrico, na qual são liberados de forma gradual e crescente de acordo com sua massa/carga (m/z), sendo possível determinar sequências peptídicas com várias análises de MS, porém este instrumento possui uma baixa precisão na determinação das massas dos analitos, além disso é possível encontrar outras variações deste instrumento, como o *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* (FT-ICRs) e *Orbitrap*; a terceira técnica, o Quadrupolo (Qs) é caracterizada pela presença de quatro eletrodos em bastão que funcionam como filtros de massa que por meio de um campo elétrico permite somente a passagem de íons com uma determinada m/z para o detector, este tipo de analisador pode ser combinado com o TOF para um melhor desempenho (54,57,59).

Por conseguinte, há os detectores (para a identificação das proteínas), que convertem os sinais dos íons em sinais elétricos. Nesses, os sinais elétricos são interpretados e comparados a um banco de dados por meio do uso de computadores acoplados ao instrumento. Nesta última fase, os detectores realizam o sequenciamento através de duas variações de técnicas - por dissociação induzida por colisão (CID) e transferências de elétrons (ETD), onde os peptídeos mais abundantes são selecionados e fragmentados; na metodologia utilizada ETD é possível preservar as modificações pós-traducionais das proteínas. Essa última técnica tem tido sucesso na aplicação top-down (54,57,59). Esses

métodos descritos estão ilustrados na figura 8.

FONTE: a autora

Figura 8 - Técnicas aplicadas a espectrometria de massa. A espectrometria de massa é composta por três fases: (1°) fontes de ionização, (2°) analisadores de massa e (3°) detectores

1.7 Biomarcadores

O mecanismo biológico, assim como prognóstico e diagnóstico de uma doença podem ser avaliados por meio dos biomarcadores; este termo tem sido mais frequentemente usado nos últimos 15 anos e tem como objetivo indicar uma proteína ou uma combinação delas em fluidos, tais como: saliva, plasma, urina, fluido crevicular, sangue entre outros, apresentando um estado patológico e fisiológico em particular (43). Para isso é necessário que o biomarcador siga alguns requisitos, como: boa reprodutibilidade da técnica, baixo custo, facilidade do teste, alta especificidade com boa sensibilidade da técnica, correlação com a resposta do tratamento e gravidade da doença (3,60).

A análise proteômica da saliva tem crescido na possibilidade de identificar biomarcadores em doenças sistêmicas, como por exemplo em doenças como o diabetes mellitus, esclerose sistêmica difusa, fibrose cística e DECH (43).

O uso da saliva tem vantagens comparada aos outros dois fluídos mais utilizados, sangue e urina, por permitir uma técnica não invasiva ao paciente, sobretudo, sua coleta pode ser realizada a partir da saliva total (estimulada ou não estimulada) e/ou através de sítios específicos como nos ductos das glândulas salivares e do fluido crevicular (43,46); assim, a coleta de saliva permite boa recuperação e prevenção da contaminação da amostra (sangue e restos de alimentos) e também possibilita a quantificação direta do volume (46).

Desta forma, o estudo do fluido salivar que ocorre por meio da caracterização proteômica da saliva do grupo de pacientes, para melhor classificar os padrões de xerostomia e/ou os processos inflamatórios decorrentes das alterações glandulares na DECH, visa contribuir expressivamente para o acompanhamento da evolução da doença, assim como a avaliação de risco e de intervenções, como seus prognósticos (46).

2 OBJETIVOS

A. Estudar o perfil proteômico na saliva de 3 grupos de pacientes: Pacientes com DECH, pacientes diagnosticados com líquen plano oral e pacientes saudáveis.

B. Comparar o perfil proteômico da saliva de pacientes submetidos ao TCTH e de pacientes com DECHc, com o perfil proteômico de pacientes saudáveis e de pacientes diagnosticados com líquen plano oral para identificar proteínas específicas com potencial para o uso como biomarcadores da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Este foi um estudo observacional, longitudinal e prospectivo que inclui pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e não malignas, submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas, com o regime de condicionamento mieloablativo ou não-mieloablativo da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, durante o período de 2013 a 2016.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), parecer n° 9317 (anexo 1). Todos os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 2: TCLE).

3.1.1 Critérios de inclusão dos pacientes

Foram incluídos pacientes adultos (idade ≥ 18 anos), de ambos os sexos, que receberam o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas originários tanto da medula óssea como das células progenitoras periféricas, que foram submetidos ao regime de condicionamento utilizando a quimioterapia, sem associação com a radioterapia corporal total. Além disso foram inclusos os pacientes diagnosticados com líquen plano oral, baseada na aparência clínica e na rotina histopatológica.

3.2 Avaliação clínica

Os dados clínico-demográficos, como sexo, raça e idade, assim como a história clínica e os exames laboratoriais já existentes foram obtidos a partir dos prontuários do HC-FMUSP. O diagnóstico da DECH foi baseado nas classificações definidas pelo *National Institute of Health* (61).

3.3 Coleta de amostra de saliva e armazenamento

As coletas de saliva foram realizadas por meio da técnica de drenagem; resumidamente no método de drenagem, o paciente senta-se confortavelmente em uma cadeira em ambiente bem ventilado e arejado, com a cabeça levemente inclinada para frente, sem deglutir, permitindo que a saliva acumulada possa gotejar em um tubo estéril e mantida em gelo, conforme descrito por Navazesh *et al*, (1993) (62). As coletas foram realizadas na ausência de estímulo mecânico, no período da manhã, entre 09hrs e 11hrs preferencialmente, estando os pacientes em jejum de pelo menos 2 horas. Com o objetivo de inibir a protease e a fosfatase, imediatamente após a coleta foram adicionados 1% (v/v) de solução de coquetel de inibidores de protease e fosfatase (*Sigma-Aldrich, St Louis, EUA*) nas amostras de saliva (63).

Posteriormente, as amostras foram divididas em alíquotas e armazenadas a -20°C, e em seguida, centrifugadas em 2.600 x g por 20 minutos a 4°C, para remoção de materiais insolúveis, células descamadas e restos alimentares. Sequencialmente, o sobrenadante foi acondicionado em tubos de 1,5 ml e armazenados em freezer a -20°C, até o momento das análises (63).

3.3.1 Coleta de amostras

A avaliação foi dividida em 2 etapas; na etapa 1 foi coletada uma única amostra de saliva de 3 pacientes com o diagnóstico confirmado de DECH (figura 9) e de 3 voluntários saudáveis, como controle. Na etapa 2 foram programados quatro períodos de coletas de saliva em 20 pacientes que foram submetidos ao TCTH (figura 10 e 11) e uma coleta de saliva em 10 pacientes com o diagnóstico de líquen plano oral (figura 12), que utilizamos como controle de doença inflamatória. Nesta etapa, especificamente, utilizamos o “pool” para análise das amostras. As características clínicas como as profilaxias utilizadas para a DECH, a fonte de células e os protocolos de regime de condicionamento são detalhados na tabela 5.

FONTE: a autora

Figura 9 - Pacientes com o diagnóstico de DECH. Etapa 1: coleta de saliva de 3 pacientes com o diagnóstico confirmado de DECHc e coleta de saliva de indivíduos saudáveis (grupo controle)

FONTE: a autora

Figura 10 - Períodos de coleta de saliva dos pacientes submetidos ao TCTH. Etapa 2 do estudo com quatro tempos de coleta. DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro (aguda ou crônica); TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas; D+: dias após o TCTH e Pré-TCTH: coletas antes do TCTH (pré-vivo/ pré-óbito)

FONTE: a autora

Figura 11 - Pacientes submetidos ao TCTH. Etapa 2: coleta de saliva de 20 pacientes submetidos ao TCTH

FONTE: a autora

Figura 12 - Líquen Plano oral. Etapa 2: coleta de saliva de 10 pacientes com o diagnóstico de Líquen Plano oral

Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes

Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo, etapa 1 e 2			
		Etapa 1	Etapa 2
Características		N= 3	N=20
Idade, média (variação)		46 (19-61)	34,15 (19-60)
Gênero	Masculino:	3:0	10:10
	Feminino		

continua

Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes

Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo, etapa 1 e 2			
		Etapa 1	Etapa 2
Diagnóstico, n°. (%)	Leucemia mielóide aguda	-	6 (30)
	Leucemia mielóide crônica	-	3 (15)
	Linfoma não-Hodking	1 (33.3)	1 (5)
	Leucemia linfóide aguda	1 (33.3)	4 (20)
	Anemia aplástica grave	-	4 (20)
	Linfoma de Hodking	-	-
	Mielofibrose	1 (33.3)	-
	Anemia Falciforme	-	-
	Mieloma múltiplo		1 (5)
	Outros	-	1 (5)
Gênero doador/receptor, n° (%)	Masculino→ Masculino	2 (66)	6 (30)
	Feminino→ Feminino		8 (40)
	Outros	1 (33)	6 (30)
Fontes das células hematopoiéticas, n° (%)	Medula óssea		8 (40)
	Célula progenitora periférica	3 (100)	12 (60)
Regime de condicionamento, n° (%)	Mieloablativo	1 (33)	9 (45)
	Não-mieloablativo (intensidade reduzida)	2 (66)	11 (55)

Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes

Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo, etapa 1 e 2			
		Etapa 1	Etapa 2
Profilaxia para DECH	Metotrexato + ciclosporina	2 (66)	18 (90)
	Ciclosporina	1 (33)	2 (5)
Características clínicas dos controles incluídos no estudo			
		Saudáveis	Líquen Plano oral
Características		N=3	N=10
Idade, média (variação)		45,3 (18-61)	57,2 (42-76)
Genêro	Masculino: Feminino	3:0	1:9
Diagnóstico	LPO	-	10 (100)

3.4 Análise proteômica

3.4.1 Precipitação das proteínas

As proteínas presentes nas amostras de saliva foram precipitadas em solução de acetona 1:4 (v/v) por 30 minutos no gelo. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 2.600 x g por 30 minutos a 4°C. Os excessos de sobrenadantes foram retirados e os precipitados foram secos em temperatura ambiente por 1 hora e em seguida solubilizados em tampão bicarbonato de amônio 50mM pH 8,5 (64).

3.4.2 Dosagem Proteica

A Concentração proteica total das amostras foram determinadas pelo método do

ácido bicinonínico (BCA), descrito por Smith PK *et al*, (1985), seguindo as instruções do fabricante (Thermo Scientific, Massachussets, EUA) (65). As amostras foram colocadas em placas de 96 poços em duplicata com as soluções de BCA, em seguida a preparação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Os valores de absorbância foram determinados a 565nm em um leitor de placa de ELISA (Multiskan Go - Thermo Fisher), por conseguinte a concentração proteica da amostra foi determinada realizando-se a equação de curva padrão, no programa Excel® 2016 (Microsoft, WA, EUA).

3.4.3 Caracterização do perfil de proteínas por Eletroforese SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) e 2DE (*Two Dimensional gel Electrophoresis*)

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em gel de 12% de poliacrilamida com 1,5mm de espessura. As migrações das proteínas foram feitas sob amperagem fixa (20mA) por gel, até o corante alcançar a base do mesmo.

Na focalização isoeletrica (primeira dimensão do 2DE), alíquotas das amostras concentradas com 120µg de proteínas foram diluídas em 140µl de tampão de reidratação (7M uréia, 2M tiouréia, 2% CHAPS, 0,002% azul bromofenol, água deionizada, 6mM de ditioneitol [DTT] e 1µl IPG *buffer*) e adicionadas em fitas IEF de pH 3-10 (*ReadyStrip™* IPG *Strips*, Bio-Rad). As amostras ficaram *overnight* por 12 horas.

A focalização isoeletrica foi conduzida em sistema PROTEAN i12 (Bio-Rad) a 20°C, o programa de focalização foi estabelecido conforme os seguintes passos: 500V por 30 minutos, 1000 V por 30 minutos, 8000 V por 4 horas.

Na realização da corrida de eletroforese de segunda dimensão (2DE) em gel de poliacrilamida, as fitas foram reduzidas e alquiladas em solução de equilíbrio (tris-HCL pH 8.8 1.5M, 6M uréia, 29,3% glicerol (v/v), 2% SDS (p/v), 0,002% (p/v) azul de bromofenol e água deionizada) da seguinte maneira: inicialmente, as fitas foram submetidas à redução pela imersão da mesma solução de equilíbrio acrescida de 3ml

de DTT a 1% por 15 minutos. Em seguida, foi realizado a alquilação na mesma solução contendo 3ml IAA a 4% (p/v) por 15 minutos. As fitas foram moldadas na parte superior de um gel vertical de poliacrilamida e seladas com 1,2% de agarose em tampão Laemmli. Neste momento seguimos o protocolo de SDS-PAGE já descrito anteriormente.

Após o término das corridas, foram feitas lavagens de 30 minutos em solução fixadora (40% metanol (v/v), 10% ácido acético (v/v)), para a retirada do excesso de solução e em seguida, foi adicionado a solução de coloração.

Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant blue* R-350 (GE Healthcare®). Todas estas etapas foram realizadas sob agitação, com o auxílio de um agitador de mesa horizontal. O excesso de corante foi removido com água deionizada e o gel foi mantido em 5% (v/v) de ácido acético a 4°C, até o momento da análise das imagens.

3.4.4 Digestão das amostras de saliva

O processo de digestão das amostras foram feitas, na etapa 2, de acordo com o protocolo pré estabelecido pela Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz” (ESALQ) (66).

Alíquotas de cinquenta microgramas (μg) de proteínas para cada *pool* de amostras foram utilizadas para o processo de digestão. Primeiramente, foram adicionados 25 μl de solução de uréia a 0,2% (Sigma-Aldrich®), incubando em um bloco aquecido a 80°C por 15 minutos. A seguir para deixar a proteína mais acessível (abrindo a proteína) aos passos de alquilação e digestão adicionamos 2,5 μl de 100mM de DTT (BioRad®) incubando a 60°C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 2,5 μl de 300mM de Iodoacetamida (IAA – GE®) para alquilação e incubado por 30 minutos, protegido de luz e em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 10 μl de uma solução de tripsina da Promega® (Madison, WI, EUA) prosseguindo com a digestão por 16 horas a 37°C. No segundo dia, completada a digestão, foi adicionado 10 μl de 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA – Sigma-Aldrich®) e incubado a 37°C por 90 minutos, além disso após este procedimento centrifugamos as amostras a 18.000 x g, por 30 minutos a 6°C. Concentramos as amostras

em centrífuga a vácuo (miVac – Duo concentrador – Barnstead®) e armazenamos até a análise. Para a purificação ressuspendemos as amostras em 50µl de solução de TFA e utilizamos colunas C18 (Zip Tip *Reversed Phase* P10 Millipore®) conforme protocolo ESALQ que possui como referência o *User Guide For Reversed-Phase ZipTip C18, P10* (Millipore®) com modificações (67).

3.4.5 Identificação das proteínas por espectrometria de massa

As análises de espectrometria de massa foram realizadas na etapa 1 em colaboração com o Laboratório de Enzimologia e Proteômica da Universidade Federal de Ouro Preto, que utilizou o instrumento Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, EUA) e na etapa 2 no Centro de Facilidades para a pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), na qual os peptídeos foram analisados por LC-MS de nanofluxo on-line em um sistema EASY-nLC II (Thermo Scientific®) ligado a um instrumento LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific®) através de uma fonte de íons de nanoelectrospray Proxeon. Os peptídeos foram separados em uma coluna EASY analítica (10cm, ID75µm, C18-Thermo Scientific®) previamente aprisionada em uma pré coluna EASY (2cm, ID100µm, 5µm, C18-Thermo Scientific®). Separaram-se os peptídeos digeridos por triptídeos utilizando um gradiente linear de 60 min de 0-60% de tampão B (acetonitrila em ácido fórmico a 0,1%) a um caudal de 300 nL/ min.

O espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap Velos foi operado em modo de íon positivo utilizando o modo DDA (*data-dependent acquisition*) em que os 20 íons precursores mais intensos de uma varredura MS completa foram selecionados para fragmentação por CID (*collision induced dissociation*).

Todos MS scans foram realizados com 60.000 de resolução e o intervalo de scans para m/z foi 400-1200. A energia de colisão CID normalizada foi de 35 eV para um íon precursor com carga dupla com isolamento de 2 m/z, a ativação Q de 0,250 e tempo de ativação de 10ms. O limiar de sinal mínimo foi de 15000 contagens e para exclusão dinâmica foi considerado 1 repetição de contagem com uma duração de 30s. A fim de

discriminar o estado de carga dos peptídeos, o rastreo do estado da carga foi ativado e os íons com estado de carga não atribuído ou com carga isolada foram rejeitados.

3.5 Análise de dados

3.5.1 Pesquisa no Banco de Dados

Os espectros de MS/MS de cada corrida de LC-MS/MS foram pesquisados contra a base de dados Uniprot - Homosapiens utilizando um software interno *Proteome Discover* 1.4 (Thermo, EUA) como motor de busca. Os critérios de pesquisa foram os seguintes: foi requerida uma especificidade tríplica completa, permitiu-se a falta de clivagem perdida, a carbamidometilação (C) foi definida como a modificação fixa e a oxidação (M) foi definida como a modificação variável, as tolerâncias de massa do íon precursor foram ajustadas em 10 ppm para todos os MS adquiridos num analisador de massa de orbitrap e a tolerância de massa de íons de fragmento foi ajustada em 0,6 Da para todos os espectros de MS2 adquiridos.

Os espectros foram obtidos usando o algoritmo SequestHT através do software *Proteome Discover* (versão 1.4, Thermo Scientific®). O detector de área do íon precursor foi escolhido para quantificação por uma abordagem sem rótulo. Os parâmetros de pesquisa incluíram:

- (i) enzima: Tripsina / P;
- (ii) número de locais de clivagem perdidos = 2;
- (iii) carbamidometilação, como uma modificação estática;
- (iv) oxidação de metionina N-terminal e acetilação, como mudanças dinâmicas
- (v) uma tolerância de massa de 10 ppm para íons parentais e 0,1 Da para os fragmentos.

A base de dados de proteínas humanas disponível no servidor UniProt (www.uniprot.org) contendo 12 – 544 sequências, foram utilizadas para as pesquisas. Uma proteína foi considerada para ser identificada com precisão, em 1% de taxa de falsa descoberta,

quando dois ou mais peptídeos foram achados.

3.5.2 Classificação funcional do proteoma

As proteínas diferencialmente expressas entre os grupos foram representados por meio do Diagrama de Venn, disponível no site www.bioinformatics.psb.ugent.be, que tem como objetivo representar relações numéricas entre diferentes grupos (68,69). Estas proteínas foram classificadas utilizando o sistema *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships* (PANTHER), disponível no site www.pantherdb.org, que tem como objetivo concluir a função do gene através de estatísticas binomiais (70). As funções dos genes foram classificadas de acordo com *Gene Ontology*, em cinco categorias, sendo eles: componente celular que relaciona o local na célula onde o produto gênico é ativo, função molecular que define a atividade bioquímica deste produto, processo biológico na qual informa o objetivo biológico que o produto gênico participa, a classe proteica que este gene está relacionado e por último a via de sinalização na qual o gene participa (70,71).

