



ISADORA LUANA FLORES

**“POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA O CARCINOMA
ESPINOCELULAR ORAL IDENTIFICADOS POR
MICRODISSECÇÃO A LASER ASSOCIADA À PROTEÔMICA
BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS”**

PIRACICABA

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ISADORA LUANA FLORES

“Potenciais biomarcadores para o carcinoma espinocelular oral
identificados por microdissecção a laser associada à proteômica
baseada em espectrometria de massas”

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Franco Paes Leme

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
UNICAMP para obtenção do Título de Mestra
em Estomatopatologia na área de
Estomatologia.

Este exemplar corresponde à versão final
da Dissertação defendida pelo aluno, e
orientada pela Profa.Dra. Adriana Franco
Paes Leme

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

F663p Flores, Isadora Luana, 1984-
Potenciais biomarcadores para o carcinoma espinocelular oral identificados por microdissecção a laser associada à proteômica baseada em espectrometria de massas / Isadora Luana Flores. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Adriana Franco Paes Leme.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Neoplasias bucais. 2. Proteoma. 3. Marcadores biológicos.
I. Leme, Adriana Franco Paes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma identified by laser microdissection associated with proteomics based on mass spectrometry

Palavras-chave em Inglês:

Mouth neoplasms

Proteome

Biological markers

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Mestra em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Adriana Franco Paes Leme [Orientador]

Adriana Etges

Márcio Ajudarte Lopes

Data da defesa: 26-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata ISADORA LUANA FLORES aprovada.

A handwritten signature in blue ink, reading "Adriana Franco Paes Leme".

Profa. Dra. ADRIANA FRANCO PAES LEME

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized letter 'A'.

Profa. Dra. ADRIANA ETGES

A handwritten signature in blue ink, reading "Marcio Ajudarte Lopes".

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **José Carlos e Maria Edi**, pelo apoio incondicional às minhas escolhas e por todo amor e confiança sempre dedicados a mim.*

*Ao meu irmão, **Robinson**, por sempre me incentivar a buscar os meus sonhos.*

*Ao meu sobrinho e irmão, **Franklin**, pela oportunidade de ter crescido ao seu lado e pelas melhores lembranças da minha infância.*

*À minha irmã, **Débora**, por ter me dado um dos melhores presentes da minha vida.*

*De forma muito especial, ao grande amor da minha vida, **Thiago**, pela paciência e dedicação incondicionais, pelo exemplo de bondade, companheirismo e pelo amor puro e verdadeiro sempre dedicado a mim.*

*A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na
concretização deste trabalho.*

A **Professora Dr^a. Adriana Franco Paes Leme**, agradeço não somente pela grande oportunidade de ter sido sua orientada e pela amizade construída, mas principalmente, pelo exímio exemplo de humildade, sabedoria e dedicação diária à ciência.

Ao **Professor Dr. Ricardo Della Coletta**, agradeço não somente pela disponibilidade incondicional e pela paciência com que sempre me recebeu, mas principalmente, pela amizade construída, pelo exemplo de competência, versatilidade e dedicação ao crescimento intelectual de seus alunos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me fortalecer nos momentos mais difíceis e guiar-me pelos caminhos incertos;

Aos meus pais, **José Carlos e Maria Edi**, por abdicarem muitas vezes de seus desejos em prol dos meus anseios;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**;

À **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao **Prof. Dr. Alan Roger Santos Silva** coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela disponibilidade com que sempre me recebeu;

Aos Profs. Drs. **Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Agustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Oslei Paes de Almeida e Alan Roger Santos Silva**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo exemplo de dedicação a docência;

Ao professor Dr. **Márcio Ajudarte Lopes**, não somente pelos ensinamentos valiosos e pelas oportunidades a mim concedidas, mas principalmente, pela preocupação com a minha formação e exímio exemplo de docente e Estomatopatologista;

À professora Dr^a. **Adriana Etges** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, não somente por ter sido minha orientadora e ter me guiado nas fases iniciais da minha formação acadêmica, mas principalmente, pela amizade construída, pelo exemplo de amor à docência, pela competência como Estomatopatologista e por ter me dado à oportunidade de descobrir a minha verdadeira vocação;

Às prof^{as} Dr^{as}. **Lenita Araújo, Ana Paula Neutzling e Sandra Tarquínio** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, não somente pela preocupação com o meu aprendizado e pelo carinho com que sempre me receberam, mas principalmente, pela amizade e pelo exemplo de competência como Estomatopatologistas;

À minha amiga de infância, **Cristiane Klein**, pela nossa sincera amizade desde os tempos de pré-escola e por toda confiança sempre depositada em mim;

Às amigas, **Andréia Bufalino, Karen Graner, Luciana e Sabrina** e aos amigos, **Bruno e Lucas**, pelo carinho e compreensão nos momentos de angústia e pelo apoio e incentivo em momentos de incerteza;

Às amigas, **Andréia Bufalino, Débora, Luciana, Michelle e Rose** por me acolherem no laboratório e me ensinarem com carinho e sem medir esforços muitos dos conhecimentos necessários para a realização deste trabalho;

À amiga **Cristiane Salmon** pela paciência, disponibilidade e auxílio na realização das etapas iniciais deste trabalho;

À amiga **Nádia Masson** pela amizade construída, pelos momentos de alegria compartilhados e pela sua imensa disponibilidade em me ajudar;

Às amigas do laboratório **Ana Camila, Andréia Bufalino, Andréia Silva, Camilla, Débora, Elizabeth, Fabiana, Luciana, Michelle, Manoela, Priscila, Rose e Sibebe**, pelo carinho e pela convivência agradável e harmoniosa;

Aos amigos de pós-graduação **Alicia, Ana Lúcia, Bruno, Daniel, Felipe, Fernanda Mariano, Fernanda Moreira, Harim, José Laurentino, Juscelino, Karina, Katya, Lara, Lucas, Marcondes, Marianne, Marisol, Nathalia, Patrícia, Rodrigo, Rogério, Sabrina, Sabino, Victor, Wagner e Wilfredo**, pelos conhecimentos e momentos de descontração compartilhados;

Aos funcionários do laboratório de patologia, **Fabiana, Geovania, e João Carlos**, pela gentileza e colaboração;

A secretária do departamento de diagnóstico oral, **Luana**, pela atenção e carinho com que sempre me recebeu;

Às técnicas do Laboratório de Espectrometria de massas, **Bianca, Romênia e Sami**, pela amizade, disponibilidade e auxílio direto na realização de etapas importantes da metodologia deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Espectrometria de Massas, **Annelize, Daniela, Fernando, Frederico e Rebeca**, pela afabilidade com que sempre me receberam;

De forma especial, às amigas, **Dani e Rebeca** e ao amigo, **Rafael Canevarolo**, do Laboratório de Espectrometria de Massas por terem contribuído para o enriquecimento deste trabalho.

Aos grandes amigos do Orocentro, **Bete, Cida, Dani, Érika, Jeane, Rogério Elias e Valéria** pela amizade construída e pelos inúmeros momentos de alegria compartilhados.

Muito Obrigada...

EPÍGRAFE

“O homem é do tamanho do seu sonho.”

Fernando Pessoa

O carcinoma espinocelular oral (CEC oral) é a neoplasia maligna de cabeça e pescoço mais frequente e com grande morbidade. As melhorias nos protocolos terapêuticos não têm sido associadas com a melhora no prognóstico dos pacientes nas últimas décadas. Além disso, a taxa de descoberta de biomarcadores com utilização clínica de rotina ainda é um desafio para a grande maioria dos cânceres, inclusive para o CEC oral. Neste cenário, a associação da microdissecção a laser (ML) a espectrometria de massas (MS) tem sido considerada uma abordagem com alta robustez na descoberta de biomarcadores para o câncer. Diante disso, o objetivo deste estudo foi identificar potenciais biomarcadores para o CEC oral através da associação da ML a MS além de buscar possíveis mecanismos biológicos associados aos principais biomarcadores identificados com auxílio de ferramentas de bioinformática. Para isso, 10 pares de amostras teciduais frescas de CEC oral e mucosa oral normal foram obtidos para isolamento por ML para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) seguida por análises de bioinformática. Foram identificadas 2529 proteínas e entre essas, 107 proteínas apresentaram maior expressão nas amostras de CEC oral comparadas com a mucosa oral normal (teste *t* Student não-pareado, $p < 0,05$ e razão $> 1,5$). Os dados também foram submetidos às análises multivariadas pelos modelos *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) e *Support Vector Machine* (SVM) que indicaram, respectivamente, um painel de 40 e 70 potenciais biomarcadores. No geral, as análises pelo *Ingenuity*, KEGG (banco de dados Enciclopédia Kyoto para genes e genomas) e Gene Ontology mostraram que os processos mais significantes foram relacionados à sinalização célula-célula, a replicação do DNA, a recombinação e ao reparo, a adesão focal, a regulação do citoesqueleto de actina e a interação do receptor da matriz extracelular, entre outras. O fator eucariótico de alongação delta 1 (EEF1D) foi a proteína indicada para validação