3.5.3 Análise quantitativa do proteoma

Para analisar padrões quantitativos no perfil de proteínas entre os pacientes com DECHc e saudáveis (etapa 1) foi utilizado a ferramenta *Heatmaps*, que é um método eficiente para interpretação de dados complexos, que traduz uma matriz numérica em uma imagem colorida correspondente a seus valores, tornando os padrões mais visíveis aos olhos (72,73).

4 RESULTADOS

4.1 Características gerais das amostras

Inicialmente, na etapa 1 do estudo, do total de pacientes diagnosticados com DECH, 3 receberam enxerto de células progenitoras periféricas. Todos esses pacientes eram do sexo masculino, com idade média de 46 anos de idade. Entre as doenças de base, houve 1 paciente diagnosticado com linfoma não-Hodgkin (33%), 1 paciente diagnosticado com leucemia linfóide aguda (33%) e 1 paciente diagnosticado com mielofibrose (33%), portanto 100% dos casos foram de neoplasias hematológicas.

Na etapa 2 do estudo, dos vinte (20) pacientes submetidos ao TCTH alogênico, 8 (40%) receberam enxerto da medula óssea e 12 (60%) de células progenitoras periféricas. Destes 10 (50%) eram do sexo feminino e 10 (50%) do sexo masculino, com idade média de 34 anos. Entre as doenças de base, houve 6 (30%) casos de leucemia mielóide aguda, 3 (15%) de leucemia mielóide crônica, 1 (5%) caso de linfoma não-Hodgkin, 4 (20%) casos de leucemia linfóide aguda, 1 (5%) caso de mieloma múltiplo, 4 (20%) casos de anemia aplástica grave e 1 (5%) com o envolvimento de outras doenças, assim sendo 83,3% dos casos são de neoplasias hematológicas e 16,7% representam as doenças não neoplásicas.

Na segunda etapa do estudo, dos vinte pacientes avaliados, sete evoluíram ao óbito antes da segunda coleta (período pré-óbito); assim, a coleta em outros tempos da doença foi realizada em 13 pacientes.

Para o grupo controle coletamos a saliva de dez (10) pacientes diagnosticados com LPO, destes 1 (10%) era do sexo masculino e 9 (90%) do sexo feminino, com idade média de 57 anos; outro grupo controle coletado foram amostras de saliva de indivíduos saudáveis, das três (3) amostras, todos os voluntários eram do sexo masculino, com idade média de 45 anos.

4.2 Avaliação do fluxo salivar

Nos pacientes avaliados a média do fluxo salivar não estimulado foi de 0,246 mL/min nos pacientes com DECHc e de 0,406 mL/min nos pacientes com LPO. Na coleta pré-TCTH a média de fluxo salivar foi de 0,376 mL/min; 0,356 mL/min no período D+30; 0,406 mL/min no terceiro período (D+100) e de 0,408 mL/min no período D+200 (Figura 13).

FONTE: a autora

Figura 13 - Variação do fluxo salivar. Média do fluxo salivar de pacientes com DECHc (etapa 1), comparado com o fluxo salivar dos pacientes submetidos ao TCTH, nos períodos avaliados, e LPO (etapa 2)

4.2.2 Características da Doença do Enxerto contra hospedeiro

Dos pacientes estudados na etapa 1, 100% dos casos apresentaram DECH crônica, no momento da coleta. Todos tiveram o envolvimento da pele e cavidade oral e dois dos casos tiveram o envolvimento dos olhos e do trato gastrointestinal. Já os pacientes estudados na etapa 2, somente quatro pacientes desenvolveram DECH aguda até o momento da última coleta, e, em um dos pacientes houve o envolvimento intestinal (grau II) e nos demais o envolvimento da pele (grau I e II).

4.3 Estudo do Proteoma

4.3.1 Caracterização do perfil de proteínas

No gel de eletroforese bidimensional (2DE) foi possível visualizar dois perfis de proteínas: pacientes com DECH e voluntários saudáveis com faixas de pH entre 3 a 10 (figura 14), que demonstram padrões diferentes entre as duas amostras e apresentaram uma uniformidade na distribuição dos peptídeos através do gradiente de pH com prevalência das proteínas localizadas na região básica. Neste mesmo gel foi possível identificar modificações pós-traducionais.

Comparando as amostras do gel SDS-PAGE, o conteúdo proteico dos pacientes com DECH e voluntários saudáveis mostrou pouca diferença; a principal diferença detectada foi a intensidade das bandas na comparação dos grupos (figura 15).

FONTE: a autora

Figura 14 - Gel Bidimensional (2DE) das amostras de saliva de pacientes com DECHc e pacientes saudáveis. Géis 2DE: Nas figuras A e B temos a representação do perfil proteômico de pacientes com DECHc e nas figuras C e D é possível visualizar o perfil proteômico de voluntários saudáveis

FONTE: a autora

Figura 15 - Gel Unidimensional (SDS-PAGE) das amostras de saliva de pacientes com DECH e pacientes saudáveis. SDS-PAGE: Na figura temos a representação do perfil proteômico de pacientes com DECH e o perfil proteômico de voluntários saudáveis

4.3.2 Identificação do proteoma salivar – etapa 1

Foram detectadas 307 proteínas por espectrometria de massa nas amostras de saliva de pacientes com DECH e saudáveis (anexo 5). Destas proteínas 150 foram identificadas somente nos pacientes com DECH (tabela 6) e 41 apenas nas amostras de saliva de voluntários saudáveis (figura 16).

FONTE: a autora

Figura 16 - Diagrama de Venn comparando o perfil das proteínas diferencialmente expressas nas amostras de saliva de pacientes com DECH e de indivíduos saudáveis. Diagrama das proteínas diferencialmente expressas entre pacientes com DECH (150) e voluntários saudáveis (41)

Tabela 6 - Proteínas identificadas somente nos pacientes com DECHc (total de 150 proteínas)

	Proteínas identificadas	Número de acesso
1	10 kDa heat shock protein mitochondrial	P61604 CH10_HUMAN ⁺³
2	14-3-3 protein epsilon	P62258 1433E_HUMAN ⁺³
3	60S rib	tr K7EJT5 K7EJT5_HUMAN
4	78 kDa gluc	P11021 GRP78_HUMAN ⁺⁶
5	Adenylyl cyclase-associated protein 1	Q01518 CAP1_HUMAN ⁺⁴
6	ADP-rib	P61204 ARF3_HUMAN
7	Alpha-1-acid glycoprotein 1	P02763 A1AG1_HUMAN ⁺³
8	Alpha-1-acid glycoprotein 2	P19652 A1AG2_HUMAN ⁺³
9	Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765 FETUA_HUMAN

continua

continuação

Tabela 6 - Proteínas identificadas somente nos pacientes com DECHc (total de 150 proteínas)

Proteínas identificadas		Número de acesso
10	Alpha-2-macroglobulin	P01023 A2MG_HUMAN ⁺⁸
11	Annexin A3	P12429 ANXA3_HUMAN ⁺³
12	Apolipoprotein A-I	P02647 APOA1_HUMAN
13	Azurocidin	P20160 CAP7_HUMAN ⁺²
14	Beta-2-microglobulin	P61769 B2MG_HUMAN ⁺⁴
15	Cadherin-1	tr A0A087WXI5 A0A087WXI5_HUMAN ⁺²
16	Calmodulin	P62158 CALM_HUMAN
17	Calmodulin-like protein 3	P27482 CALL3_HUMAN ⁺³
18	Calnexin	P27824 CALX_HUMAN
19	Catalase	P04040 CATA_HUMAN ⁺⁴
20	Cathelicidin antimicrobial peptide	P49913 CAMP_HUMAN ⁺³
21	Cathepsin B	P07858 CATB_HUMAN
22	Ceruloplasmin	P00450 CERU_HUMAN ⁺⁶
23	Ceruloplasmin (Fragment)	tr H7C5R1 H7C5R1_HUMAN ⁺⁶
24	Chitinase-3-like protein 2 (Fragment)	tr E9PII8 E9PII8_HUMAN
25	Coact	Q14019 COTL1_HUMAN
26	Collagen alpha-1(I) chain	P02452 CO1A1_HUMAN
27	Collagen alpha-2(V) chain	P05997 CO5A2_HUMAN
28	Complement C4-A	P0C0L4 CO4A_HUMAN ⁺⁷
29	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein mitochondrial (Fragment)	tr I3L3Q7 I3L3Q7_HUMAN
30	Cystatin-A	P01040 CYTA_HUMAN ⁺³
31	Cystatin-B	P04080 CYTB_HUMAN ⁺³
32	E	P12724 ECP_HUMAN

continua

continuação

Tabela 6 - Proteínas identificadas somente nos pacientes com DECHc (total de 150 proteínas)

Proteínas identificadas		Número de acesso
33	Elongation factor 1-alpha 1	P68104 EF1A1_HUMAN
34	Elongation factor 1-gamma	P26641 EF1G_HUMAN
35	Elongation factor 2	P13639 EF2_HUMAN
36	Epiplakin	tr A0A087X1U6 A0A087X1U6_HUMAN ⁺²
37	ERO1-like protein alpha	Q96HE7 ERO1A_HUMAN ⁺²
38	Ezrin	tr E7EQR4 E7EQR4_HUMAN ⁺³
39	Fatty acid-binding protein epidermal	Q01469 FABP5_HUMAN ⁺³
40	Fibrinogen beta chain	P02675 FIBB_HUMAN ⁺⁶
41	Fibromodulin	Q06828 FMOD_HUMAN
42	Filamin-A	tr A0A087WWY3 A0A087WWY3_HUMAN
43	Fruct	tr H3BPS8 H3BPS8_HUMAN ⁺²
44	Galectin-3-binding protein	Q08380 LG3BP_HUMAN ⁺⁶
45	Galectin-7	P47929 LEG7_HUMAN
46	Haptoglobin	P00738 HPT_HUMAN ⁺⁶
47	HCG1745306 isoform CRA_a	tr G3V1N2 G3V1N2_HUMAN ⁺³
48	HCG2043238 (Fragment)	tr A0A075B6K4 A0A075B6K4_HUMAN ⁺³
49	Heat shock protein beta-1	P04792 HSPB1_HUMAN ⁺³
50	Hemoglobin subunit beta (Fragment)	tr F8W6P5 F8W6P5_HUMAN
51	Hemopexin	P02790 HEMO_HUMAN ⁺⁵
52	Histidine-rich glycoprotein	P04196 HRG_HUMAN
53	Ig gamma-1 chain C region	P01857 IGHG1_HUMAN ⁺²
54	Ig gamma-2 chain C region	P01859 IGHG2_HUMAN ⁺³
55	Ig gamma-3 chain C region	P01860 IGHG3_HUMAN ⁺²

continua

continuação

Tabela 6 - Proteínas identificadas somente nos pacientes com DECHc (total de 150 proteínas)

Proteínas identificadas		Número de acesso
56	Immunoglobulin heavy variable 1-18	A0A0C4DH31 HV118_HUMAN
57	Immunoglobulin heavy variable 1-2	P23083 HV102_HUMAN
58	Immunoglobulin heavy variable 1-3	A0A0C4DH29 HV103_HUMAN
59	Immunoglobulin heavy variable 1-46	P01743 HV146_HUMAN
60	Immunoglobulin heavy variable 4-34	P06331 HV434_HUMAN ⁺²
61	Immunoglobulin kappa variable 1D-33	P01593 KVD33_HUMAN
62	Immunoglobulin kappa variable 2D-40	tr A0A087X0Q4 A0A087X0Q4_HUMAN
63	Immunoglobulin lambda variable 2-23	P01705 LV223_HUMAN
64	Immunoglobulin lambda variable 3-19	P01714 LV319_HUMAN
65	Inactive carboxypeptidase-like protein X2	Q8N436 CPXM2_HUMAN
66	Isoform 1 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	Q13404-1 UB2V1_HUMAN
67	Isoform 1B of Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1	Q9UBS5-2 GABR1_HUMAN
68	Isoform 2 of 40S rib	P23396-2 RS3_HUMAN
69	Isoform 2 of Alpha-actinin-1	P12814-2 ACTN1_HUMAN ⁺⁶
70	Isoform 2 of Annexin A2	P07355-2 ANXA2_HUMAN ⁺⁴
71	Isoform 2 of Fibrinogen alpha chain	P02671-2 FIBA_HUMAN ⁺⁵
72	Isoform 2 of Ficolin-3	O75636-2 FCN3_HUMAN
73	Isoform 2 of Interleukin-36 gamma	Q9NZH8-2 IL36G_HUMAN ⁺³
74	Isoform 2 of Kallikrein-1	P06870-2 KLK1_HUMAN ⁺²
75	Isoform 2 of Macrophage-capping protein	P40121-2 CAPG_HUMAN ⁺⁴
76	Isoform 2 of Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	P80188-2 NGAL_HUMAN ⁺⁴
77	Isoform 2 of Spectrin alpha chain non-erythrocytic 1	Q13813-2 SPTN1_HUMAN

continua

continuação

Tabela 6 - Proteínas identificadas somente nos pacientes com DECHc (total de 150 proteínas)

Proteínas identificadas		Número de acesso
78	Isoform 2 of Sulfhydryl oxidase 1	O00391-2 QSOX1_HUMAN ⁺²
79	Isoform 3 of Ly-6/neurotoxin-like protein 1	Q9BZG9-3 LYNX1_HUMAN
80	Isoform 3 of Nuclear receptor corepressor 2	Q9Y618-3 NCOR2_HUMAN
81	Isoform 3 of Protein disulfide-isomerase A6	Q15084-3 PDIA6_HUMAN ⁺³
82	Isoform 4 of Complement decay-accelerating factor	P08174-4 DAF_HUMAN
83	Isoform 4 of Fibronectin	P02751-4 FINC_HUMAN ⁺²
84	Isoform 5 of Acyl-CoA-binding protein	P07108-5 ACBP_HUMAN ⁺⁴
85	Isoform 6 of Filamin-B	O75369-6 FLNB_HUMAN
86	Isoform C of Prelamin-A/C	P02545-2 LMNA_HUMAN ⁺⁵
87	Isoform DeltaLf of Lactotransferrin	P02788-2 TRFL_HUMAN ⁺⁶
88	Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain	P02679-2 FIBG_HUMAN ⁺³
89	Isoform H14 of Myeloperoxidase	P05164-2 PERM_HUMAN ⁺⁵
90	Kallikrein-10	O43240 KLK10_HUMAN ⁺³
91	Kallikrein-13	Q9UKR3 KLK13_HUMAN ⁺²
92	Kallikrein-6	Q92876 KLK6_HUMAN ⁺²
93	Keratin type I cyt	tr K7EQH6 K7EQH6_HUMAN ⁺⁴
94	Kinesin-like protein KIF1A (Fragment)	tr F8W8V9 F8W8V9_HUMAN
95	Kininogen-1	P01042 KNG1_HUMAN ⁺³
96	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	P02750 A2GL_HUMAN ⁺²
97	Leukocyte elastase inhibitor	P30740 ILEU_HUMAN ⁺⁴
98	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A ⁺²	P08637 FCG3A_HUMAN ⁺²
99	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B	tr A0A087WZR4 A0A087WZR4_HUMAN
100	Malate dehydrogenase	tr G3XAL0 G3XAL0_HUMAN ⁺²

continua

continuação

Tabela 6 - Proteínas identificadas somente nos pacientes com DECHc (total de 150 proteínas)

Proteínas identificadas	Número de acesso
101 Malate dehydrogenase cytoplasmic	P40925 MDHC_HUMAN
102 My	P19105 ML12A_HUMAN
103 My	P35579 MYH9_HUMAN ⁺⁶
104 Myeloid-derived growth factor (Fragment)	tr M0QXF7 M0QXF7_HUMAN
105 N(4)-(beta-N-acetylgluc	tr H0Y9C7 H0Y9C7_HUMAN
106 Neutrophil elastase	P08246 ELNE_HUMAN ⁺⁴
107 Non-secretory ribonuclease	P10153 RNAS2_HUMAN
108 NSFL1 cofactor p47	tr F2Z2K0 F2Z2K0_HUMAN ⁺²
109 Olfactomedin-4	Q6UX06 OLFM4_HUMAN
110 Peptidoglycan recognition protein 1	O75594 PGRP1_HUMAN ⁺²
111 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	P62942 FKB1A_HUMAN ⁺²
112 Periplakin	tr K7EKI8 K7EKI8_HUMAN ⁺⁵
113 Peroxiredoxin-1 (Fragment)	tr A0A0A0MSI0 A0A0A0MSI0_HUMAN ⁺³
114 Peroxiredoxin-2	P32119 PRDX2_HUMAN ⁺³
115 Plasminogen	P00747 PLMN_HUMAN
116 Plastin-2	P13796 PLSL_HUMAN ⁺⁵
117 Plastin-3	tr A0A0A0MSQ0 A0A0A0MSQ0_HUMAN ⁺³
118 Pr	Q16651 PRSS8_HUMAN ⁺²
119 Profilin-1	P07737 PROF1_HUMAN ⁺³
120 Protein disulfide-isomerase A3	P30101 PDIA3_HUMAN ⁺³
121 Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment)	tr H7BZJ3 H7BZJ3_HUMAN ⁺⁴
122 Protein IGHV1OR15-1 (Fragment)	tr A0A075B7D0 A0A075B7D0_HUMAN

continua

continuação

Tabela 6 - Proteínas identificadas somente nos pacientes com DECHc (total de 150 proteínas)

Proteínas identificadas	Número de acesso
123 Protein IGKV2-24 (Fragment)	tr A0A0C4DH68 A0A0C4DH68_HUMAN
124 Protein IGKV3D-15 (Fragment)	tr A0A087WSY6 A0A087WSY6_HUMAN ⁺²
125 Protein S100-A11	P31949 S10AB_HUMAN
126 Protein S100-A6	P06703 S10A6_HUMAN ⁺²
127 Protein S100-A7	P31151 S10A7_HUMAN ⁺⁵
128 Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	P22735 TGM1_HUMAN ⁺⁴
129 Putative nucle	O60361 NDK8_HUMAN
130 Putative V-set and immunoglobulin domain- containing-like protein IGHV4OR15-8 (Fragment)	tr A0A075B7B6 A0A075B7B6_ HUMAN ⁺²
131 R3H domain-containing protein 2	tr B5MCU0 B5MCU0_HUMAN
132 Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	tr A0A0J9YXZ5 A0A0J9YXZ5_ HUMAN ⁺³
133 Resistin	Q9HD89 RETN_HUMAN
134 Retinol binding protein 4 plasma isoform CRA_b	tr Q5VY30 Q5VY30_HUMAN ⁺²
135 Rho GDP-dissociation inhibitor 1	tr J3KRE2 J3KRE2_HUMAN
136 Salivary acidic proline-rich ph	tr A0A087WYF5 A0A087WYF5_HUMAN
137 Serine protease 27	Q9BQR3 PRS27_HUMAN
138 Serotransferrin	P02787 TRFE_HUMAN ⁺⁸
139 SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	tr Q5T123 Q5T123_HUMAN ⁺³
140 SPARC-like protein 1	Q14515 SPRL1_HUMAN
141 Transmembrane protease serine	tr A0A0G2JN10 A0A0G2JN10_ HUMAN ⁺²

continua

Tabela 6 - Proteínas identificadas somente nos pacientes com DECHc (total de 150 proteínas)

Proteínas identificadas	Número de acesso
142 Transmembrane protease serine 11D	O60235 TM11D_HUMAN ⁺³
143 Tyr	P29350 PTN6_HUMAN
144 Uncharacterized protein	tr B4E1Z4 B4E1Z4_HUMAN ⁺²
145 Uncharacterized protein (Fragment)	tr A0A0J9YXX1 A0A0J9YXX1_HUMAN
146 Vimentin	tr B0YJC4 B0YJC4_HUMAN ⁺³
147 Vitronectin	P04004 VTNC_HUMAN ⁺³
148 Volume-regulated anion channel subunit LRRC8C	Q8TDW0 LRC8C_HUMAN
149 Zinc finger protein 185	tr H7BZT5 H7BZT5_HUMAN
150 Zymogen granule protein 16 homolog B	Q96DA0 ZG16B_HUMAN ⁺⁵

Proteínas identificadas (n=150) na saliva de pacientes incluídos no estudo da etapa 1, colocadas em ordem alfabética. Os nomes foram mantidos na língua inglesa, por serem assim reconhecidas nas publicações internacionais

Inicialmente, os perfis proteicos dos pacientes com DECHc e dos indivíduos saudáveis foram classificados e comparados (tabela 7) entre si através do programa Gene Ontology. As funções moleculares das proteínas dos pacientes com DECHc foram classificadas e as classes mais abundantes foram as proteínas de ligação (41,2%) e envolvidas na atividade catalítica (36,8%) (Figura 17). Acrescentando-se, das proteínas de ligação consideradas houve a expressão de proteínas de: ligação ao antígeno (10,3%), ao íon cálcio (15,5%), de lipídios (1,7%), de ácidos nucleicos (1,7%) e ligação proteica (70,7%).