por ter apresentado reprodutibilidade de expressão entre as amostras de CEC oral, alta significância estatística segundo o teste t Student, expressão aumentada em CEC oral, por ter sido indicada como um marcador de classe na análise por PLS-DA e porque a sua função biológica ainda não foi investigada para esta neoplasia. Os resultados dos ensaios de validação confirmaram uma maior expressão de EEF1D por western blot utilizando-se células SCC-9 e tecido tumoral originado de modelo ortotópico. Além disso, uma intensidade de marcação maior para EEF1D foi observada em CEC oral pela validação por imunohistoquímica (IHQ). Portanto, esse estudo combinou técnicas de ML, MS e bioinformática para a identificação de potenciais biomarcadores sendo que a proteína EEF1D foi considerada um potencial biomarcador para o CEC oral e validada por WB e IHQ podendo futuramente ser indicada também para validação em estudos translacionais.

Palavras chave: carcinoma espinocelular oral / microdissecção a laser / espectrometria de massas / biomarcadores

The oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignant head and neck with more frequency of occurrence and with greater morbidity. Improvements in treatment protocols have not been associated with improved prognosis of patients in recent decades. Furthermore, the rate of discovery of biomarkers with clinical routine use is still a challenge for the large majority of cancers, including OSCC. In this scenario, the combination of laser microdissection (LM) and mass spectrometry (MS) has been considered an approach with high robustness to biomarker discovery for cancer. Thus, the aim of this study was to identify potential biomarkers for OSCC through the association of the LM, MS and bioinformatics aiming at exploring biological mechanisms associated with major candidate biomarkers identified. For this, 10 pairs of fresh tissue samples of OSCC and normal oral mucosa were obtained for isolation by LM for analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and bioinformatic analysis. 2529 proteins were identified and among these, 107 proteins have higher expression in oral SCC samples compared with normal oral mucosa (unpaired Student's t test, $p < 0.05$ and ratio > 1.5). The data were also submitted to multivariate models by Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) and Support Vector Machine (SVM) that, respectively, indicated a panel of 40 and 70 potential biomarkers. Overall, the Ingenuity analysis, KEGG (Kyoto Encyclopedia database for genes and genomes) and Gene Ontology showed that the most significant processes were related to cell-cell signaling, DNA replication, recombination and repair, adhesion focal, regulation of actin cytoskeleton and the interaction of the receptor extracellular matrix. The eukaryotic elongation factor 1 delta (EEF1D) was the protein indicated to validation because presented reproducibility of expression between OSCC samples, high statistical significance according to the Student t test, increased expression in OSCC, having been appointed as a class marker analysis for PLS-DA and because its biological

function has not yet been investigated for this cancer. The higher expression of EEF1D was confirmed by western blot using proteins extracted from SCC-9 cells and tumor tissue originated from orthotopic model. Moreover, a higher marking intensity was observed in EEF1D for OSCC for validation by immunohistochemistry (IHC). Therefore, this study combined techniques ML, MS, and bioinformatics to identify potential biomarkers and EEF1D was the protein identified as a potential biomarker for OSCC and validated by WB and IHC and may also be indicated for validation in future translational studies.

Key words: Oral squamous cell carcinoma / laser microdissection / mass spectrometry / biomarkers

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTN1: Alfa-actinina 1

AKT: Proteína quinase B (PKB)

ASCO: *American Society of Clinical Oncology*

ATCC: *American Type Culture Collection*

CCE: Carcinoma de células escamosas

CCDN1: Ciclina D1

CCP: Câncer de cabeça e pescoço

CDK: Quinases dependentes de ciclina

cDNA: DNA complementar

CEC: Carcinoma espinocelular

CID: Dissociação induzida por colisão

CNPEM: Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais

DAB: 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloro

DAVID: *Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMEM-F12: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium e Ham's F-12 Nutrient Mixture*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EEF1: Fator eucariótico de alongação 1