Tabela 7 - Comparação do perfil de proteínas na DECH vs indivíduos saudáveis. (*Gene ontology*)

		DECH	Saudável
Função Molecular	Ligação	41,2%	33,3%
	Atividade catalítica	36,8%	42,9%
	Atividade do receptor	4,4%	4,8%
	Atividade de estrutural molecular	10,5%	14,3%
	Atividade de transporte	1,8%	4,8%
	Atividade antioxidante	2,6%	0%
	Atividade de regulador traducional	2,6%	0%
Processo Biológico	Adesão biológica	2,5%	5,6%
	Regulação biológica	5,8%	4,2%
	Biogêneses	7,5%	8,5%
	Processo celular	27,0%	21,1%
	Processo de desenvolvimento	3,3%	4,2%
	Processo do sistema imune	9,5%	12,7%
	Localização	7,9%	9,9%
	Processo metabólico	19,9%	16,9%
	Processo multicelular do organismo	7,5%	8,5%
	Resposta ao estímulo	9,1%	7,0%
	Locomoção	0%	1,4%
	Junção celular	0,9%	0%
Componente celular	Fração celular	21,7%	13,6%
	Matriz extracelular	2,6%	13,6%
	Região extracelular	24,3%	36,4%
	Complexo macromolecular	7,8%	9,1%
	Membrana	7,0%	13,6%
	Organela	13,0%	13,6%

continua

Tabela 7 - Comparação do perfil de proteínas na DECH vs indivíduos saudáveis. (*Gene ontology*)

	DECH	Saudável
Proteína de ligação ao cálcio	9,6%	3,7%
Proteína citoesquelética	7,5%	3,7%
Proteína de defesa/Imunidade	4,8%	11,1%
Modulador enzimático	13,0%	14,8%
Proteína da matriz extracelular	3,4%	3,7%
Hidrolase	13,0%	7,4%
Isomerase	2,1%	3,7%
Liase	0%	3,7%
Proteína de tráfego de membrana	0%	3,7%
Ligação de ácido nucleico	4,8%	7,4%
Classe de proteínas Receptor	6,8%	3,7%
Fator de transcrição	0,7%	7,4%
Proteína de transferência	4,1%	7,4%
Transferase	1,4%	7,4%
Transportador	0,7%	11,1%
Molécula de adesão celular	4,1%	0%
Proteína de junção celular	0,7%	0%
Chaperone	3,4%	0%
Oxidoredutase	5,5%	0%
Molécula de sinalização	13,0%	0%
Proteína estrutural	1,4%	0%
Vias de sinalização Angiogênese	8,3%	4,8%
Coagulação do sangue	8,3%	11,3%
Via de sinalização da integrina	25,0%	8,1%
Outros vias	58,4%	75,8%

FONTE: a autora

Figura 17 - Função molecular das proteínas identificadas na DECHc. Abundância das proteínas salivares de acordo com a função molecular (*Gene ontology*)

Das proteínas classificadas na atividade catalítica: 8,2% são envolvidas em atividade reguladora de enzimas, 57,1% em atividade de hidrólise, 10,2% relacionadas a atividade da Isomerase, 2% relativa a atividade de liase, 14,3% de proteínas envolvidas na atividade de oxidoreductase e 8,2% representando a atividade da transferase.

As proteínas foram também classificadas quanto ao processo biológico na qual participam, resultando em uma lista de dez diferentes categorias, ilustradas na figura 18; dentre elas houve um maior número de proteínas envolvidas no processo celular (27,0%) e no processo metabólico (19,9%). Entre as proteínas relacionadas ao processo celular destacam-se os processos de comunicação celular (51,1%), ciclo celular (20,0%), reconhecimento de antígenos (13,3%), componente do movimento celular (13,3%) e a citocinese (2,2%). No processo metabólico as proteínas foram categorizadas em: biossíntese representando 8,9%, catabolismo com 7,6%, 2,5% de geração de metabólitos precursores e de energia, 15,2% do processo metabólico do composto nitrogenado, 6,3% do processo metabólico composto contendo fosfato, 57% das proteínas envolvidas no processo metabólico primário e 2,5% representando o processo metabólico do composto de enxofre.

FONTE: a autora

Figura 18 - Processo biológico das proteínas identificadas na saliva de pacientes com DECHc. Classificação e distribuição das proteínas de acordo com os processos biológicos – etapa 1 (*Gene ontology*)

O proteoma destes pacientes demonstrou que 28,1% do total de proteínas identificadas estão localizadas na fração celular e 31,5% estão presentes em regiões extracelulares, conforme demonstra a figura 19.

FONTE: a autora

Figura 19 - Componente Celular das proteínas identificadas na saliva de pacientes com DECHc. Distribuição das proteínas de acordo com sua localização nos componentes celulares - etapa 1 (*Gene ontology*)

Uma das classificações realizadas através da classe de proteína (Gene Ontology) demonstraram uma predominância de moléculas de sinalização (13%), de hidrólise (13%) e de enzimas moduladoras (13%). As moléculas de sinalização no perfil proteômico destes pacientes foram classificadas por 33,3% de citocinas, 11,1% de fator de crescimento, 11,1% de molécula de sinalização ligada a membrana e 44,4% de hormônio peptídico.

As vias de sinalização foram classificadas em 30 categorias, demonstrando um maior número de proteínas envolvidas na via de coagulação sanguínea (11,3%), ativação de células B (6,5%), cascata de ativação do plasminogênio (6,5%) e ativação de células T (6,5%).

Para a análise qualitativa das amostras o *heatmap* agrupou 72 proteínas (figura 20) com base em seu padrão de expressão, produzindo um mapa de calor, onde as proteínas mais abundantes foram identificadas em vermelho e as proteínas menos abundantes foram caracterizadas em verde, de acordo com as amostras analisadas (DECHc vs. Saudáveis).

Assim, foi possível visualizar uma diferença nos níveis de expressão das proteínas dos dois grupos estudados. Com a análise feita através do *heatmap*, comparando o perfil das amostras de pacientes com DECHc, com o perfil do grupo de proteínas dos indivíduos saudáveis, foi possível identificar uma diferença no nível de abundância das proteínas. Desta forma ressaltamos 16 proteínas: *Ig gamma-1 chain C region*; *Isoform H14 of Myeloperoxidase*; *Isoform 2 of 14-3-3 protein Sigma*; *Fibrinogen beta chain*; *Alpha-1-acidic glycoprotein 1*; *Isoform gamma-A of Fibrinogen gamma chain*; *Hemopexin*; *Keratin type I CK 14*; *Alpha-2-Macroglobulin*; *Thioredoxin*; *Complement C3*; *Vitamin D*; *Keratin type I CK16*; *Lactoperoxidase*; *Cystatin B* e *Neutrophil elastase*

FONTE: a autora

Figura 20 - *Heatmap* representando a comparação entre as proteínas com DECHc e indivíduos saudáveis. Abundância das proteínas representadas graficamente através de um mapa de calor (*Heatmap*), onde o nível de proteínas é demonstrada por meio de uma escala de cores: cor verde mostra baixa expressão e o vermelho alta expressão - etapa 1 (*Gene ontology*)

4.3.3 Identificação do proteoma salivar - etapa 2

Foram detectadas 301 proteínas, por espectrometria de massa nas amostras de saliva de pacientes submetidos ao TCTH, nos diversos tempos (anexo 6). Destas proteínas 19 foram identificadas em comum nos cinco tempos de coleta (figura 21 e tabela 8).

FONTE: a autora

Figura 21 - Diagrama de Venn das proteínas identificadas nas amostras dos pacientes submetidos ao TCTH. Diagrama das proteínas expressas em comum nos diversos tempo de coleta dos pacientes submetidos ao TCTH

Tabela 8 - Lista das proteínas em comum nos diversos tempos de coleta dos pacientes submetidos ao TCTH

Proteínas em comum em todos os períodos de coleta - etapa 2		
	Proteínas identificadas	Nº de acesso
1	UPF0762 protein C6orf58	Q6P5S2
2	Prolactin-inducible protein	P12273
3	Ig alpha-1 chain C region	P01876
4	Cystatin-C	P01034
5	Lysozyme C	P61626
6	BPI fold-containing family B member 2	Q8N4F0

continua

Tabela 8 - Lista das proteínas em comum nos diversos tempos de coleta dos pacientes submetidos ao TCTH

Proteínas em comum em todos os períodos de coleta - etapa 2		
	Proteínas identificadas	N° de acesso
7	Mucin-5B	Q9HC84
8	Isoform 7 of Deleted in malignant brain tumors 1 protein	Q9UGM3-7
9	Cystatin-SN	P01037
10	Cystatin-S	P01036
11	Polymeric immunoglobulin receptor	P01833
12	Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311
13	Cystatin-B	P04080
14	Lactoferrin	Q19KS2
15	Isoform 4 of Interleukin-1 receptor antagonist protein	P18510-4
16	Alpha-amylase 1	P04745
17	cDNA FLJ53859, highly similar to Kallikrein-1	B7Z1F7
18	Isoform 2 of Lactoperoxidase	P22079-2

O perfil proteico dos pacientes nesta etapa foi classificado por meio do programa *Gene Ontology*. As funções moleculares das proteínas destas amostras foram categorizadas e as classes mais abundantes foram as proteínas de ligação celular (58,7%) e envolvidas na atividade catalítica (28,6%) (figura 22).

FONTE: a autora

Figura 22 - Função molecular das proteínas identificadas nas amostras dos pacientes submetidos ao TCTH. Abundância das proteínas salivares de acordo com a função molecular - etapa 2 (*Gene ontology*)

As proteínas foram também classificadas quanto ao processo biológico na qual participam, resultando em uma lista de doze diferentes categorias, ilustradas na figura 23; dentre elas houve um maior número de proteínas envolvidas no processo celular (23,8%) e no processo metabólico (25,4%).

FONTE: a autora

Figura 23 - Processo biológico das proteínas identificadas nas amostras dos pacientes submetidos ao TCTH. Abundância das proteínas salivares de acordo com seu processo biológico - etapa 2 (*Gene ontology*)

As vias de sinalização foram classificadas em 18 categorias, demonstrando um maior número de proteínas envolvidas na via da glicólise com 10,5%, todas as outras dezessete vias representaram 5,3% cada (figura 24).

FONTE: a autora

Figura 24 - Vias de sinalização das proteínas identificadas nas amostras de pacientes submetidos ao TCTH. Via de sinalização que as proteínas estão envolvidas - etapa 2 (*Gene ontology*)

Nas amostras de Líquen Plano oral, foram identificadas 108 proteínas (anexo 7). De acordo com o programa *Gene Ontology*, as classes mais abundantes foram proteínas moduladoras de enzima com 22,2% e proteínas de transferência com 14,3%. As maiores porcentagens das proteínas foram descritas com envolvimento no processo celular (22,1%) e metabólico (32,6%).

FONTE: a autora

Figura 25 - Classes das proteínas identificadas nas amostras de pacientes com Líquen Plano oral (LPO). Categorização das classes de proteínas das amostras dos pacientes com LPO - etapa 2 (*Gene ontology*)

4.3.4 Correlação dos dados da etapa 1 e etapa 2

Das dezesseis (16) proteínas mais abundantes identificadas nos pacientes com DECHc (etapa 1), 17,6% representaram moléculas de sinalização, as proteínas moduladoras de enzima representaram também 17,6%, já as proteínas de defesa e imunidade representaram um número menor de moléculas: 11,8% (figura 26). Destas somente sete (7) foram comparadas com as amostras nos diversos tempos de acompanhamento dos pacientes submetidos ao TCTH, são elas: *Isoform h14 of myeloperoxidase*, *Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma*, *Isoform gamma-A of Fibrinogen gamma chain*, *Hemopexin*, *Keratin type I CK14*, *Alpha-2-macroglobulin* e *Complemente C3*. Estes dados estão detalhados na tabela 9.

FONTE: a autora

Figura 26 - Classes das 16 proteínas mais abundantes identificadas nos pacientes com DECHc.

Categorização das classes de proteínas identificadas nas amostras de pacientes com DECHc que demonstraram uma maior abundância em relação ao controle saudável (*Gene ontology*)

Tabela 9 - Proteínas identificadas com uma maior abundância nas amostras dos pacientes com DECHc comparadas com as amostras de pacientes submetidos ao TCTH nos diferentes momentos pós TCTH

Proteínas diferencialmente expressas na saliva de pacientes com DECHc						
Nº de acesso	Descrição	Pré-Óbito	Pré-Vivo	D+30	D+100	D+200
P05164-2	Isoform H14 of Myeloperoxidase					
P31947	Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma					
P02679-2	Isoform gamma-A of Fibrinogen gamma chain					
P02790	Hemopexin					
P02533	Keratin type I cytoskeletal 14					
P01023 / A8K2U0	Alpha-2-Macroglobulin					
P01024	Complement C3					

Lista das proteínas mais abundantes nos pacientes com DECHc. A cor verde sinaliza que a proteína foi identificada em um determinado tempo de acompanhamento dos pacientes submetidos ao TCTH (pré-vivo, pré-óbito, D+30, D+100 e D+200)

5 DISCUSSÃO

O estudo apresentado mostra a avaliação proteômica da saliva de pacientes diagnosticados com DECHc, comparados com amostras coletadas de pacientes antes e após TCTH (os períodos de coleta das amostras foram escolhidos de acordo com as manifestações clínicas mais importantes para a DECH). Como controles do estudo, devidas as características morfológicas similares (clínicas e histopatológicas), pacientes com líquen plano oral foram incluídos, além de pacientes livres de qualquer doença (considerados normais). Nessa avaliação, o dado mais relevante e animador foi a identificação de proteínas específicas para DECH crônica, o que permite uma melhor classificação dessa condição para a futura implementação de terapias mais específicas.

A DECH permanece como um dos maiores efeitos colaterais do TCTH, tendo grande impacto na qualidade de vida dos pacientes; seu tratamento, prognóstico e diagnóstico dependem da presença de sinais e sintomas clínicos, e, por este motivo, para uma melhor compreensão da doença, a identificação de biomarcadores precoces têm sido amplamente pesquisada, permitindo assim um melhor entendimento dos diversos estágios da doença e de seus processos para intervenções terapêuticas mais precisas (74,75).

Recentemente, a saliva tem sido considerada como um fluido passível de utilização para fins de diagnose para diversas doenças. Isso deve-se a facilidade da coleta (técnica não-invasiva), tornando-se uma alternativa a outros fluidos utilizados para esse propósito, como o sangue. Em nosso estudo, comparamos a média de secreção do fluido salivar de pacientes com DECHc, de pacientes submetidos ao TCTH e de pacientes com LPO; os pacientes com DECHc mostraram secreção média de 0,246 ml/min, fluxo salivar abaixo do encontrado nos diversos tempos de coleta dos pacientes submetidos ao TCTH e dos pacientes de LPO. Os trabalhos de Nagler et al, (2001) e Norhagen et al, (1994), relatam uma redução na taxa salivar de 55-90% nos pacientes com DECH, o que corrobora nossos achados, mostrando o comprometimento das glândulas salivares na doença. Eles atribuem a redução da taxa salivar à ingestão de medicamentos e ao acometimento das glândulas salivares (27,76,77), já que a xerostomia pode ser decorrente de causas múltiplas.

Diversos estudos relatam a utilização da expressão das proteínas na saliva, por

meio de técnicas como a espectrometria de massa para a detecção ou monitoramento de doenças como o câncer oral (63), síndrome de Sjögren (49), artrite reumatoide (78), entre outros. Nessa discussão abordaremos os aspectos específicos da análise proteômica nos pacientes estudados. As características clínicas e histopatológicas dos pacientes fogem do foco desse estudo, então não serão aqui discutidas.

O presente estudo foi observacional, longitudinal, prospectivo e utilizou a técnica de espectrometria de massas Q-Exactive Orbitrap e LC-MS em um sistema EASY-nLC II ligado a um instrumento LTQ-Orbitrap Velos para a avaliação do perfil proteômico das amostras de saliva nos pacientes diagnosticados com DECHc e nos pacientes submetidos ao TCTH durante diferentes períodos de coleta.

Poucos são os estudos que avaliam as proteínas na saliva de pacientes com DECH. Bassim *et al*, (2012), descreveram 180 proteínas na saliva total de pacientes com DECH oral, utilizando a técnica LC-MS/MS. Devic *et. al*, (2014), em condições semelhantes, utilizaram um analisador com tempo de voo (TOF/TOF-*time of flight*) identificando 249 proteínas.

Em um outro estudo, Chiusolo relatou a expressão de determinadas proteínas da família S100 em pacientes com DECH por meio da técnica HPLC-ESI-MS (74,79–81). Souza *et al*, (2017), demonstraram a relevância de duas proteínas expressas em pacientes com DECHc, como possíveis marcadores de doença - a *Mucin 16* e *Colony-stimulating factor 2-receptor beta*, por meio da técnica LC/MS-ESI-IT-TOF. Esse achado ainda precisa ser validado para utilização na rotina diagnóstica.