EEF1D: Fator eucariótico de alongação delta 1

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico

ELISA: Ensaio de imunabsorbância ligado à enzima

ERK: Quinases reguladores de sinais extracelulares

ESI-MS/MS: Espectrômetro de massas acoplado a fonte de ionização por eletrospray

FBS: Soro fetal bovino

FDA: *U.S. Food and Drug Administration*

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GO: Gene Ontology

GTP: 5'-trifosfato de guanosina

Gy: Gray

HGK: *Normal Human Gengival Keratinocyte*

HSC-3: *Human oral squamous cell carcinoma*

IHQ: Imuno-histoquímica

IPA: *Interactive Pathway Analysis of complex'omics data*

IPI: *International Protein Index*

IR: Infravermelho

ITGB1: Integrina beta 1

ITGB4: Integrina beta 4

ITGA6: Integrina alfa 6

iTRAQ: Isóbaros para quantificação relativa e absoluta

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem

kDa: Kilodalton

KEGG: Enciclopédia Kyoto para Genes e Genomas

KGM: *Keratinocyte Growth Medium*

LN BIO: Laboratório Nacional de Biociências

MALDI-TOF: Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MAPK: Proteína quinase ativadora de mitose

MEC: Matriz extracelular

ML: Microdissecção a laser

MML: Microscópio de microdissecção a laser

MMP: Metaloproteinase de matriz

mRNA: RNA mensageiro

MS: Espectrometria de massas

MYH9: Miosina 9

m/z: Razão massa/carga

NFkB: Fator nuclear cadeia leve kappa intensificador de células B ativadas

nm: Nanômetro

nLC: Nano cromatógrafo

O.C.T: Optimal Cutting Temperature

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PI3K: Fosfatidilinositol - 3 - quinase

PLS-DA: *Partial Least Squares Discriminant Analysis*

ppm: Partes por milhão

P16: Proteína p16

P38 MAPK: Proteína quinase ativadora de mitose 38 delta

P53: Proteína p53

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RAF: RAF proteína quinase serina/treonina

RAS: *Rat Sarcoma virus*

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: Rotações por minuto

SCC: *Squamous cell carcinoma*

SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida

SILAC: Isótopo estável em aminoácidos para células em cultura

SVM: Support Vector Machine

TMT: *Tandem mass tag*

TNF- β : Fator de necrose tumoral beta

tRNA: RNA transportador

UV: Ultravioleta

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VIP: Variável de importância em projeção

WB: Western Blot

XIC: Cromatograma de íons extraídos

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Epidemiologia do câncer bucal	3
2.2. Fatores de risco para o câncer bucal	4
2.3. Patogênese do câncer bucal	4
2.4. Diagnóstico, fatores prognósticos e sistema TNM para o câncer bucal	6
2.5. Características clínicas e histopatológicas do câncer bucal	7
2.6. Abordagens terapêuticas para o câncer bucal e complicações orais do tratamento antineoplásico	8
2.7. Desafios na abordagem do câncer bucal	9
2.8. A espectrometria de massas como ferramenta proteômica na identificação de biomarcadores	10
2.9. Associação da espectrometria de massas a ferramentas não proteômicas	16
2.10. Busca por biomarcadores para o câncer identificados pela proteômica	16
2.11. Potenciais biomarcadores para os cânceres de cabeça e pescoço identificados pela proteômica baseada na espectrometria de massas	23
2.12. A complexidade do CEC oral e a importância da proteômica clínica	27
3. PROPOSIÇÃO	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e TCLE	33
4.2. Coleta das amostras teciduais	33
4.3. Seleção de amostras do arquivo	34
4.4. Perfil da amostra de pacientes com CEC oral	35

4.5. Preparo das amostras teciduais e corte congelado	35
4.6. Preparo das lâminas para microdissecção a laser	36
4.7. Microdissecção a laser das amostras teciduais	37
4.8. Preparação das amostras teciduais para MS	39
4.9. Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)	40
4.10. Análise dos dados brutos	40
4.11. Análise estatística e bioinformática	41
4.12. Validação	43
4.12.1. Cultura de células	43
4.12.2. Modelo animal	46
4.12.3. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR)	47
4.12.3.1. Extração de RNA total	47
4.12.3.2. Análise da Concentração e Integridade do RNA	47
4.12.3.3. Síntese dos cDNAs	48
4.12.3.4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)	49
4.12.4 Western Blot	50
4.12.5. Imuno-histoquímica	52
4.12.6. Análise estatística	53
5. RESULTADOS	55
5.1. Análise proteômica baseada em espectrometria de massas associada à microdissecção a laser	55
5.1.1. Identificação de potenciais biomarcadores para o CEC oral por MS	55
5.1.2. Segregação de potenciais biomarcadores para o CE oral através da análise multivariada por PLS-DA e SVM	55
5.1.3. Construção de <i>Heat Map</i>	63

5.1.4. Busca de redes biológicas e funcionalidade dos marcadores através do <i>Ingenuity</i>	64
5.1.5. Enriquecimento de vias para o CEC oral através da ferramenta de classificação funcional <i>DAVID</i>	67
5.2. Validação	70
5.2.1. Resultado da expressão de mRNA por qRT-PCR	70
5.2.2. Resultados da análise por Western Blot	70
5.2.3. Resultado das reações de imuno-histoquímica	73
6. DISCUSSÃO	77
6.1. A eficiência da associação da microdissecção a laser, espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática na descoberta de potenciais biomarcadores para o CEC oral	77
6.2. A potencialidade do fator eucariótico de alongação delta 1 como biomarcador para o CEC oral	96
6.3. Outros potenciais biomarcadores relacionados ao CEC oral e suas possíveis funções biológicas	99
7. CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	105
ANEXOS	141
ANEXO 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana	141
Anexo 2: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal	142
ANEXO 3: Tabela Suplementar 1	143
ANEXO 4: Tabela Suplementar 2	148

1. INTRODUÇÃO

O CEC oral é a neoplasia maligna de cabeça e pescoço mais prevalente apresentando-se ainda com altas taxas de mortalidade e de morbidade mesmo diante dos significativos avanços nos protocolos terapêuticos alcançados nas últimas décadas (Alam *et al.*, 2012). Somando-se a isso, os fatores prognósticos atualmente utilizados são subjetivos e relativamente inconfiáveis devido à natureza heterogênea do tumor e a resposta variável à terapia (Shiptzer *et al.*, 2009). Também cabe salientar que o CEC oral apresenta uma grande heterogeneidade celular e molecular e um grande número de genes e produtos proteicos estão potencialmente envolvidos na carcinogênese oral (Shah *et al.*, 2011). Logo, a busca por marcadores biológicos se faz necessária tanto para o melhor entendimento da natureza molecular quanto para o entendimento da diversidade de comportamento biológico desta neoplasia (Shiptzer *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2011) e para o desenvolvimento de potenciais ferramentas diagnósticas e prognósticas auxiliares para uso clínico (Messadi *et al.*, 2009). Nos últimos anos, inúmeras metodologias proteômicas têm emergido possibilitando a observação do conjunto de proteínas expressas e contribuindo para o entendimento dos mecanismos e possíveis vias moleculares direta e indiretamente relacionados com o CEC oral (He *et al.*, 2004; Turhani *et al.*, 2006; Lo *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Entre as abordagens proteômicas mais modernas, a proteômica baseada na espectrometria de massas (MS) tem sido amplamente utilizada para descoberta de proteínas diferencialmente expressas em diferentes tipos de cânceres a partir de diversos tipos de amostras, desde linhagens celulares, tecido, saliva e sangue a fim de identificar potenciais biomarcadores (Schaaij-Visser *et al.*, 2010). Além disso, a MS tem demonstrado ser uma tecnologia em desenvolvimento, tanto para análises qualitativas e quantitativas de proteínas, localização subcelular e interações proteicas, sendo que recentes avanços nesta área vem gerando enorme impacto sobre o rendimento e a