Utilizando o programa Gene Ontology, identificamos em nosso estudo, 150 proteínas expressas somente nos pacientes com DECHc. Essas proteínas foram classificadas de acordo com suas funções moleculares e processos biológicos; com uma predominância de moléculas de sinalização, hidrolise e enzimas moduladoras dos mecanismos inflamatórios.

Por meio da classificação realizada, relatamos que 33,3% das classes de proteínas eram citocinas. Como moléculas de sinalização as citocinas são descritas como biomarcadores importantes em diversas doenças e, principalmente em processos inflamatórios. Chen

et al, (2012), descreveram as citocinas como potenciais biomarcadores para a DECHa. Presland, (2016) relatou em seu estudo os mecanismos das citocinas envolvidas na inflamação tecidual dos tecidos alvos, como a pele e a cavidade oral na DECH (20,60,82).

Referente ao processo biológico do proteoma dos pacientes com DECHc, 19,9% das proteínas estão envolvidas em processos metabólicos. Uma dessas proteínas identificadas, a *Lactoperoxidase* é uma enzima que participa da via de metabolismo da fenilalanina; é também uma molécula antimicrobiana natural encontrada na saliva de mamíferos, em altas concentrações esta associada à eliminação de bactérias. Em baixos níveis pode estar relacionada à redução da imunidade oral em pacientes com DECH, deixando os pacientes mais vulneráveis a bactérias e infecções orais (20,80). Em nossos estudos esta proteína foi identificada em pacientes com DECHc, e nos cinco períodos de coleta de saliva.

No estudo de Bassim *et al*, (2012), foram coletadas amostras de saliva não estimulada de 5 pacientes com DECH na cavidade oral; essas amostras foram comparadas com salivas de pacientes com DECH sem manifestações orais. Doze proteínas foram identificadas somente nas amostras de pacientes com DECH na cavidade oral através da técnica LC-MS/MS, porém somente duas proteínas foram descritas no estudo: *Lactotransferrin* e *Lactoperoxidase*. Estes resultados corroboram o presente estudo que revela a *Lactoperoxidase* como uma das proteínas associadas à doença por nós estudada (80).

Proteínas envolvidas no processo de imunidade celular tiveram uma representação de 13,3% no total de proteínas identificadas nas amostras de DECH. Identificamos a expressão da proteína *Polymeric Immunoglobulin receptor* em pacientes com DECHc, nos pacientes de LPO e nos 5 períodos de coleta (pré-vivo, pré-óbito, D+30, D+100 e D+200) (43,63,74). Esta proteína é responsável pelo reconhecimento de imunoglobulinas como IgA e IgM, conforme descrito por Devic *et al*, (2014), que ainda relataram uma maior expressão desta proteína em pacientes com DECHc na cavidade oral.

Ainda sobre a classificação das proteínas de vias de sinalização, a via de coagulação sanguínea demonstrou uma maior representação, com 11,3%. Dessas, destaca-se a *Annexin I*, que é descrita em associação a vários processos biológicos. Em nossos achados, *Annexin*

I foi identificada em quatro diferentes períodos: pré-vivo, D+30, D+100 e D+200 e em pacientes com DECHc. *Annexin I* pertence a uma família de proteínas dependentes de Ca^{2+} , que são responsáveis por processos moleculares e celulares, como coagulação sanguínea, diferenciação, inflamação e crescimento tecidual (83). No processo inflamatório, a *Annexin I* tem efeitos autócrino e parácrino, sendo responsável pela limitação do recrutamento de neutrófilos e pela produção de mediadores pro inflamatórios. A proteína age por meio da indução da apoptose em neutrófilos, o que, por sua vez, modula o recrutamento de monócitos e induz a migração de macrófagos, preparando o tecido para os momentos de reparação; em modelos animais, a ação dessa proteína foi ainda associada com efeitos análogos e sinérgicos aos dos glicocorticoides (84,85). A *Annexin I* tem também um papel na modulação da nocicepção e dor inflamatória, sendo uma molécula com potencial efeito analgésico. Essa função pode ser exercida por meio do controle da migração neutrofílica, por meio da inibição de citocinas envolvidas na neurotransmissão dos estímulos da dor e por modulação da excitabilidade das fibras nervosas, entre outros (86). Assim, avaliamos que a *Annexin I* tem um envolvimento importante na evolução da doença, e que, futuramente, possa ser utilizada para o monitoramento dos parâmetros inflamatórios dos pacientes.

As vias de sinalização responsáveis pela ativação de linfócitos T e B, representaram em nosso estudo, 6,5% das proteínas. A proteína *Cathepsin G* (CatG), é uma serina protease secretada durante a inflamação com o intuito de promover resposta imune; é encontrada na superfície de células imunes como, linfócitos T e B e nas células *natural killer* (NK) (87). Em nossos resultados, esta proteína foi identificada somente em pacientes com DECHc. Penczek *et al*, (2016), relataram em seu estudo a proteína CatG como um marcador para distinguir diferentes subtipos de células NK (88).

As proteínas estudadas na etapa 1 foram analisadas quantitativamente por meio do programa *heatmap* que agrupou, com base no padrão de expressão, 72 proteínas. Deste total de proteínas ressaltamos 16 proteínas mais abundantes no grupo de pacientes com DECHc que comparamos com as proteínas do grupo de indivíduos saudáveis: *Ig gamma-1 chain C region*; *Isoform H14 of myeloperoxidase*; *Isoform 2 of 14-3-3 protein Sigma*; *Fibrinogen beta chain*; *Alpha-1-acidic glycoprotein 1*; *Isoform gamma-A of Fibrinogen gamma chain*; *Hemopexin*; *Keratin type I cytoskeletal 14*; *Alpha-2-macroglobulin*; *Thioredoxin*; *Complement C3*;

Vitamin D; Keratin type I cytoskeletal 16; Lactoperoxidase; Cystatin B; Neutrophil elastase.

As proteínas descritas acima foram também classificadas de acordo com suas funções (*Gene Ontology*). Tivemos uma maior representação de moléculas de sinalização (17,6%) que demonstram o envolvimento das citocinas, que refletem a inflamação sistêmica presente na DECH; No estudo de Jung *et al*, (2015), utilizando técnica de imunoenensaio em amostras de lágrimas de pacientes diagnosticados com a DECHc, os pesquisadores relataram as citocinas como possíveis marcadores da doença (89). Outro resultado relevante, em nosso estudo, foram as proteínas envolvidas nos processos de defesa e imunidade do organismo, que representaram 11,8% do total. Estudos descreveram a expressão de proteínas na saliva com múltiplas funções, entre elas a imunorregulação e a defesa inata do hospedeiro, onde qualquer mudança no perfil destas proteínas poderiam representar alterações nas respostas clínicas locais e sistêmicas após o TCTH e ao aumento das condições inflamatórias na DECH (79,90).

Com o objetivo de verificar a presença de um biomarcador, descrevemos a relevância na diferença da expressão entre DECHc e saudáveis, de 7 proteínas dentre as 16 acima descritas. As proteínas: *Isoform H14 of Myeloperoxidase*, *Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma*, *Isoform gamma-A of Fibrinogen gamma chain*, *Hemopexin*, *Keratin type I cytoskeletal 14*, *Alpha-2-macroglobulin* e *Complement C3* demonstraram, por meio do *Heatmap*, uma diferença expressiva entre os grupos comparados. A discussão acerca dessas 7 proteínas consideradas importantes com bases nos nossos resultados será travada de acordo com a função das mesmas e nos tempos de coleta de saliva dos pacientes incluídos na pesquisa (figura 27).

FONTE: a autora

Figura 27 - Linha do tempo com a descrição das 7 proteínas identificadas com a maior abundância nos pacientes com DECHc. Descrição das proteínas mais abundantes nas amostras dos pacientes diagnosticados com DECHc em comparação aos tempos de coleta dos pacientes submetidos ao TCTH

A *Isoform H14 of Myeloperoxidase* é uma isoforma da proteína enzimática *Myeloperoxidase*; é descrita na literatura como uma enzima microbicida importante no processo da defesa humana contra microrganismos. Além disso, é também descrita como uma proteína com propriedades pro inflamatórias, envolvida na ativação excessiva de leucócitos (91–93). Nunes *et al*, (2015), relataram o aumento de expressão da *Myeloperoxidase* em doenças inflamatórias (46); por outro lado Devic *et al*, (2014) relacionaram a diminuição da expressão de uma outra isoforma da *Myeloperoxidase* (*Isoform H7 of myeloperoxidase*) em pacientes com DECHc na cavidade oral (74). A diferença na expressão encontrada no presente estudo (maior expressão) e no estudo mencionado anteriormente (menor expressão) deve-se, possivelmente, a diferente isoforma da proteína *Myeloperoxidase* identificada. A proteína *Isoform H14 of Myeloperoxidase*, foi encontrada nos tempos D+30 e D+100 na nossa pesquisa. O período de 30 dias após o transplante (D+30) em geral é um período de neutropenia, momento de maior vulnerabilidade do paciente a infecções e inflamações, havendo, portanto, a presença de proteínas pro inflamatórias, como a *Myeloperoxidase*. Já no período de 100 dias após o TCTH (D+100), parte do impacto no indivíduo deve-se ao início clínico da DECHc, com um processo inflamatório crônico, bem estabelecido.

Outra proteína identificada com uma maior expressão nos pacientes com DECHc foi a *Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma*, conhecida como uma proteína marcadora de células epiteliais, expressa principalmente na epiderme queratinizada. Foi descrita por Wu *et al*, (2009), em saliva de pacientes com periodontite com uma expressão menor comparada ao controle utilizado (indivíduos saudáveis) (43,94). Esse fato revela, assim como nos processos inflamatórios crônicos de baixa amplitude relatados por outros investigadores, que a inflamação crônica oferece outros tipos de limitações dos pacientes que se concentram nos efeitos pós inflamatórios e cicatriciais da DECHc.

A *Isoform gamma-A of Fibrinogen gamma chain*, tem uma função importante na hemostasia (coágulo sanguíneo) além de orientar a migração celular durante a re-epitelização nos estágios iniciais da reparação (95). O estudo de Devic *et al* (2014), relatou uma menor expressão desta proteína em pacientes com DECH na cavidade oral, porém como citado anteriormente, esta diferença na expressão encontrada em nosso estudo, deve-se possivelmente a isoforma da proteína identificada.

A *Hemopexin* e a *Alpha-2-macroglobulin* são glicoproteínas envolvidas na regulação de citocinas IL-6 (96,97). A citocina IL-6 tem um papel importante na etiologia e indução relevante na primeira fase da DECH, na qual ocorre um processo inflamatório desencadeado por meio do condicionamento escolhido. Essas proteínas identificadas em maior abundância nos pacientes com DECHc incluídos em nosso estudo, mostram que o protagonismo do processo inflamatório na doença com a presença de proteínas, podem ativar cascatas de citocinas de forma alternativa. Esse achado pode ter potencial no desenvolvimento de exames para identificação de marcadores da evolução da doença, bem como na utilização de novas estratégias terapêuticas. A proteína *Alpha-2-macroglobulin*, foi identificada em todos os tempos pós-TCTH (D+30, D+100 e D+200), mostrando que os mediadores químicos como as citocinas estão presentes em todo processo biológico da DECH.

A fração C3 do complemento, foi detectada em abundância nos tempos de coleta de saliva pós transplante e nos pacientes com DECHc. Wang *et al*, (2005), descreveram que foi detectado a deposição da fração C3 do complemento no revestimento epitelial e na derme, nos vasos sanguíneos e nas glândulas sudoríparas danificadas, concluindo que a fração C3 do complemento está envolvida no processo imunológico Th1/Th17, levando à ativação de linfócitos T na DECH, particularmente no sistema tegumentar destes pacientes (98).

Um dos achados mais interessantes desse estudo foi a identificação de diversos tipo de de citoqueratinas na saliva de pacientes com DECH.

A *Keratin type I CK14*, em nosso estudo foi identificada nas amostras de pacientes com DECHc. Devic *et al*, (2014), relataram, assim como no presente estudo, uma maior expressão de queratinas na saliva de pacientes com DECHc na cavidade oral, o que possivelmente pode representar um marcador bioquímico de lesão tecidual da mucosa e morte celular (74).

A *Keratin type I CK13* é uma proteína de filamento intermediário, imunolocalizada nas camadas intermediárias do epitélio da mucosa oral. Em nosso estudo foi identificada na amostra dos pacientes que foram a óbito (pré-óbito).

A proteína *Keratin type II CK10*, também identificada em nossos resultados foi expressa no período D+100.

A *Keratin type II cytoskeletal 1 CK1*, não foram identificadas em nenhum dos cinco períodos avaliados nos pacientes submetidos ao TCTH, porém foi identificada nas amostras de pacientes com DECHc. O estudo de Guo *et al*, (2017), descreveu esta proteína como um novo alvo antigênico expresso em células endoteliais, por meio do soro de receptores de transplante renal que eram acometidos por rejeição mediada por anticorpos (99). Rivarola *et al*, (2014) (100) , descreveram, por meio de imunoistoquímica em pacientes com LPO, que a CK1 era presente em 64% dos espécimes estudados; como esta proteína foi identificada nos pacientes com DECHc, possivelmente pode ser considerada como um marcador para lesões inflamatórias como as lesões liquenóides que acometem os pacientes com DECHc.

Outra queratina encontrada em nossos estudos foi a *Keratin type II CK6A*, identificada nos períodos pré-TCTH, nos períodos D+30 e D+100 pós TCTH. Song *et al*, (2012), relataram em pacientes com DECHc um aumento na expressão de PTEN, que consequentemente a este aumento de expressão, sofrem um processo inflamatório menor (101); portanto sugerimos que a identificação da proteína CK6A pode prever o prognóstico da DECHc, por estar envolvida no processo da expressão de células inflamatórias.

A *Keratin 5* (CK5) é uma proteína citoesquelética dos queratinócitos basais e pluripotentes da pele e mucosas. A CK5 foi identificada em dois períodos inflamatórios importantes para o desenvolvimento da DECH: D+30, devida a toxicidade do condicionamento e da profilaxia e no D+200, momento em que a DECHc é clinicamente diagnosticada. Lourenco *et al*, (2006), relataram a anormalidade da expressão da proteína *Keratin 5*, como resposta ao dano causado à camada basal em pacientes com lesões liquenóides e em pacientes com Lúpus Eritematoso discoide de pele e lesões na cavidade oral (102). Nas lesões orais da DECH, intenso comprometimento epitelial é observado e agora revelado bioquimicamente por meio da presença dessa citoqueratina.

Resumindo os nossos achados, verificamos que nos controles de doença,

representados pelo LPO, apenas 1 proteína em comum com a DECHc foi identificada, a *Isoform-gamma-A of Fibrinogen gamma chain*. Assim, podemos investir na afirmação de que as proteínas *Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma*, *Hemopexin* e *CK14* são exclusivas da DECHc e podem representar potenciais marcadores para a compreensão dos mecanismos da doença, diagnóstico e terapêutica.

Mediante estas afirmações, estudos futuros são necessários, com inclusão de novas amostras e a validação destas, através de técnicas que utilizam anticorpos como Elisa e *Western Blot*.

6 CONCLUSÃO

A. O perfil proteômico da saliva nos pacientes estudados revelou a presença de 307 proteínas no total; 41 proteínas somente na saliva de pacientes saudáveis e 150 somente na saliva de pacientes com DECHc (sendo 72 consideradas relevantes de acordo com a análise *Heatmap*), 116 proteínas em comum entre os dois grupos citados. Na saliva de pacientes com LPO, o perfil proteômico revelou 108 proteínas.

B. O proteoma da saliva dos pacientes estudados revelou 3 proteínas que foram detectadas apenas na DECHc – *Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma*, *Hemopexin*, *Keratin I CK1*. Essas proteínas foram consideradas como biomarcadores potenciais da doença.

ANEXOS

Anexo A - Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa - CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: O ENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES NA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO: ESTUDO BIOQUÍMICO E ANÁLISE PROTEÔMICA

Pesquisador Responsável: Silvia Vanessa Lourenço

Versão: 2

Pesquisador Executante: Milena Monteiro de Souza

CAAE: 03155912.1.0000.0068

Co-autores: Fabio Coracin Sonia A. Andrade

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9317

Número do Parecer: 150.026

Data da Relatoria: 21/11/2012

Apresentação do Projeto: análise prospectiva da proteômica da saliva de indivíduos submetidos a transplante de medula óssea e sua possível relação com o desenvolvimento de doença do enxerto contra o hospedeiro

Objetivo da Pesquisa: O objetivo primário é a análise de alteração da saliva em pacientes submetidos a transplante de medula óssea.

O pesquisador encaminha carta em que declara ter desistido do objetivo secundário que consistia na análise retrospectiva das biópsias das glândulas salivares que tinha gerado dúvida e questionamento por parte do relator.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos são pequenos e o benefício poderá ser melhor entendimento da relação da reação enxerto contra hospedeiro e o desenvolvimento de doença em glândula salivar

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo agregará informação relevante à literatura

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Houve adequação solicitada do TCLE e não há mais inclusão da biópsia das glândulas salivares

Recomendações: Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendência ética

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado

São Paulo, 22 de Novembro de 2012

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar

CEP 05403-010, São Paulo, SP, tel.

Anexo B - Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 - Conselho Nacional de Saúde)

Eu, _____, RG _____ e CPF _____ fui convidado a participar da pesquisa "O envolvimento das glândulas salivares na doença do enxerto contra o hospedeiro", sob a responsabilidade da Profa Dra Silvia Vanessa Lourenço e da doutoranda Milena Monteiro de Souza e, afirmo que todas as implicações abaixo relacionadas me foram devidamente esclarecidas, inclusive verbalmente, através de questões levantadas junto aos pesquisadores, não restando qualquer dúvida que possa sugerir que tal consentimento não tenha sido feito de livre e espontânea vontade. Estou ainda ciente que:

- 1) O objetivo dessa pesquisa é estudar a saliva dos pacientes com indicação de transplante alogênico de medula óssea.
- 2) Serei submetido a um exame clínico para obtenção dos dados clínicos e a coleta de saliva.
- 3) Os procedimentos que poderão causar desconforto são os exames clínicos e a coleta de saliva.
- 4) É garantido a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
- 5) Todos os dados coletados serão mantidos em sigilo garantindo a minha privacidade.