abrangência da proteômica nos estudos sobre o câncer (Matta *et al.*, 2009). Entretanto, mais importante que a identificação de proteínas de maneira isolada é a identificação de alterações em um conjunto de proteínas que podem contribuir para traçar um perfil de expressão proteica específico para uma determinada neoplasia (do inglês “*protein expression signature*”) (Schaij-Visser *et al.*, 2010, Borrebaeck, 2012). Tal abordagem pode abrir caminho para desvendar redes e vias celulares desreguladas em tumores humanos (Matta *et al.*, 2009) visando extrapolar do campo da proteômica voltada somente para a ciência para o campo da proteômica voltada para a clínica. Apesar de inúmeros estudos de proteômica baseada em MS já terem identificado uma série de marcadores para o CEC oral, poucos estudos correlacionam o papel biológico e possíveis vias e funcionalidade das proteínas através da utilização de ferramentas de bioinformática. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi identificar a expressão proteica diferencial no CEC oral e buscar por um painel de potenciais biomarcadores que podem ser correlacionados ao desenvolvimento de CEC. Para isso, foi utilizado a MS associada à microdissecção a laser (ML) e ferramentas de bioinformática para buscar tais moléculas potenciais em amostras teciduais de pacientes com CEC oral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia do câncer bucal

O câncer bucal ou carcinoma espinocelular oral (CEC oral) é a sexta malignidade mais frequente (Alam *et al.*, 2012; Deboni *et al.*, 2012) e a neoplasia maligna de cabeça e pescoço mais comum com uma estimativa de incidência de 275 mil novos casos/ano (Warnakulasuriya, 2009) que representam aproximadamente 3% de todos os novos casos de câncer diagnosticados (Reid *et al.*, 2000; Parkin *et al.*, 2005; Scully & Bagan, 2009). No Brasil, apresenta-se como a quinta e a décima primeira neoplasia maligna, respectivamente, em homens e mulheres com uma média 15.000 mil novos casos/ano (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2012) o que corresponde a maior incidência de câncer bucal entre os países da América Latina (Warnakulasuriya, 2009). Além disso, esta neoplasia apresenta-se como uma importante causa de mortalidade e morbidade sendo considerada um problema de saúde pública, especialmente, em países em desenvolvimento como o Brasil (Jefferies & Foulkes, 2001; Parkin *et al.*, 2005; Vargas-Ferreira *et al.*, 2012). Histologicamente, o carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo mais frequente correspondendo a mais de 90% de todos os cânceres da cavidade bucal (Coleman & Sultan, 1999; Beenken & Urist, 2003; OMS, 2008) e entre as localizações de mais alto risco para o desenvolvimento do CEC oral estão o lábio inferior, as margens póstero-laterais e a base de língua e o assoalho bucal (Hoffmannová *et al.*, 2010; Dragomir *et al.*, 2012). O perfil clássico de pacientes com CEC oral é de homens, entre a sexta e sétima década de vida, fumantes e etilistas por muitos anos (Sturgis & Cinciripini, 2007; Petti, 2009; Vargas-Ferreira *et al.*, 2012). Entretanto, um aumento no número de casos de CEC oral em pacientes jovens, do sexo feminino e com associação limitada aos fatores de risco tradicionais tem sido observado nos últimos anos (Santos-Silva *et al.*, 2011). A inclusão deste novo perfil de pacientes

vem gerando um impacto significativo sobre a epidemiologia do CEC oral no que diz respeito a possíveis, mas ainda não confirmados, novos fatores de risco e a associação entre o desenvolvimento dessas neoplasias com uma possível predisposição ou instabilidade genética (Westra, 2009; Santos-Silva *et al.*, 2011).

2.2. Fatores de risco para o câncer bucal

O tabaco e o álcool são os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CEC do interior da cavidade oral (Scully *et al.*, 2000; Das & Nagpal, 2002; Hoffmannová *et al.*, 2010) sendo que o consumo de tabaco e álcool é dose/dependente e tempo/dependente e a combinação desses dois fatores aumenta significativamente o risco para o desenvolvimento desse tumor (Brown *et al.*, 2012). Além disso, os indivíduos fumantes e etilistas apresentam um risco 20 vezes maior para o desenvolvimento de recidivas ou segundos tumores primários na cavidade bucal ou no trato aerodigestivo quando comparados aos indivíduos não fumantes e não etilistas, especialmente, quando mantêm o consumo de tabaco e álcool após o diagnóstico do tumor primário (Carvalho *et al.*, 2004; Leston & Dios, 2010). Nos casos de CEC do lábio inferior, a exposição crônica à radiação ultravioleta é o principal fator associado (Vieira *et al.*, 2012). Outros fatores de risco vêm sendo investigados, tais como, a desnutrição geral (McDowell, 2006), o baixo nível socioeconômico, uma higiene oral precária (Hoffmannová *et al.*, 2010; Carnelio *et al.*, 2011) e, mais atualmente, o papiloma vírus humano (Feller *et al.*, 2010; Gogilashvili *et al.*, 2012). Entretanto, tais fatores ainda não podem ser considerados fatores de risco para o CEC oral como os tradicionais e já citados previamente.