São Paulo, _____ de _____ de 20 _____

Paciente ou responsável

Profa Dra Silvia Vanessa Lourenço

Dra Milena Monteiro de Souza

Anexo C - Proteínas identificadas na Etapa 1

	<i>Proteínas Identificadas</i>	<i>Número de acesso</i>
1	Alpha-amylase 1	P04745 AMY1_HUMAN
2	Pancreatic alpha-amylase	P04746 AMYP_HUMAN
3	Serum albumin	P02768 ALBU_HUMAN
4	Keratin type I cyt	P13646 K1C13_HUMAN
5	Keratin type II cyt	P02538 K2C6A_HUMAN
6	Keratin type II cyt	P04259 K2C6B_HUMAN
7	Isoform DeltaLf of Lactotransferrin	P02788-2 TRFL_HUMAN
8	Mucin-5B	Q9HC84 MUC5B_HUMAN
9	Cystatin-SN	P01037 CYTN_HUMAN
10	Ig alpha-1 chain C region	P01876 IGHA1_HUMAN
11	Cystatin-S	P01036 CYTS_HUMAN
12	Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311 ZA2G_HUMAN
13	Polymeric immunoglobulin receptor	P01833 PIGR_HUMAN
14	Keratin type I cyt	P08779 K1C16_HUMAN
15	Keratin type I cyt	P02533 K1C14_HUMAN
16	Keratin type II cyt	P19013 K2C4_HUMAN
17	Ig gamma-1 chain C region	P01857 IGHG1_HUMAN
18	Ig kappa chain C region	P01834 IGKC_HUMAN
19	Keratin type II cyt	P13647 K2C5_HUMAN
20	Ig mu chain C region	tr A0A087WYJ9 A0A087WYJ9_HUMAN
21	Ig alpha-2 chain C region (Fragment)	tr A0A075B6N7 A0A075B6N7_HUMAN
22	Actin cytoplasmic 1	P60709 ACTB_HUMAN
23	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	A8K2U0 A2ML1_HUMAN
24	Complement C3	P01024 CO3_HUMAN
25	Annexin A1	P04083 ANXA1_HUMAN
26	Ig gamma-2 chain C region	P01859 IGHG2_HUMAN
27	Ig lambda-2 chain C regions (Fragment)	tr A0A075B6K9 A0A075B6K9_HUMAN
28	Isoform 2 of Carbonic anhydrase 6	P23280-2 CAH6_HUMAN
29	Keratin type I cyt	P13645 K1C10_HUMAN
30	Isoform 4 of Deleted in malignant brain tumors 1 protein	Q9UGM3-4 DMBT1_HUMAN
31	Lactoperoxidase	P22079 PERL_HUMAN
32	Ig gamma-3 chain C region	P01860 IGHG3_HUMAN
33	Lipocalin-1	P31025 LCN1_HUMAN
34	Prolactin-inducible protein	P12273 PIP_HUMAN
35	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	B9A064 IGLL5_HUMAN
36	Isoform H14 of Myeloperoxidase	P05164-2 PERM_HUMAN
37	Keratin type II cyt	P04264 K2C1_HUMAN
38	Alpha-2-macroglobulin	P01023 A2MG_HUMAN
39	Protein S100-A9	P06702 S10A9_HUMAN
40	Cystatin-B	P04080 CYTB_HUMAN
41	Keratin type II cyt	P12035 K2C3_HUMAN

Anexo C - Proteínas identificadas na Etapa 1

42	Serotransferrin	P02787 TRFE_HUMAN
43	Haptoglobin	P00738 HPT_HUMAN
44	Gelsolin	P06396 GELS_HUMAN
45	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	Q08188 TGM3_HUMAN
46	Galectin-3-binding protein	Q08380 LG3BP_HUMAN
47	Ig mu heavy chain disease protein	P04220 MUCB_HUMAN
48	Keratin type II cyt	P35908 K22E_HUMAN
49	Cystatin-SA	P09228 CYTT_HUMAN
50	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	P02814 SMR3B_HUMAN
51	Ig gamma-4 chain C region	P01861 IGHG4_HUMAN
52	Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma	P31947-2 1433S_HUMAN
53	Lysozyme C	P61626 LYSC_HUMAN
54	Protein LEG1 homolog	Q6P552 LEG1H_HUMAN
55	Protein disulfide-isomerase	P07237 PDIA1_HUMAN
56	Keratin type I cyt	P35527 K1C9_HUMAN
57	Isoform 2 of Transketolase	P29401-2 TKT_HUMAN
58	Beta-2-microglobulin	P61769 B2MG_HUMAN
59	Alpha-enolase	P06733 ENOA_HUMAN
60	Zymogen granule protein 16 homolog B	Q96DA0 ZG16B_HUMAN
61	BPI fold-containing family B member 2	Q8N4F0 BPIB2_HUMAN
62	78 kDa gluc	P11021 GRP78_HUMAN
63	BPI fold-containing family B member 1	Q8TDL5 BPIB1_HUMAN
64	Keratin type II cyt	Q01546 K22O_HUMAN
65	Isoform 2 of Kallikrein-1	P06870-2 KLK1_HUMAN
66	Desmoplakin	P15924 DESP_HUMAN
67	Fibrinogen beta chain	P02675 FIBB_HUMAN
68	Cystatin-C	P01034 CYTC_HUMAN
69	Histatin-1	P15515 HIS1_HUMAN
70	Thioredoxin	P10599 THIO_HUMAN
71	Complement C4-A	P0C0L4 CO4A_HUMAN
72	Heat shock-related 70 kDa protein 2	P54652 HSP72_HUMAN
73	Cysteine-rich secretory protein 3	P54108 CRIS3_HUMAN
74	Immunoglobulin J chain (Fragment)	tr D6RD17 D6RD17_HUMAN
75	Protein IGHV3-74 (Fragment)	tr A0A0B4J1X5 A0A0B4J1X5_HUMAN
76	Transcobalamin-1	P20061 TCO1_HUMAN
77	Protein S100-A7	P31151 S10A7_HUMAN
78	Isoform 2 of Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	P80188-2 NGAL_HUMAN
79	Peroxiredoxin-1 (Fragment)	tr A0A0A0MSI0 A0A0A0MSI0_HUMAN
80	Cornulin	Q9UBG3 CRNN_HUMAN
81	Uncharacterized protein (Fragment)	tr A0A0J9YY99 A0A0J9YY99_HUMAN
82	Heat shock protein beta-1	P04792 HSPB1_HUMAN
83	Serpin B3	P29508 SPB3_HUMAN

Anexo C - Proteínas identificadas na Etapa 1

84	Alpha-1-acid glycoprotein 1	P02763 A1AG1_HUMAN
85	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937 PPIA_HUMAN
86	14-3-3 protein zeta/delta	P63104 1433Z_HUMAN
87	Protein S100-A8	P05109 S10A8_HUMAN
88	Mucin-7	Q8TAX7 MUC7_HUMAN
89	Desmocollin-2	Q02487 DSC2_HUMAN
90	My	P35579 MYH9_HUMAN
91	Immunoglobulin heavy variable 3-15	A0A0B4J1V0 HV315_HUMAN
92	Ubiquitin-40S rib	tr J3QTR3 J3QTR3_HUMAN
93	Desmoglein-3	P32926 DSG3_HUMAN
94	Cathepsin G	P08311 CATG_HUMAN
95	Glutathione S-transferase P	P09211 GSTP1_HUMAN
96	Immunoglobulin heavy variable 3-49	A0A0A0MS15 HV349_HUMAN
97	Isoform 4 of Interleukin-1 receptor antagonist protein	P18510-4 IL1RA_HUMAN
98	Keratin type I cyt	tr K7EQH6 K7EQH6_HUMAN
99	Immunoglobulin kappa variable 3-20	P01619 KV320_HUMAN
100	Isoform 2 of Fibrinogen alpha chain	P02671-2 FIBA_HUMAN
101	Vimentin	tr B0YJC4 B0YJC4_HUMAN
102	Protein IGKV3-7 (Fragment)	tr A0A075B6H7 A0A075B6H7_HUMAN
103	Hemopexin	P02790 HEMO_HUMAN
104	Leukocyte elastase inhibitor	P30740 ILEU_HUMAN
105	Isoform 5 of Acyl-CoA-binding protein	P07108-5 ACBP_HUMAN
106	Histone H3.1	P68431 H31_HUMAN
107	Matrix metalloproteinase-9	P14780 MMP9_HUMAN
108	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	tr Q5T123 Q5T123_HUMAN
109	Protein IGKV3D-11 (Fragment)	tr A0A0A0MRZ8 A0A0A0MRZ8_HUMAN
110	Isoform 5 of Tropomy	P06753-5 TPM3_HUMAN
111	Desmoglein-1	Q02413 DSG1_HUMAN
112	Isoform 2 of Annexin A2	P07355-2 ANXA2_HUMAN
113	Immunoglobulin kappa variable 2D-40	tr A0A087X0Q4 A0A087X0Q4_HUMAN
114	Isoform 2 of Macrophage-capping protein	P40121-2 CAPG_HUMAN
115	Alpha-1B-glycoprotein	P04217 A1BG_HUMAN
116	Isoform 2 of Alpha-actinin-1	P12814-2 ACTN1_HUMAN
117	Profilin-1	P07737 PROF1_HUMAN
118	Isoform 2 of Tropomy	P67936-2 TPM4_HUMAN
119	Glyceraldehyde-3-ph	P04406 G3P_HUMAN
120	IgGfc-binding protein	tr A0A087WXI2 A0A087WXI2_HUMAN
121	Catalase	P04040 CATA_HUMAN
122	Immunoglobulin kappa variable 2-30	P06310 KV230_HUMAN
123	Epididymis secretory protein Li 109	tr V9HW75 V9HW75_HUMAN
124	Ceruloplasmin	P00450 CERU_HUMAN
125	L-lactate dehydrogenase A chain	P00338 LDHA_HUMAN
126	Vitamin D-binding protein	P02774 VTDB_HUMAN

Anexo C - Proteínas identificadas na Etapa 1

127	<i>Fatty acid-binding protein epidermal</i>	Q01469 FABP5_HUMAN
128	<i>Histone H4</i>	P62805 H4_HUMAN
129	<i>Small proline-rich protein 3 (Fragment)</i>	tr B1AN48 B1AN48_HUMAN
130	<i>Cystatin-A</i>	P01040 CYTA_HUMAN
131	<i>Coronin-1A</i>	P31146 COR1A_HUMAN
132	<i>Plastin-2</i>	P13796 PLSL_HUMAN
133	<i>Vitronectin</i>	P04004 VTNC_HUMAN
134	<i>Filamin-A</i>	tr A0A087WWY3 A0A087WWY3_HUMAN
135	<i>Ceruloplasmin (Fragment)</i>	tr H7C5R1 H7C5R1_HUMAN
136	<i>Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain</i>	P02679-2 FIBG_HUMAN
137	<i>Transmembrane protease serine 11D</i>	O60235 TM11D_HUMAN
138	<i>Calreticulin</i>	P27797 CALR_HUMAN
139	<i>Caskin-1</i>	Q8WXD9 CSK1_HUMAN
140	<i>Basic salivary proline-rich protein 2</i>	P02812 PRB2_HUMAN
141	<i>Isoform 2 of Keratin type II cyt</i>	Q8N1N4-2 K2C78_HUMAN
142	<i>BPI fold-containing family A member 2</i>	Q96DR5 BPIA2_HUMAN
143	<i>Transaldolase</i>	P37837 TALDO_HUMAN
144	<i>Kallikrein-13</i>	Q9UKR3 KLK13_HUMAN
145	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	P62258 1433E_HUMAN
146	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	P30101 PDIA3_HUMAN
147	<i>Plastin-3</i>	tr A0A0A0MSQ0 A0A0A0MSQ0_HUMAN
148	<i>Calmodulin-like protein 3</i>	P27482 CALL3_HUMAN
149	<i>Hemoglobin subunit beta (Fragment)</i>	tr F8W6P5 F8W6P5_HUMAN
150	<i>Protein S100-A6</i>	P06703 S10A6_HUMAN
151	<i>Kininogen-1</i>	P01042 KNG1_HUMAN
152	<i>Isoform C of Prelamin-A/C</i>	P02545-2 LMNA_HUMAN
153	<i>Collagen alpha-1(XII) chain</i>	Q8NFW1 COMA1_HUMAN
154	<i>Protein IGHV3-35 (Fragment)</i>	tr A0A0C4DH35 A0A0C4DH35_HUMAN
155	<i>Isoform 2 of 6-ph</i>	P52209-2 6PGD_HUMAN
156	<i>Kallikrein-10</i>	O43240 KLK10_HUMAN
157	<i>Cathepsin D</i>	tr A0A1B0GW44 A0A1B0GW44_HUMAN
158	<i>Peroxiredoxin-2</i>	P32119 PRDX2_HUMAN
159	<i>Immunoglobulin kappa variable 1-5</i>	P01602 KV105_HUMAN
160	<i>Epiplakin</i>	tr A0A087X1U6 A0A087X1U6_HUMAN
161	<i>Immunoglobulin heavy variable 4-34</i>	P06331 HV434_HUMAN
162	<i>Protein IGKV2-24 (Fragment)</i>	tr A0A0C4DH68 A0A0C4DH68_HUMAN
163	<i>Neutrophil elastase</i>	P08246 ELNE_HUMAN
164	<i>Serpin B5</i>	P36952 SPB5_HUMAN
165	<i>Serpin B4</i>	P48594 SPB4_HUMAN
166	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	P14618 KPYM_HUMAN
167	<i>Isoform 2 of Collagen alpha-1(VII) chain</i>	Q02388-2 CO7A1_HUMAN
168	<i>Isoform 1 of Collagen alpha-1(II) chain</i>	P02458-1 CO2A1_HUMAN
169	<i>Collagen alpha-2(V) chain</i>	P05997 CO5A2_HUMAN

Anexo C - Proteínas identificadas na Etapa 1

170	Annexin A3	P12429 ANXA3_HUMAN
171	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Fragment)	tr H0YGX7 H0YGX7_HUMAN
172	HCG2043238 (Fragment)	tr A0A075B6K4 A0A075B6K4_HUMAN
173	Isoform 4 of Fibronectin	P02751-4 FINC_HUMAN
174	Adenylyl cyclase-associated protein 1	Q01518 CAP1_HUMAN
175	Protein-glutamine gamma- glutamyltransferase K	P22735 TGM1_HUMAN
176	Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment)	tr H7BZJ3 H7BZJ3_HUMAN
177	Calmodulin	P62158 CALM_HUMAN
178	Alpha-1-acid glycoprotein 2	P19652 A1AG2_HUMAN
179	Putative V-set and immunoglobulin domain-containing-like protein IGHV4OR15-8 (Fragment)	tr A0A075B7B6 A0A075B7B6_HUMAN
180	Immunoglobulin kappa variable 1D-33	P01593 KVD33_HUMAN
181	Periplakin	tr K7EKI8 K7EKI8_HUMAN
182	Azurocidin	P20160 CAP7_HUMAN
183	Hemoglobin subunit alpha	P69905 HBA_HUMAN
184	My	tr B7Z6Z4 B7Z6Z4_HUMAN
185	Ezrin	tr E7EQR4 E7EQR4_HUMAN
186	Galectin-3	P17931 LEG3_HUMAN
187	Lymphocyte antigen 6D	Q14210 LY6D_HUMAN
188	Basic salivary proline-rich protein 1	tr G3V1R1 G3V1R1_HUMAN
189	Basic salivary proline-rich protein 1	tr G3V1M9 G3V1M9_HUMAN
190	Junction plakoglobin	P14923 PLAK_HUMAN
191	Kallikrein-6	Q92876 KLK6_HUMAN
192	Protein S100-A11	P31949 S10AB_HUMAN
193	Isoform 2 of Carcinoembryonic antigen- related cell adhesion molecule 5	P06731-2 CEAM5_HUMAN
194	Isoform 4 of Ph	P55058-4 PLTP_HUMAN
195	Inactive carboxypeptidase-like protein X2	Q8N436 CPXM2_HUMAN
196	Protein IGHV4-28 (Fragment)	tr A0A0C4DH34 A0A0C4DH34_HUMAN
197	Immunoglobulin lambda variable 7-43	P04211 LV743_HUMAN
198	Salivary acidic proline-rich ph	tr A0A087WYF5 A0A087WYF5_HUMAN
199	Mucin-like protein 1	tr A0A087WWF8 A0A087WWF8_HUMAN
200	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	P02750 A2GL_HUMAN
201	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	P62942 FKB1A_HUMAN
202	Dipeptidyl peptidase 4	P27487 DPP4_HUMAN
203	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	tr A0A0J9YXZ5 A0A0J9YXZ5_HUMAN
204	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A	P08637 FCG3A_HUMAN
205	Isoform 2 of Tri	P60174-1 TPIS_HUMAN
206	Isoform 2 of Sulfhydryl oxidase 1	O00391-2 QSOX1_HUMAN
207	10 kDa heat shock protein mitochondrial	P61604 CH10_HUMAN
208	Immunoglobulin lambda variable 3-21	P80748 LV321_HUMAN
209	Immunoglobulin heavy variable 1-18	A0A0C4DH31 HV118_HUMAN

Anexo C - Proteínas identificadas na Etapa 1

210	Pr	Q16651 PRSS8_HUMAN
211	Protein IGKV3D-15 (Fragment)	tr A0A087WSY6 A0A087WSY6_HUMAN
212	Proline-rich protein 4	tr A0A087WY73 A0A087WY73_HUMAN
213	ERO1-like protein alpha	Q96HE7 ERO1A_HUMAN
214	Isoform 6 of Filamin-B	O75369-6 FLNB_HUMAN
215	Malate dehydrogenase cytoplasmic	P40925 MDHC_HUMAN
216	SPARC-like protein 1	Q14515 SPRL1_HUMAN
217	Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765 FETUA_HUMAN
218	Transmembrane protease serine	tr A0A0G2JN10 A0A0G2JN10_HUMAN
219	Uncharacterized protein	tr B4E1Z4 B4E1Z4_HUMAN
220	Isoform 2 of Cyclin-dependent kinase-like 5	O76039-2 CDKL5_HUMAN
221	Olfactomedin-4	Q6UX06 OLFM4_HUMAN
222	Serine protease 27	Q9BQR3 PRS27_HUMAN
223	Immunoglobulin kappa variable 3-20	A0A0C4DH25 KVD20_HUMAN
224	Cathelicidin antimicrobial peptide	P49913 CAMP_HUMAN
225	Cathepsin L1	tr Q5T8F0 Q5T8F0_HUMAN
226	HCG1745306 isoform CRA_a	tr G3V1N2 G3V1N2_HUMAN
227	Immunoglobulin heavy variable 1-2	P23083 HV102_HUMAN
228	Retinol binding protein 4 plasma isoform CRA_b	tr Q5VY30 Q5VY30_HUMAN
229	Immunoglobulin lambda variable 1-47	P01700 LV147_HUMAN
230	Galectin-7	P47929 LEG7_HUMAN
231	Isoform 3 of Nuclear receptor corepressor 2	Q9Y618-3 NCOR2_HUMAN
232	Statherin	P02808 STAT_HUMAN
233	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B	tr A0A087WZR4 A0A087WZR4_HUMAN
234	My	P19105 ML12A_HUMAN
235	Ph	P18669 PGAM1_HUMAN
236	Calcium-activated chloride channel regulator 4	Q14CN2 CLCA4_HUMAN
237	Isoform 3 of Protein disulfide-isomerase A6	Q15084-3 PDIA6_HUMAN
238	Peptidoglycan recognition protein 1	O75594 PGRP1_HUMAN
239	Resistin	Q9HD89 RETN_HUMAN
240	Cystatin-D	P28325 CYTD_HUMAN
241	N(4)-(beta-N-acetylgluc	tr H0Y9C7 H0Y9C7_HUMAN
242	Isoform 2 of Clusterin	P10909-2 CLUS_HUMAN
243	Uncharacterized protein (Fragment)	tr A0A0J9YXX1 A0A0J9YXX1_HUMAN
244	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	tr J3KRE2 J3KRE2_HUMAN
245	Immunoglobulin lambda variable 1-51	P01701 LV151_HUMAN
246	Collagen alpha-1(I) chain	P02452 CO1A1_HUMAN
247	Elongation factor 2	P13639 EF2_HUMAN
248	Isoform long of Serine protease inhibitor Kazal-type 5	Q9NQ38-3 ISK5_HUMAN
249	Isoform 5 of Seizure 6-like protein	Q9BYH1-5 SE6L1_HUMAN
250	E3 ubiquitin-protein ligase RNF31	Q96EP0 RNF31_HUMAN