2.3. Patogênese do câncer bucal

As lesões de CEC oral podem se desenvolver a partir da mucosa oral aparentemente normal e não estarem associadas à presença de uma lesão prévia

no local do tumor ou podem surgir, segundo Shah *et al.*, 2011, através de uma série de estágios histopatológicos de uma hiperplasia benigna a displasia epitelial para carcinoma *in situ* e deste para o carcinoma francamente invasivo (Figura 1). Essa evolução histopatológica pode ser observada clinicamente pela presença de lesões potencialmente malignas antes do surgimento do CEC oral.

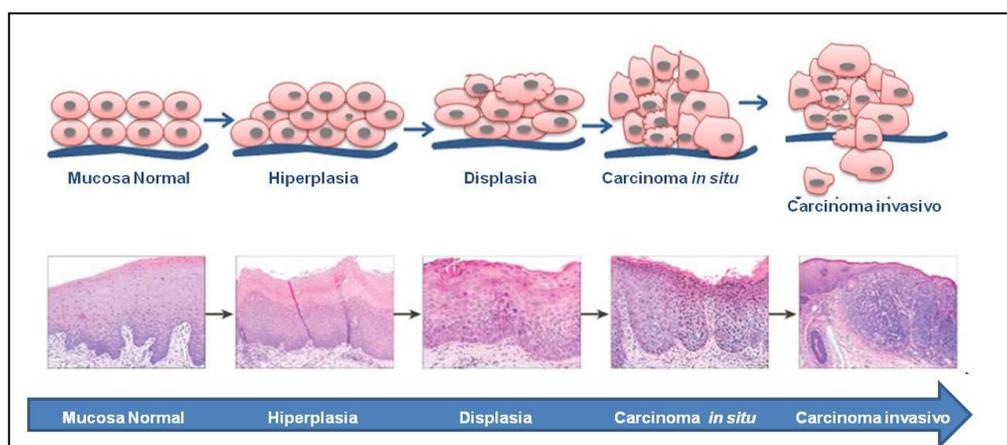


Figura 1 - Estágios de progressão do câncer bucal. (Adaptado de Shah *et al.*, 2011)

Entre as lesões potencialmente malignas mais importantes e para o CEC do interior da cavidade oral, estão a leucoplasia e a eritroplasia. Para o CEC de lábio inferior a queilite actínica apresenta-se como lesão potencialmente maligna para esse sítio anatômico. Tais lesões têm sido documentadas em associação ou precedendo as lesões de CEC oral (Kujan *et al.*, 2006; Fortuna & Mignogna, 2011) (Figura 2) e apresentam um risco aumentado de transformação carcinomatosa quando comparadas a mucosa normal devido à presença de alterações histopatológicas (atipias celulares) similares às observadas nos carcinomas francamente invasivos (Eversole, 2009). Além disso, o aumento progressivo na taxa de transformação carcinomatosa está diretamente relacionado com a severidade da alteração displásica do epitélio o qual varia de acordo com tipo específico de lesão potencialmente maligna (Kujan *et al.*, 2006).

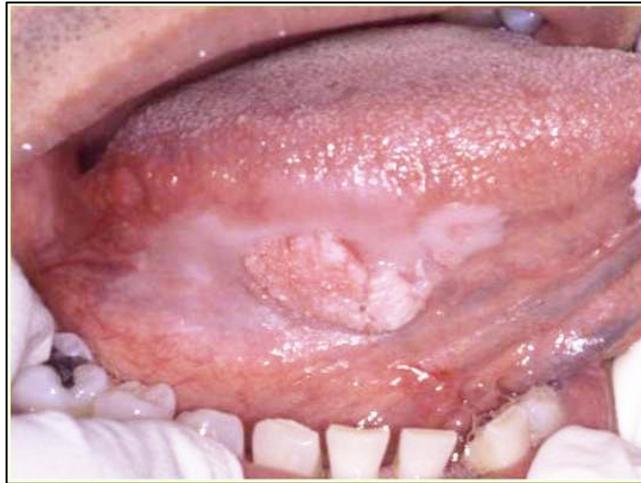


Figura 2 - Leucoplasia extensa associada à área de crescimento exofítico central em borda lateral direita de língua. (Orocentro-FOP/UNICAMP)