Anexo C - Proteínas identificadas na Etapa 1

251	Isoform 2 of Gluc	P06744-2 G6PI_HUMAN
252	Cofilin-1 (Fragment)	tr E9PQB7 E9PQB7_HUMAN
253	Isoform 2 of Interleukin-36 gamma	Q9NZH8-2 IL36G_HUMAN
254	Protein IGLV8-61 (Fragment)	tr A0A075B6I0 A0A075B6I0_HUMAN
255	Fruct	tr H3BPS8 H3BPS8_HUMAN
256	Isoform 2 of Ficolin-3	O75636-2 FCN3_HUMAN
257	Apolipoprotein A-I	P02647 APOA1_HUMAN
258	Elongation factor 1-alpha 1	P68104 EF1A1_HUMAN
259	Calnexin	P27824 CALX_HUMAN
260	Cadherin-1	tr A0A087WXI5 A0A087WXI5_HUMAN
261	Nuclear pore complex protein Nup214 (Fragment)	tr H0YDS4 H0YDS4_HUMAN
262	NSFL1 cofactor p47	tr F2Z2K0 F2Z2K0_HUMAN
263	Cathepsin B	P07858 CATB_HUMAN
264	Protein IGHV1OR15-1 (Fragment)	tr A0A075B7D0 A0A075B7D0_HUMAN
265	Immunoglobulin heavy variable 1-3	A0A0C4DH29 HV103_HUMAN
266	E	P12724 ECP_HUMAN
267	Non-secretory ribonuclease	P10153 RNAS2_HUMAN
268	Isoform 2 of Spectrin alpha chain non-erythrocytic 1	Q13813-2 SPTN1_HUMAN
269	Malate dehydrogenase	tr G3XALO G3XALO_HUMAN
270	Chitinase-3-like protein 2 (Fragment)	tr E9PII8 E9PII8_HUMAN
271	Serum amyloid A-1 protein	P0DJ18 SAA1_HUMAN
272	Immunoglobulin heavy variable 1-46	P01743 HV146_HUMAN
273	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2	Q6KCM7 SCMC2_HUMAN
274	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8C	Q8TDW0 LRC8C_HUMAN
275	Collagen alpha-3(IV) chain	Q01955 CO4A3_HUMAN
276	Isoform Alpha of LIM domain and actin-binding protein 1	Q9UHB6-2 LIMA1_HUMAN
277	Plasminogen	P00747 PLMN_HUMAN
278	Collagen alpha-1(VI) chain	tr A0A087X0S5 A0A087X0S5_HUMAN
279	Isoform 4 of Complement decay-accelerating factor	P08174-4 DAF_HUMAN
280	Kinesin-like protein KIF1A (Fragment)	tr F8W8V9 F8W8V9_HUMAN
281	Isoform 1B of Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1	Q9UBS5-2 GABR1_HUMAN
282	Isoform 3 of Ly-6/neurotoxin-like protein 1	Q9BZG9-3 LYNX1_HUMAN
283	Immunoglobulin lambda variable 3-19	P01714 LV319_HUMAN
284	Isoform 1 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	Q13404-1 UB2V1_HUMAN
285	Putative nucle	O60361 NDK8_HUMAN
286	60S rib	tr K7EJT5 K7EJT5_HUMAN
287	Immunoglobulin lambda variable 3-25	P01717 LV325_HUMAN
288	Isoform 3 of Calcium-independent ph	Q9NP80-3 PLPL8_HUMAN
289	Protein capicua homolog	tr A0A0A0MQR4 A0A0A0MQR4_HUMAN
290	Zinc finger protein 185	tr H7BZT5 H7BZT5_HUMAN

Anexo C - Proteínas identificadas na Etapa 1

291	<i>R3H domain-containing protein 2</i>	tr B5MCU0 B5MCU0_HUMAN
292	<i>Coact</i>	Q14019 COTL1_HUMAN
293	<i>Zinc finger protein 865</i>	P0CJ78 ZN865_HUMAN
294	<i>Tyr</i>	P29350 PTN6_HUMAN
295	<i>Collagen alpha-2(VIII) chain</i>	P25067 CO8A2_HUMAN
296	<i>Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1</i>	P15814 IGLL1_HUMAN
297	<i>Isoform 4 of Prominin-1</i>	O43490-4 PROM1_HUMAN
298	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	P26641 EF1G_HUMAN
299	<i>Complement component 1 Q subcomponent-binding protein mitochondrial (Fragment)</i>	tr I3L3Q7 I3L3Q7_HUMAN
300	<i>Purine nucle</i>	P00491 PNPH_HUMAN
301	<i>Fibromodulin</i>	Q06828 FMOD_HUMAN
302	<i>Histidine-rich glycoprotein</i>	P04196 HRG_HUMAN
303	<i>ADP-rib</i>	P61204 ARF3_HUMAN
304	<i>Isoform 2 of 40S rib</i>	P23396-2 RS3_HUMAN
305	<i>Basic salivary proline-rich protein 1</i>	tr G5E9X6 G5E9X6_HUMAN
306	<i>Myeloid-derived growth factor (Fragment)</i>	tr M0QXF7 M0QXF7_HUMAN
307	<i>Immunoglobulin lambda variable 2-23</i>	P01705 LV223_HUMAN

Anexo D - Proteínas identificadas na Etapa 2 - Pacientes submetidos ao TCTH

Proteínas identificadas na etapa 2 - Pacientes submetidos ao TCTH		
	Nº de acesso	Identificação
1	P04745	Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2 - [AMY1_HUMAN]
2	F6KPG5	Albumin (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [F6KPG5_HUMAN]
3	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2 - [ZA2G_HUMAN]
4	P01876	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 - [IGHA1_HUMAN]
5	P12273	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1 - [PIP_HUMAN]
6	P04080	Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2 - [CYTB_HUMAN]
7	A0A075B6N7	Ig alpha-2 chain C region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=4 SV=1 -
8	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4 -
9	P01037	Cystatin-SN OS=Homo sapiens GN=CST1 PE=1 SV=3 - [CYTN_HUMAN]
10	P01036	Cystatin-S OS=Homo sapiens GN=CST4 PE=1 SV=3 - [CYTS_HUMAN]
11	P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin OS=Homo sapiens GN=LCN2 PE=1 SV=2 -
12	P22079-2	Isoform 2 of Lactoperoxidase OS=Homo sapiens GN=LPO - [PERL_HUMAN]
13	Q9HC84	Mucin-5B OS=Homo sapiens GN=MUC5B PE=1 SV=3 - [MUC5B_HUMAN]
14	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor OS=Homo sapiens GN=PAUF PE=1 SV=1 -
15	P18510-4	Isoform 4 of Interleukin-1 receptor antagonist protein OS=Homo sapiens GN=IL1RN -
16	P10599	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3 - [THIO_HUMAN]
17	P01857	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 - [IGHG1_HUMAN]
18	P23280-3	Isoform 3 of Carbonic anhydrase 6 OS=Homo sapiens GN=CA6 - [CAH6_HUMAN]
19	P61626	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_HUMAN]
20	H6VRF8	Keratin 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=3 SV=1 - [H6VRF8_HUMAN]
21	B4DRT4	cDNA FLJ51535, highly similar to Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo
22	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B OS=Homo sapiens GN=SMR3B PE=1
23	P01861	Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1 - [IGHG4_HUMAN]
24	Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2 OS=Homo sapiens GN=BPIFB2 PE=1 SV=2 -
25	Q9UGM3-7	Isoform 7 of Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 -
26	P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2 -
27	P05109	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]
28	Q6P5S2	UPF0762 protein C6orf58 OS=Homo sapiens GN=C6orf58 PE=1 SV=2 - [CF058_HUMAN]
29	Q0QF37	Malate dehydrogenase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=2 SV=1 -
30	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]
31	P60174-1	Isoform 2 of Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 - [TPIS_HUMAN]
32	P27482	Calmodulin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=CALML3 PE=1 SV=2 - [CALL3_HUMAN]
33	P00738-2	Isoform 2 of Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP - [HPT_HUMAN]
34	P31025	Lipocalin-1 OS=Homo sapiens GN=LCN1 PE=1 SV=1 - [LCN1_HUMAN]
35	P61769	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 SV=1 - [B2MG_HUMAN]
36	P01871	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3 - [IGHM_HUMAN]
37	Q19KS2	Lactoferrin (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q19KS2_HUMAN]
38	P20061	Transcobalamin-1 OS=Homo sapiens GN=TCN1 PE=1 SV=2 - [TCO1_HUMAN]
39	P07108	Acyl-CoA-binding protein OS=Homo sapiens GN=DBI PE=1 SV=2 - [ACBP_HUMAN]
40	B2R4M6	Protein S100 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R4M6_HUMAN]
41	P01040	Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=1 SV=1 - [CYTA_HUMAN]
42	B4DWU6	cDNA FLJ51361, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens PE=2

Anexo D - Proteínas identificadas na Etapa 2 - Pacientes submetidos ao TCTH

43	B1AN48	Small proline-rich protein 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SPRR3 PE=4 SV=3 -
44	C9JFR7	Cytochrome c (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=1 SV=1 - [C9JFR7_HUMAN]
45	D6RHX1	Mucin-7 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MUC7 PE=4 SV=1 - [D6RHX1_HUMAN]
46	K7EMD9	Keratin, type I cytoskeletal 13 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=1 SV=1 -
47	B3KUS2	cDNA FLJ40505 fis, clone TEST12045562, highly similar to HEAT SHOCK-RELATED 70 kDa
48	P04745	Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2 - [AMY1_HUMAN]
49	Q9HC84	Mucin-5B OS=Homo sapiens GN=MUC5B PE=1 SV=3 - [MUC5B_HUMAN]
50	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2 - [ZA2G_HUMAN]
51	P12273	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1 - [PIP_HUMAN]
52	P01876	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 - [IGHA1_HUMAN]
53	F6KPG5	Albumin (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [F6KPG5_HUMAN]
54	P01877	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3 - [IGHA2_HUMAN]
55	P01834	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1 - [IGKC_HUMAN]
56	P01036	Cystatin-S OS=Homo sapiens GN=CST4 PE=1 SV=3 - [CYTS_HUMAN]
57	P01037	Cystatin-SN OS=Homo sapiens GN=CST1 PE=1 SV=3 - [CYTN_HUMAN]
58	Q6P5S2	UPF0762 protein C6orf58 OS=Homo sapiens GN=C6orf58 PE=1 SV=2 - [CF058_HUMAN]
59	P22079-2	Isoform 2 of Lactoperoxidase OS=Homo sapiens GN=LPO - [PERL_HUMAN]
60	P61626	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_HUMAN]
61	A0M8Q9	C1 segment protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=C1 segment PE=4 SV=1 -
62	Q9UGM3-7	Isoform 7 of Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 -
63	B721F7	cDNA FLJ53859, highly similar to Kallikrein-1 (EC 3.4.21.35) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
64	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4 -
65	P01857	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 - [IGHG1_HUMAN]
66	P01623	Ig kappa chain V-III region WOL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [KV305_HUMAN]
67	Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2 OS=Homo sapiens GN=BPIFB2 PE=1 SV=2 -
68	B4DVQ0	cDNA FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
69	Q5T3N1	Annexin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=1 SV=1 - [Q5T3N1_HUMAN]
70	D6RD17	Immunoglobulin J chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=3 -
71	A0A087WU08	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1 - [A0A087WU08_HUMAN]
72	E1B2D1	Hemoglobin alpha-1 globin chain variant (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=3
73	B3KP79	cDNA FLJ31323 fis, clone LIVER2000037, highly similar to Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo
74	B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens PE=2
75	B4DRR0	cDNA FLJ53910, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens PE=2
76	F8W696	Truncated apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 -
77	B4E1B2	cDNA FLJ53691, highly similar to Serotransferrin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
78	P01034	Cystatin-C OS=Homo sapiens GN=CST3 PE=1 SV=1 - [CYTC_HUMAN]
79	P04745	Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2 - [AMY1_HUMAN]
80	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2 - [ZA2G_HUMAN]
81	F6KPG5	Albumin (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [F6KPG5_HUMAN]
82	Q9HC84	Mucin-5B OS=Homo sapiens GN=MUC5B PE=1 SV=3 - [MUC5B_HUMAN]
83	P12273	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1 - [PIP_HUMAN]
84	P01876	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 - [IGHA1_HUMAN]
85	A0A087X130	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=4 SV=1 - [A0A087X130_HUMAN]
86	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4 -

Anexo D - Proteínas identificadas na Etapa 2 - Pacientes submetidos ao TCTH

87	P01877	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3 - [IGHA2_HUMAN]
88	Q6P5S2	UPF0762 protein C6orf58 OS=Homo sapiens GN=C6orf58 PE=1 SV=2 - [CF058_HUMAN]
89	B4DRR0	cDNA FLJ53910, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens PE=2
90	S6BGD6	IgG L chain OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [S6BGD6_HUMAN]
91	Q9UGM3-7	Isoform 7 of Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 -
92	Q8TAX7	Mucin-7 OS=Homo sapiens GN=MUC7 PE=1 SV=2 - [MUC7_HUMAN]
93	B5BU38	Annexin OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=2 SV=1 - [B5BU38_HUMAN]
94	Q19KS2	Lactoferrin (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q19KS2_HUMAN]
95	Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2 OS=Homo sapiens GN=BPIFB2 PE=1 SV=2 -
96	B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens PE=2
97	B4DVQ0	cDNA FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
98	B7Z1F7	cDNA FLJ53859, highly similar to Kallikrein-1 (EC 3.4.21.35) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
99	P22079-2	Isoform 2 of Lactoperoxidase OS=Homo sapiens GN=LPO - [PERL_HUMAN]
100	Q8TDL5	BPI fold-containing family B member 1 OS=Homo sapiens GN=BPIFB1 PE=1 SV=1 -
101	P61626	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_HUMAN]
102	P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]
103	A1A4E9	Keratin 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=2 SV=1 - [A1A4E9_HUMAN]
104	P31025	Lipocalin-1 OS=Homo sapiens GN=LCN1 PE=1 SV=1 - [LCN1_HUMAN]
105	D6RD17	Immunoglobulin J chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=3 -
106	P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin OS=Homo sapiens GN=LCN2 PE=1 SV=2 -
107	P02787	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 - [TRFE_HUMAN]
108	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]
109	P01623	Ig kappa chain V-III region WOL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [KV305_HUMAN]
110	P04217	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4 - [A1BG_HUMAN]
111	A8K2U0	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=A2ML1 PE=1 SV=3 -
112	P01024	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 - [CO3_HUMAN]
113	P01023	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3 - [A2MG_HUMAN]
114	P60174-4	Isoform 4 of Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TP1 - [TPIS_HUMAN]
115	A0A0A0MS07	Ig gamma-1 chain C region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=4 SV=1 -
116	P05164-2	Isoform H14 of Myeloperoxidase OS=Homo sapiens GN=MPO - [PERM_HUMAN]
117	B4DI70	cDNA FLJ53509, highly similar to Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
118	P00738-2	Isoform 2 of Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP - [HPT_HUMAN]
119	E9PI65	Heat shock cognate 71 kDa protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1 -
120	P09211	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 - [GSTP1_HUMAN]
121	P01037	Cystatin-SN OS=Homo sapiens GN=CST1 PE=1 SV=3 - [CYTN_HUMAN]
122	H3BUH7	Fructose-bisphosphate aldolase A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=1 -
123	P04080	Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2 - [CYTB_HUMAN]
124	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor OS=Homo sapiens GN=PAUF PE=1 SV=1 -
125	F8W696	Truncated apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 -
126	B2R4M6	Protein S100 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R4M6_HUMAN]
127	P01861	Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1 - [IGHG4_HUMAN]
128	P01036	Cystatin-S OS=Homo sapiens GN=CST4 PE=1 SV=3 - [CYTS_HUMAN]
129	B4E1I8	cDNA FLJ54228, highly similar to Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens PE=2
130	PODIJ8	Serum amyloid A-1 protein OS=Homo sapiens GN=SAA1 PE=1 SV=1 - [SAA1_HUMAN]

Anexo D - Proteínas identificadas na Etapa 2 - Pacientes submetidos ao TCTH

131	E7EUT5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=1 -
132	Q68DY8	Putative uncharacterized protein DKFZp686I11137 OS=Homo sapiens GN=DKFZp686I11137
133	P04040	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3 - [CATA_HUMAN]
134	A8K5I6	cDNA FLJ78643, highly similar to Homo sapiens cornulin (CRNN), mRNA OS=Homo sapiens
135	P04792	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2 - [HSPB1_HUMAN]
136	P37837	Transaldolase OS=Homo sapiens GN=TALDO1 PE=1 SV=2 - [TALDO_HUMAN]
137	P02774-2	Isoform 2 of Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC - [VTDB_HUMAN]
138	H0YKS4	Annexin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=1 - [H0YKS4_HUMAN]
139	P29508-2	Isoform 2 of Serpin B3 OS=Homo sapiens GN=SERPINB3 - [SPB3_HUMAN]
140	A7L8C5	Alpha-1-antitrypsin (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1 - [A7L8C5_HUMAN]
141	D6REY1	Chitotriosidase-1 OS=Homo sapiens GN=CHIT1 PE=3 SV=1 - [D6REY1_HUMAN]
142	P05109	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]
143	M0R132	Kallikrein-10 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=KLK10 PE=3 SV=1 - [M0R132_HUMAN]
144	P04745	Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2 - [AMY1_HUMAN]
145	P02768	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]
146	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4 -
147	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor OS=Homo sapiens GN=PAUF PE=1 SV=1 -
148	Q0KKI6	Immunoglobulin light chain (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [Q0KKI6_HUMAN]
149	Q9HC84	Mucin-5B OS=Homo sapiens GN=MUC5B PE=1 SV=3 - [MUC5B_HUMAN]
150	P01876	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 - [IGHA1_HUMAN]
151	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2 - [ZA2G_HUMAN]
152	Q6P552	UPF0762 protein C6orf58 OS=Homo sapiens GN=C6orf58 PE=1 SV=2 - [CF058_HUMAN]
153	P61626	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_HUMAN]
154	P12273	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1 - [PIP_HUMAN]
155	A0A075B6N7	Ig alpha-2 chain C region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=4 SV=1 -
156	Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2 OS=Homo sapiens GN=BPIFB2 PE=1 SV=2 -
157	S6BGD6	IgG L chain OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [S6BGD6_HUMAN]
158	Q6NS95	IGL@ protein OS=Homo sapiens GN=IGL@ PE=2 SV=1 - [Q6NS95_HUMAN]
159	P01037	Cystatin-SN OS=Homo sapiens GN=CST1 PE=1 SV=3 - [CYTN_HUMAN]
160	P01036	Cystatin-S OS=Homo sapiens GN=CST4 PE=1 SV=3 - [CYTS_HUMAN]
161	P22079-2	Isoform 2 of Lactoperoxidase OS=Homo sapiens GN=LPO - [PERL_HUMAN]
162	P23280-3	Isoform 3 of Carbonic anhydrase 6 OS=Homo sapiens GN=CA6 - [CAH6_HUMAN]
163	Q9UGM3-7	Isoform 7 of Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 -
164	A0A087WYE1	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 -
165	Q8WVW5	Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
166	H6VRF8	Keratin 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=3 SV=1 - [H6VRF8_HUMAN]
167	P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]
168	P01620	Ig kappa chain V-III region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [KV302_HUMAN]
169	P20061	Transcobalamin-1 OS=Homo sapiens GN=TCN1 PE=1 SV=2 - [TCO1_HUMAN]
170	P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin OS=Homo sapiens GN=LCN2 PE=1 SV=2 -
171	A0A087WW89	Protein IGHV3-72 OS=Homo sapiens GN=IGHV3-72 PE=4 SV=1 - [A0A087WW89_HUMAN]
172	Q96DR5	BPI fold-containing family A member 2 OS=Homo sapiens GN=BPIFA2 PE=1 SV=2 -
173	P01023	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3 - [A2MG_HUMAN]
174	B4DVE1	cDNA FLJ53478, highly similar to Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -

Anexo D - Proteínas identificadas na Etapa 2 - Pacientes submetidos ao TCTH

175	B4DE36	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DE36_HUMAN]
176	A8K2H9	cDNA FLJ78503, highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 1,
177	B4DRR0	cDNA FLJ53910, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens PE=2
178	P09211	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 - [GSTP1_HUMAN]
179	P04080	Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2 - [CYTB_HUMAN]
180	B4E216	cDNA FLJ57339, highly similar to Complement C3 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
181	H0YGG5	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=A2ML1 PE=4 SV=1 -
182	Q19KS2	Lactoferrin (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q19KS2_HUMAN]
183	P06702	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 - [S10A9_HUMAN]
184	D6RD17	Immunoglobulin J chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=3 -
185	Q9Y6R7	IgGfC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3 - [FCGBP_HUMAN]
186	P04406-2	Isoform 2 of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH -
187	P13796	Plastin-2 OS=Homo sapiens GN=LCP1 PE=1 SV=6 - [PLSL_HUMAN]
188	B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens PE=2
189	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5 -
190	P05109	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]
191	Q5T0H7	Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1 - [Q5T0H7_HUMAN]
192	Q9UBC9	Small proline-rich protein 3 OS=Homo sapiens GN=SPRR3 PE=1 SV=2 - [SPRR3_HUMAN]
193	B7Z1F7	cDNA FLJ53859, highly similar to Kallikrein-1 (EC 3.4.21.35) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
194	F8W696	Truncated apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 -
195	P61769	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 SV=1 - [B2MG_HUMAN]
196	B5BU38	Annexin OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=2 SV=1 - [B5BU38_HUMAN]
197	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]
198	B2R7Z6	cDNA, FLJ93674 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R7Z6_HUMAN]
199	Q14484	Beta-globin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HBB PE=3 SV=1 - [Q14484_HUMAN]
200	P02774-2	Isoform 2 of Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC - [VTDB_HUMAN]
201	P02790	Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2 - [HEMO_HUMAN]
202	B3KSI4	Transketolase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KSI4_HUMAN]
203	P05164-2	Isoform H14 of Myeloperoxidase OS=Homo sapiens GN=MPO - [PERM_HUMAN]
204	P07737	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2 - [PROF1_HUMAN]
205	D3DP16	Fibrinogen gamma chain, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=FGG PE=4 SV=1 -
206	A0A087X2C0	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=1 - [A0A087X2C0_HUMAN]
207	U3PXP0	Alpha globin chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HBA2 PE=3 SV=1 - [U3PXP0_HUMAN]
208	P29508-2	Isoform 2 of Serpin B3 OS=Homo sapiens GN=SERPINB3 - [SPB3_HUMAN]
209	B4E3A8	cDNA FLJ53963, highly similar to Leukocyte elastase inhibitor OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
210	P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2 -
211	B4DUI5	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DUI5_HUMAN]
212	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]
213	D6REL8	Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=1 - [D6REL8_HUMAN]
214	P52209-2	Isoform 2 of 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens
215	B7Z5Q2	cDNA FLJ58075, highly similar to Ceruloplasmin (EC 1.16.3.1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
216	P27482	Calmodulin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=CALML3 PE=1 SV=2 - [CALL3_HUMAN]
217	E7ESK7	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 -
218	P01594	Ig kappa chain V-I region AU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [KV102_HUMAN]

Anexo D - Proteínas identificadas na Etapa 2 - Pacientes submetidos ao TCTH

219	Q5TOR7	Adenylyl cyclase-associated protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CAP1 PE=1 SV=1 -
220	A0N5G5	Rheumatoid factor D5 light chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=V<kappa>3 PE=2 SV=1 -
221	B7ZLF8	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7ZLF8_HUMAN]
222	B4DWK8	Catalase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DWK8_HUMAN]
223	F5H2R5	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ARHGDIB PE=1 SV=1 -
224	A8K5I6	cDNA FLJ78643, highly similar to Homo sapiens cornulin (CRNN), mRNA OS=Homo sapiens
225	P62328	Thymosin beta-4 OS=Homo sapiens GN=TMSB4X PE=1 SV=2 - [TYB4_HUMAN]
226	P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]
227	H3BS21	Haptoglobin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1 - [H3BS21_HUMAN]
228	Q9JMC5	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring (Fragment) OS=Homo sapiens
229	F2Z393	Transaldolase OS=Homo sapiens GN=TALDO1 PE=1 SV=1 - [F2Z393_HUMAN]
230	B7Z747	cDNA FLJ51120, highly similar to Matrix metalloproteinase-9 (EC 3.4.24.35) OS=Homo
231	P04745	Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2 - [AMY1_HUMAN]
232	P01876	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 - [IGHA1_HUMAN]
233	Q0KKI6	Immunoglobulin light chain (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [Q0KKI6_HUMAN]
234	F6KPG5	Albumin (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [F6KPG5_HUMAN]
235	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2 - [ZA2G_HUMAN]
236	Q9HC84	Mucin-5B OS=Homo sapiens GN=MUC5B PE=1 SV=3 - [MUC5B_HUMAN]
237	A0A075B6N7	Ig alpha-2 chain C region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=4 SV=1 -
238	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4 -
239	S6BGD6	IgG L chain OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [S6BGD6_HUMAN]
240	P12273	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1 - [PIP_HUMAN]
241	Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2 OS=Homo sapiens GN=BPIFB2 PE=1 SV=2 -
242	Q6P5S2	UPF0762 protein C6orf58 OS=Homo sapiens GN=C6orf58 PE=1 SV=2 - [CF058_HUMAN]
243	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor OS=Homo sapiens GN=PAUF PE=1 SV=1 -
244	P01037	Cystatin-SN OS=Homo sapiens GN=CST1 PE=1 SV=3 - [CYTN_HUMAN]
245	B4DVQ0	cDNA FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
246	P61626	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_HUMAN]
247	P22079-2	Isoform 2 of Lactoperoxidase OS=Homo sapiens GN=LPO - [PERL_HUMAN]
248	B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens PE=2
249	P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]
250	B4DVE1	cDNA FLJ53478, highly similar to Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
251	P04083	Annexin A1 OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=1 SV=2 - [ANXA1_HUMAN]
252	P23280	Carbonic anhydrase 6 OS=Homo sapiens GN=CA6 PE=1 SV=3 - [CAH6_HUMAN]
253	A1A4E9	Keratin 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=2 SV=1 - [A1A4E9_HUMAN]
254	P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin OS=Homo sapiens GN=LCN2 PE=1 SV=2 -
255	P01036	Cystatin-S OS=Homo sapiens GN=CST4 PE=1 SV=3 - [CYTS_HUMAN]
256	P04080	Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2 - [CYTB_HUMAN]
257	A8K008	cDNA FLJ78387 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [A8K008_HUMAN]
258	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]
259	Q19KS2	Lactoferrin (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q19KS2_HUMAN]
260	E7EUT5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=1 -
261	P01623	Ig kappa chain V-III region WOL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [KV305_HUMAN]
262	A8K2U0	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=A2ML1 PE=1 SV=3 -

Anexo D - Proteínas identificadas na Etapa 2 - Pacientes submetidos ao TCTH

263	P09211	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 - [GSTP1_HUMAN]
264	P04217	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4 - [A1BG_HUMAN]
265	Q9UGM3-7	Isoform 7 of Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 -
266	B7Z4U6	cDNA FLJ55803, highly similar to Gelsolin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z4U6_HUMAN]
267	D6RD17	Immunoglobulin J chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=3 -
268	B4E3A8	cDNA FLJ53963, highly similar to Leukocyte elastase inhibitor OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
269	P52209-2	Isoform 2 of 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens
270	P07737	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2 - [PROF1_HUMAN]
271	P01024	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 - [CO3_HUMAN]
272	P11142-2	Isoform 2 of Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 -
273	P13796	Plastin-2 OS=Homo sapiens GN=LCP1 PE=1 SV=6 - [PLSL_HUMAN]
274	K7EQ48	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=2 - [K7EQ48_HUMAN]
275	P63104	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 - [1433Z_HUMAN]
276	A0N5G5	Rheumatoid factor D5 light chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=V<kappa>3 PE=2 SV=1 -
277	P29508-2	Isoform 2 of Serpin B3 OS=Homo sapiens GN=SERPINB3 - [SPB3_HUMAN]
278	F2Z393	Transaldolase OS=Homo sapiens GN=TALDO1 PE=1 SV=1 - [F2Z393_HUMAN]
279	P60174-1	Isoform 2 of Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TP11 - [TPIS_HUMAN]
280	P01871	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3 - [IGHM_HUMAN]
281	P31025	Lipocalin-1 OS=Homo sapiens GN=LCN1 PE=1 SV=1 - [LCN1_HUMAN]
282	P01023	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3 - [A2MG_HUMAN]
283	B4DRT4	cDNA FLJ51535, highly similar to Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo
284	P61769	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 SV=1 - [B2MG_HUMAN]
285	Q96DR5	BPI fold-containing family A member 2 OS=Homo sapiens GN=BPIFA2 PE=1 SV=2 -
286	B3KPZ8	cDNA FLJ32530 fis, clone SMINT2000185, highly similar to TRANSKETOLASE (EC 2.2.1.1)
287	P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]
288	F8WE65	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=1 -
289	C9JMC5	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring (Fragment) OS=Homo sapiens
290	F8W696	Truncated apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 -
291	B2R7Z6	cDNA, FLJ93674 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R7Z6_HUMAN]
292	K7EMV3	Histone H3 OS=Homo sapiens GN=H3F3B PE=1 SV=1 - [K7EMV3_HUMAN]
293	B4DKL5	cDNA FLJ51983, highly similar to Phosphoglycerate mutase 1 (EC 5.4.2.1) OS=Homo sapiens
294	P02787	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 - [TRFE_HUMAN]
295	Q86TY5	Galectin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q86TY5_HUMAN]
296	D5FZW3	Beta globin (Fragment) OS=Homo sapiens PE=3 SV=1 - [D5FZW3_HUMAN]
297	B7Z507	cDNA FLJ51036, highly similar to Matrix metalloproteinase-9 (EC3.4.24.35) OS=Homo
298	P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2 -
299	A0A087WU08	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1 - [A0A087WU08_HUMAN]
300	B4DNL5	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DNL5_HUMAN]
301	H6VRF8	Keratin 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=3 SV=1 - [H6VRF8_HUMAN]

Anexo E - Proteínas identificadas na Etapa 2 - Pacientes de Líquen Plano Oral

Proteínas identificadas na etapa 2 - Pacientes de Líquen Plano oral		
	Nº de acesso	Identificação das proteínas
1	P04745	Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2 - [AMY1_HUMAN]
2	P02768	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]
3	P01036	Cystatin-S OS=Homo sapiens GN=CST4 PE=1 SV=3 - [CYTS_HUMAN]
4	P01037	Cystatin-SN OS=Homo sapiens GN=CST1 PE=1 SV=3 - [CYTN_HUMAN]
5	E7EQB2	Lactotransferrin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=LTF PE=1 SV=1 - [E7EQB2_HUMAN]
6	P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]
7	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2 - [ZA2G_HUMAN]
8	Q9HC84	Mucin-5B OS=Homo sapiens GN=MUC5B PE=1 SV=3 - [MUC5B_HUMAN]
9	P09228	Cystatin-SA OS=Homo sapiens GN=CST2 PE=1 SV=1 - [CYTT_HUMAN]
10	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4 -
11	P22079-2	Isoform 2 of Lactoperoxidase OS=Homo sapiens GN=LPO - [PERL_HUMAN]
12	A0A075B6N7	Ig alpha-2 chain C region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=4 SV=1 -
13	Q6NS95	IGL@ protein OS=Homo sapiens GN=IGL@ PE=2 SV=1 - [Q6NS95_HUMAN]
14	Q9UGM3-7	Isoform 7 of Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 -
15	Q53H26	Transferrin variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q53H26_HUMAN]
16	B3KSI4	Transketolase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KSI4_HUMAN]
17	Q6MZQ6	Putative uncharacterized protein DKFZp686G1190 OS=Homo sapiens
18	P06702	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 - [S10A9_HUMAN]
19	P00738	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1 - [HPT_HUMAN]
20	P60174-1	Isoform 2 of Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TP1 - [TPIS_HUMAN]
21	P28325	Cystatin-D OS=Homo sapiens GN=CST5 PE=1 SV=1 - [CYTD_HUMAN]
22	P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin OS=Homo sapiens GN=LCN2 PE=1 SV=2 -
23	B4DI39	cDNA FLJ54328, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens PE=2
24	P05164-2	Isoform H14 of Myeloperoxidase OS=Homo sapiens GN=MPO - [PERM_HUMAN]
25	P68871	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2 - [HBB_HUMAN]
26	P04040	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3 - [CATA_HUMAN]
27	P12273	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1 - [PIP_HUMAN]
28	P05109	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]
29	P06870	Kallikrein-1 OS=Homo sapiens GN=KLK1 PE=1 SV=2 - [KLK1_HUMAN]
30	A8K486	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K486_HUMAN]
31	P31025	Lipocalin-1 OS=Homo sapiens GN=LCN1 PE=1 SV=1 - [LCN1_HUMAN]
32	P01859	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2 - [IGHG2_HUMAN]
33	B4DVQ0	cDNA FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
34	E9PKE3	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1 -
35	Q9UBC9	Small proline-rich protein 3 OS=Homo sapiens GN=SPRR3 PE=1 SV=2 - [SPRR3_HUMAN]
36	P61626	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_HUMAN]
37	P01591	Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=4 - [IGJ_HUMAN]
38	P69905	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 - [HBA_HUMAN]
39	A0A075B6N8	Ig gamma-3 chain C region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=4 SV=1 -
40	B4E216	cDNA FLJ57339, highly similar to Complement C3 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
41	P04080	Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2 - [CYTB_HUMAN]
42	B7Z507	cDNA FLJ51036, highly similar to Matrix metalloproteinase-9 (EC3.4.24.35) OS=Homo

Anexo E - Proteínas identificadas na Etapa 2 - Pacientes de Líquen Plano Oral

43	P10599	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3 - [THIO_HUMAN]
44	A0A087WYJ9	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=1 - [A0A087WYJ9_HUMAN]
45	Q5JJP9	Putative uncharacterized protein DKFZp686D0114 OS=Homo sapiens GN=DKFZp686D0114
46	B7ZLF8	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7ZLF8_HUMAN]
47	P61769	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 SV=1 - [B2MG_HUMAN]
48	B7Z4U6	cDNA FLJ55803, highly similar to Gelsolin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
49	I6L8B7	Fatty acid-binding protein, epidermal OS=Homo sapiens GN=FABP5 PE=1 SV=1 -
50	B3KRK8	cDNA FLJ34494 fis, clone HLUNG2005030, highly similar to VIMENTIN OS=Homo sapiens
51	P02042	Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens GN=HBD PE=1 SV=2 - [HBD_HUMAN]
52	P31949	Protein S100-A11 OS=Homo sapiens GN=S100A11 PE=1 SV=2 - [S10AB_HUMAN]
53	P01034	Cystatin-C OS=Homo sapiens GN=CST3 PE=1 SV=1 - [CYTC_HUMAN]
54	P02774-2	Isoform 2 of Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC - [VTDB_HUMAN]
55	Q5H9A7	Metalloproteinase inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=TIMP1 PE=1 SV=1 -
56	Q6P5S2	UPF0762 protein C6orf58 OS=Homo sapiens GN=C6orf58 PE=1 SV=2 - [CF058_HUMAN]
57	D6REL8	Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=1 - [D6REL8_HUMAN]
58	P20061	Transcobalamin-1 OS=Homo sapiens GN=TCN1 PE=1 SV=2 - [TCO1_HUMAN]
59	A0A087X1V9	Protein IGKV2-28 OS=Homo sapiens GN=IGKV2-28 PE=4 SV=1 - [A0A087X1V9_HUMAN]
60	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B OS=Homo sapiens GN=SMR3B PE=1
61	K7EQ48	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=2 -
62	O75594	Peptidoglycan recognition protein 1 OS=Homo sapiens GN=PGLYRP1 PE=1 SV=1 -
63	P22528	Cornifin-B OS=Homo sapiens GN=SPRR1B PE=1 SV=2 - [SPR1B_HUMAN]
64	Q14508	WAP four-disulfide core domain protein 2 OS=Homo sapiens GN=WFDC2 PE=1 SV=2 -
65	P11021	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 -
66	HOYGK7	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ARHGDI2 PE=1 SV=1 -
67	P54108	Cysteine-rich secretory protein 3 OS=Homo sapiens GN=CRISP3 PE=1 SV=1 -
68	P18510-4	Isoform 4 of Interleukin-1 receptor antagonist protein OS=Homo sapiens GN=IL1RN -
69	P07602	Prosaposin OS=Homo sapiens GN=PSAP PE=1 SV=2 - [SAP_HUMAN]
70	P02679-2	Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGB -
71	A0A024RC30	Desmoglein 3 (Pemphigus vulgaris antigen), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=DSG3
72	P01040	Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=1 SV=1 - [CYTA_HUMAN]
73	P31151	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV=4 - [S10A7_HUMAN]
74	P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PEBP1 PE=1 SV=3 -
75	P62328	Thymosin beta-4 OS=Homo sapiens GN=TMSB4X PE=1 SV=2 - [TYB4_HUMAN]
76	P59665	Neutrophil defensin 1 OS=Homo sapiens GN=DEFA1 PE=1 SV=1 - [DEF1_HUMAN]
77	P27482	Calmodulin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=CALML3 PE=1 SV=2 - [CALL3_HUMAN]
78	P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Homo sapiens GN=SOD1 PE=1 SV=2 - [SODC_HUMAN]
79	B4DKL5	cDNA FLJ51983, highly similar to Phosphoglycerate mutase 1 (EC 5.4.2.1) OS=Homo
80	M0R009	Alpha-1B-glycoprotein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=4 SV=3 -
81	D9IWP9	Beta-2-glycoprotein I (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [D9IWP9_HUMAN]
82	D6CHE9	Proteinase 3 OS=Homo sapiens GN=PRTN3 PE=2 SV=1 - [D6CHE9_HUMAN]
83	B7Z5Q2	cDNA FLJ58075, highly similar to Ceruloplasmin (EC 1.16.3.1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1
84	Q07654	Trefoil factor 3 OS=Homo sapiens GN=TFF3 PE=1 SV=1 - [TFF3_HUMAN]
85	P07108	Acyl-CoA-binding protein OS=Homo sapiens GN=DBI PE=1 SV=2 - [ACBP_HUMAN]
86	B4DI70	cDNA FLJ53509, highly similar to Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -

Anexo E - Proteínas identificadas na Etapa 2 - Pacientes de Líquen Plano Oral

87	Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E OS=Homo sapiens GN=TGM3 PE=1 SV=4
88	P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1 - [A1AG1_HUMAN]
89	B7Z437	cDNA FLJ53435, highly similar to Ezrin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z437_HUMAN]
90	E9PKG6	Nucleobindin-2 OS=Homo sapiens GN=NUCB2 PE=1 SV=2 - [E9PKG6_HUMAN]
91	P23280-3	Isoform 3 of Carbonic anhydrase 6 OS=Homo sapiens GN=CA6 - [CAH6_HUMAN]
92	B4DQ53	cDNA FLJ51275 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DQ53_HUMAN]
93	G3V2V8	Epididymal secretory protein E1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NPC2 PE=1 SV=1 -
94	B4DNY3	Adenylyl cyclase-associated protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DNY3_HUMAN]
95	F8WD96	Cathepsin D light chain OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=1 SV=1 - [F8WD96_HUMAN]
96	A0A0A0MRQ5	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=4 SV=1 - [A0A0A0MRQ5_HUMAN]
97	E7EUT5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=1 -
98	Q9NQ38	Serine protease inhibitor Kazal-type 5 OS=Homo sapiens GN=SPINK5 PE=1 SV=2 -
99	P63104	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 - [1433Z_HUMAN]
100	Q53H37	Calmodulin-like skin protein variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -
101	Q0QF37	Malate dehydrogenase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=2 SV=1 -
102	Q9BS19	HPX protein OS=Homo sapiens GN=HPX PE=2 SV=1 - [Q9BS19_HUMAN]
103	P10153	Non-secretory ribonuclease OS=Homo sapiens GN=RNASE2 PE=1 SV=2 - [RNAS2_HUMAN]
104	B4E1I8	cDNA FLJ54228, highly similar to Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens
105	A8K2U0	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=A2ML1 PE=1 SV=3 -
106	F8W696	Truncated apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 -
107	H0YDX6	CD44 antigen (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CD44 PE=1 SV=1 - [H0YDX6_HUMAN]
108	H3BRY3	Coronin OS=Homo sapiens GN=CORO1A PE=1 SV=1 - [H3BRY3_HUMAN]

REFERÊNCIAS*

1. Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. Vol. 124, Blood. American Society of Hematology; 2014. p. 374–84.
2. Mays JW, Fassil H, Edwards D a., Pavletic SZ, Bassim CW. Oral chronic graft-versus-host disease: Current pathogenesis, therapy, and research. Oral Dis. 2013;19(4):327–46.
3. Rozmus J, Schultz KR. Biomarkers in chronic graft-versus-host disease. Expert Rev Hematol. 2011;4(3):329–42.
4. Dzierzak E, Speck NA. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. Nat Immunol. 2008;9(2):129–36.
5. Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011;12(10):643–55.
6. Kim CH. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. J Blood Med. 2010;1:13–9.
7. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. Cell. 2008;132:631–44.
8. Shah BD, Zuckerman KS. Wnt Signaling in Normal and Malignant Hematopoiesis. In: Advances in Malignant Hematology. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011. 1–30.
9. O que são células estaminais - Criovida [Internet]. [citado 3 de fevereiro de 2017]. Available at: <http://www.criovida.pt/celulas-estaminais/>
10. Ho MSH, Medcalf RL, Livesey SA, Traianedes K. The dynamics of adult haematopoiesis in the bone and bone marrow environment. Br J Haematol. 2015;170(4):472–86.
11. Hall J, Guyton A. Tratado de Fisiologia Médica. Elsevier. Rio de Janeiro; 2011. 437-486 p.
12. De T, Hematopo L, Regulamento T, Perif S, Aut T, Alog T. REGULAMENTO TÉCNICO I - DEFINIÇÕES II - CRITÉRIOS DE INDICAÇÃO.

* De acordo com: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

13. Juric MK, Ghimire S, Ogonek J, Weissinger EM, Holler E, van Rood JJ, et al. Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Front Immunol*. 2016;7:470.
14. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralto S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(12):1628–33.
15. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: One size does not fit all. *Blood*. 2014;124:344–53.
16. Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, Demirer T, Dini G, Einsele H, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37(5):439–49.
17. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(4):e0028.
18. Massumoto C, Mizukami S. Transplante autólogo de medula óssea e imunoterapia pós-transplante. In: *Medicina*. 2001. 405–14.
19. Curcioli AC de JV, Carvalho EC de. Infusion of Hematopoietic Stem Cells: Types, Characteristics, Adverse and Transfusion Reactions and the Implications for Nursing. *Infusão células-tronco Hematop tipos, Caracter reações Advers e transfusionais e implicações para a enfermagem*. 2010;18(4):716–24.
20. Presland RB. Biology of chronic graft-vs-host disease: Immune mechanisms and progress in biomarker discovery. *World J Transplant*. 2016;6(4):608–19.
21. Badalà F, Nouri-mahdavi K, Raoof DA. Oral graft-versus-host disease. *Computer*. 2008;144(5):724–32.
22. Szyska M, Na I-K. Bone Marrow GvHD after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016;7:118.
23. Villarreal CDV, Perez JCJ, Alanis JCS, Candiani JO. Cutaneous graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplant - a review. *An Bras Dermatol*. 2016;91(3):336–43.
24. Margaix-Munoz M, Bagan J, Jimenez Y, Sarrion M, Poveda-Roda R. Graft-versus-host disease affecting oral cavity. A review. *J Clin Exp Dent*. 2015;7(1):e138–45.
25. Cornejo CM, Kim EJ, Rosenbach M, Micheletti RG. Atypical manifestations of graft-versus-host disease. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(4):690–5.
26. Copelan EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1813–26.

27. Nagler RM; NA. Salivary gland involvement in graft versus host disease: the underlying mechanism and implicated treatment. *IMAJ*. 2004;6:167–72.
28. Billingham R. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966;67:21–78.
29. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(6):443–58.
30. Markey KA, MacDonald KPA, Hill GR. The biology of graft-versus-host disease: Experimental systems instructing clinical practice. *Blood*. 2014;124. 354–62.
31. Schubert MM, Sullivan KM. Recognition, incidence, and management of oral graft-versus-host disease. *NCI Monogr*. 1990;(9):135–43.
32. Treister N, Duncan C, Cutler C, Lehmann L. How we treat oral chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2012;120(17):3407–18.
33. Hochberg M. Síndrome de Sjogren. - Tratado de Medicina Interna. 21º ed. Goldman L BJC, organizador. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. 1696-8 p.
34. Lehman JS, Tollefson MM, Gibson LE. Lichen planus. *International Journal of Dermatology*. 2009; 48:682–94.
35. Stoopler ET, Sollecito TP. Oral mucosal diseases: evaluation and management. *Med Clin North Am*. 2014;98(6):1323–52.
36. Nylander K. Decreased expression of p63 in oral lichen planus and graft-vs . -host disease associated with oral inflammation. *J Oral Pathol Med*. 2006;35:46–50.
37. Lourenço SV, Resende ACB, Bologna SB, Nico MMS. Lichen planus sialadenitis: A mucosal analog of lichen planopilaris and lichen planoporus. *J Cutan Pathol*. 2010;37(3):396–9.
38. Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103(SUPPL.):S25.e1-S25.e12.
39. Sato M, Tokuda N, Fukumoto T, Mano T, Sato T, Ueyama Y. Immunohistopathological study of the oral lichenoid lesions of chronic GVHD. *J Oral Pathol Med*. 2006;35(1):33–6.
40. Nayab M. A. Chaudhury, Gordon B. Proctor, Niclas G. Karlsson GHC and SAF. Reduced MUC7 Mucin Sialylation and Altered Saliva Rheology in Sjögren's Syndrome Associated Oral Dryness. *Mol Cell Proteomics*. 2015;12:1048–59.
41. Desai GS, Mathews ST. Saliva as a non-invasive diagnostic tool for inflammation and insulin-resistance. *World J Diabetes*. 2014;5(6):730–8.

42. Vijay A, Inui T, Dodds M, Proctor G, Carpenter G. Factors that influence the extensional rheological property of saliva. *PLoS One*. 2015;10(8):1–11.
43. Kawas S Al, Rahim ZH a, Ferguson DB. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch Oral Biol*. 2012;57(1):1–9.
44. Schulz BL, Cooper-White J, Punyadeera CK. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Crit Rev Biotechnol*. 2013;33(3):246–59.
45. Proctor GB, Carpenter GH. Salivary secretion: Mechanism and neural regulation. In: *Saliva: Secretion and Functions*. 2014. p. 14–29.
46. Nunes LAS, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: A systematic review. *Biochem Medica*. 2015;25(2):177–92.
47. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontology* 2000. 2016;70:11–25.
48. Giusti L, Baldini C, Bazzich L, Ciregia F, Tonazzini I, Mascia G, et al. Proteome analysis of whole saliva: A new tool for rheumatic diseases - The example of Sjögren's syndrome. In: *Proteomics*. 2007. p.1634–43.
49. Hu S, Wang J, Meijer J, Jeong S, Xie Y, Yu T, et al. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2007;56(11):3588–600.
50. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci*. 2016;55(2):182–96.
51. Khurshid Z, Zohaib S, Najeeb S, Zafar MS, Rehman R, Ur Rehman I. Advances of proteomic sciences in dentistry. *Int J Mol Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*; 2016;17: e728.
52. Bhattacharyya M, Ghosh S, Vishveshwara S. Protein Structure and Function: Looking through the Network of Side-Chain Interactions. *Curr Protein Pept Sci*. 2016;17(1):4–25.
53. Fan Y, Evans CR, Ling J. Rewiring Protein Synthesis: From Natural to Synthetic Amino Acids. *Biochim Biophys Acta*. 2017;in press.
54. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui ABT De, Tajara EH. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;58(3):366–75.
55. Amado FML, Ferreira RP, Vitorino R. One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. *Clin Biochem*. 2013;46(6):506–17.
56. Armirotti A, Damonte G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. *Proteomics*. 2010;10:3566–76.

57. Chen CH. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal Chim Acta*. 2008;624(1):16–36.
58. Cottrell JS. Protein identification using MS/MS data. *J Proteomics*. 2011;74(10):1842–51.
59. Gregorich ZR, Chang YH, Ge Y. Proteomics in heart failure: Top-down or bottom-up? Vol. 466, *Pflugers Archiv Eur J Physiol*. 2014;466: 1199–209.
60. Chen Y-B, Cutler CS. Biomarkers for acute GVHD: can we predict the unpredictable? *Bone Marrow Transplant*. 2012;48(6):755–60.
61. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(12):945–56.
62. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;694:72–7.
63. Hu S, Arellano M, Boonthueung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19):6246–52.
64. Jessie K, Pang WW, Rahim ZHA, Hashim OH. Proteomic analysis of whole human saliva detects enhanced expression of interleukin-1 receptor antagonist, thioredoxin and lipocalin-1 in cigarette smokers compared to non-smokers. *Int J Mol Sci*. 2010;11(11):4488–505.
65. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994;32:5–8.
66. Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”. Digestão Trípica e Preparo de Amostra Complexa para LC-MS. d:2–4. disponível em: <http://genfis40.esalq.usp.br>
67. Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”. User Guide For Reversed-Phase ZipTip C18, P10 - Millipore [Internet]. p. 2–5. disponível em: <http://genfis40.esalq.usp.br>
68. Afkarian M, Bhasin M, Dillon ST, Guerrero MC, Nelson RG, Knowler WC, et al. Optimizing a proteomics platform for urine biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(10):2195–204.
69. Yan W, Apweiler R, Balgley BM, Boonthueung P, Bundy JL, Cargile BJ, et al. Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics - Clin Appl*. 2009;3(1):116–34.
70. Mi H, Dong Q, Muruganujan A, Gaudet P, Lewis S, Thomas PD. PANTHER version 7: Improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res*. 2009;38(SUPPL.1):D204–10.

71. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene Ontology: Tool for The Unification of Biology. *Nat Genet.* 2000;25(1):25–9.
72. Engle S, Whalen S, Joshi A, Pollard KS. Unboxing cluster heatmaps. In: *BioVis.* 2016;18(suppl2):1442–6.
73. Key M. A tutorial in displaying mass spectrometry-based proteomic data using heat maps. *BMC Bioinformatics.* 2012;13(Suppl 16):S10.
74. Devic I, Shi M, Schubert MM, Lloid M, Izutsu KT, Pan C, et al. Proteomic Analysis of Saliva from Patients with Oral Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(7):1048–55.
75. De Bock M, Beguin Y, Leprince P, Willems E, Baron F, Deroyer C, et al. Comprehensive plasma profiling for the characterization of graft-versus-host disease biomarkers. *Talanta.* 2014;125:265–75.
76. Nagler RM, Nagler A. The effect of pilocarpine on salivary constituents in patients with chronic graft-versus-host disease. *Arch Oral Biol.* 2001;46(8):689–95.
77. Norhagen G, Engstrom PE, Bjorkstrand B, Hammarstrom L, Smith CI, Ringden O. Salivary and serum immunoglobulins in recipients of transplanted allogeneic and autologous bone marrow. *Bone Marrow Transpl.* 1994;14(2):229–34.
78. Murota A, Suzuki K, Kassai Y, Miyazaki T, Morita R, Kondo Y, et al. Serum proteomic analysis identifies interleukin 16 as a biomarker for clinical response during early treatment of rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2015;78:87–93.
79. Chiusolo P, Giammarco S, Fanali C, Bellesi S, Metafuni E, Sica S, et al. Salivary proteomic analysis and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(6):888–92.
80. Bassim CW, Ambatipudi KS, Mays JW, Edwards DA, Swatkoski S, Fassil H, et al. Quantitative salivary proteomic differences in oral chronic graft-versus-host disease. *J Clin Immunol.* 2012;32(6):1390–9.
81. Souza MM de, de Paula FM, Hsieh R, Macedo MCMA, Corral MA, Nunes TB, et al. Could mucin 16 and colony-stimulating factor 2-receptor beta possible graft versus host disease biomarkers? Medical hypotheses. *Med Hypotheses.* 2017;100:89–93.
82. Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NF- κ B dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(1):42–5.
83. Krapfenbauer K, Drucker E, Thurnher D. Identification of tumour-related proteins as potential screening markers by proteome analysis—protein profiles of human saliva as a predictive and prognostic tool. *EPMA J.* 2014;5(1):20.

84. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(2007):62–70.
85. Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, Sousa LP. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *J Immunol Res*. 2016;2016.
86. Chen L, Lv F, Pei L. Annexin 1: A glucocorticoid-inducible protein that modulates inflammatory pain. *Eur J Pain (United Kingdom)*. 2014;18(3):338–47.
87. Giese M, Turiello N, Molenda N, Palesch D, Meid A, Schroeder R, et al. Exogenous cathepsin G upregulates cell surface MHC class I molecules on immune and glioblastoma cells. *Oncotarget*. 2016;7(46):74602–11.
88. Penczek A, Sienczyk M, Wirtz CR, Burster T. Cell surface cathepsin G activity differs between human natural killer cell subsets. *Immunol Lett*. 2016;179:80–4.
89. Jung JW, Han SJ, Song MK, Kim T im, Kim EK, Min YH, et al. Tear Cytokines as Biomarkers for Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(12):2079–85.
90. Imanguli MM, Atkinson JC, Harvey KE, Hoehn GT, Ryu O, Wu T, et al. Changes in salivary proteome following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Exp Hematol*. 2007;35(2):1–16.
91. Sakamoto W, Fujii Y, Kanehira T, Asano K, Izumi H. A novel assay system for myeloperoxidase activity in whole saliva. *Clin Biochem*. 2008;41(7–8):584–90.
92. Hoy A, Tréguët D, Leininger-Muller B, Poirier O, Maurice M, Sass C, et al. Serum myeloperoxidase concentration in a healthy population: biological variations, familial resemblance and new genetic polymorphisms. *Eur J Hum Genet*. 2001;9(10):780–6.
93. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;108(12):1440–5.
94. Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. *J Periodontal Res*. 2009;44(5):636–44.
95. Yee VC, Pratt KP, Côté HC, Trong I Le, Chung DW, Davie EW, et al. Crystal structure of a 30 kDa C-terminal fragment from the gamma chain of human fibrinogen. *Structure*. 1997;5(1):125–38.
96. Li J, Liu X, Xiang Y, Ding X, Wang T, Liu Y, et al. Alpha-2-macroglobulin and heparin cofactor II and the vulnerability of carotid atherosclerotic plaques: An iTRAQ-based analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;483(3):964–71.

97. Smith A, McCulloh RJ. Hemopexin and haptoglobin: Allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. *Front Physiol.* 2015;6:187-207.
98. Ma Q, Li D, Carreño R, Patenia R, Tsai KY, Xydes-Smith M, et al. Complement component C3 mediates Th1/Th17 polarization in human T-cell activation and cutaneous GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(7):972–6.
99. Guo X, Hu J, Luo W, Luo Q, Guo J, Tian F, et al. Analysis of Sera of Recipients with Allograft Rejection Indicates That Keratin 1 Is the Target of Anti-Endothelial Antibodies. *J Immunol Res.* 2017;2017:8679841.
100. Rivarola De Gutierrez E, Innocenti A-C, Cippitelli M-J, Salomón S, Vargas-Roig L-M. Determination of cytokeratins 1, 13 and 14 in oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014;1191919(14):359–65.
101. Song EK, Yim JM, Yim JY, Song MY, Rho HW, Yim SK, et al. Rosiglitazone prevents graft-versus-host disease (GVHD). *Transpl Immunol.* 2012;27(2–3):128–37.
102. Lourenco SV, Sotto N, Vilela AC, Menta M, Nico S. Lupus erythematosus : clinical and histopathological study of oral manifestations and immuno-histochemical profile of epithelial maturation. *J Cutan Pathol.* 2006;657–62.