2.4. Diagnóstico, fatores prognósticos e sistema TNM para o câncer bucal

O CEC oral é uma lesão que apresenta um curso clínico altamente variável no qual o atraso no diagnóstico contribui para o crescimento e disseminação tumoral e, conseqüentemente, piora no prognóstico do paciente gerando uma taxa de sobrevida global entre 50-60% em 5 anos (Scully & Bagan, 2009; Warnakulasuriya, 2009; Shah *et al.*, 2011, Bitu *et al.*, 2012). Com relação ao prognóstico para o CEC oral, muitos fatores têm sido investigados nas últimas décadas com resultados variáveis (Bello *et al.*, 2010) e alguns exemplos podem ser mencionados, tais como a espessura do tumor (Huang *et al.*, 2009), a classificação histológica (Woolgar *et al.*, 2009), a profundidade de invasão ou de propagação extracapsular e a invasão vascular perineural (Genden *et al.*, 2010). Entretanto, o sistema de estadiamento TNM (tamanho do tumor, presença de linfonodo positivo e presença de metástase à distância) ainda é o principal marcador de prognóstico usado para o CEC oral apesar de seu valor limitado, tendo em vista que muitos pacientes com o mesmo estágio da doença podem apresentar uma evolução clínica e tempo de sobrevida distintos (Bitu *et al.*, 2012). Portanto, a pesquisa por melhores marcadores prognósticos é necessária, pois

pode refletir melhor a diversidade biológica da doença (Bitu *et al.*, 2012, Polachini *et al.*, 2012).

2.5. Características clínicas e histopatológicas do câncer bucal

Clinicamente, a lesão mais comumente encontrada no momento do diagnóstico é uma lesão ulcerada assintomática de curso crônico com bordas elevadas e áreas de necrose central (Pontes *et al.*, 2012) (Figura 3). Histologicamente, segundo a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde – OMS, 2005, o CEC oral surge a partir de um epitélio de superfície displásico em que a ceratinização de células epiteliais escamosas com a formação variável de “pérolas” de ceratina associados a um padrão de crescimento invasivo são pré-requisitos para a gradação desses tumores. Os tumores bem diferenciados apresentam grandes ceratinócitos que lembram o epitélio escamoso normal e produzem abundante ceratina, pouca atipia celular e escassa atividade mitótica. Os tumores moderadamente diferenciados geralmente apresentam menos ceratinização e distinto pleomorfismo nuclear com maior atividade mitótica e mitoses aberrantes e, por fim, o CEC oral pobremente diferenciado apresenta predominantemente células imaturas com numerosas mitoses aberrantes e mínima ceratinização (Cardesa *et al.*, 2005). Além disso, o padrão de crescimento expansivo do CEC bem diferenciado a moderadamente diferenciado é caracterizado por grandes ilhas de epitélio neoplásico com margens bem definidas e dispersas no tecido conjuntivo e estes tumores estão associados a melhores prognósticos. Em contrapartida, o padrão de crescimento infiltrativo do CEC oral pobremente diferenciado é caracterizado por pequenos e dispersos cordões ou células tumorais com margens irregulares e pobremente definidas e estão associados com um curso clínico mais agressivo e piores prognósticos (Cardesa *et al.*, 2005; Kademani *et al.*, 2005; Cardesa & Nadal, 2011). Brandwein-Gensler *et al.* (2005) propuseram outro sistema de gradação para o CEC oral que leva em consideração aspectos histológicos como o padrão de invasão tumoral e a

presença de invasão perineural e infiltrado linfocítico para classificar os tumores em 3 categorias de risco (baixo, intermediário ou alto grau) relacionadas com recidiva local, sobrevida global e indicação para tratamentos adjuvantes (Genden *et al.*, 2010).



Figura 3 - Paciente com lesão ulcerada de CEC oral em borda lateral esquerda de língua. (Orocentro/FOP-UNICAMP)

2.6. Abordagens terapêuticas para o câncer bucal e complicações orais do tratamento antineoplásico

Atualmente, a terapia para o CEC oral é baseada em três modalidades: cirúrgica, radioterápica e quimioterápica (Deboni *et al.*, 2012) sendo que a decisão sobre uma modalidade ou a combinação delas depende de cada caso específico. A ressecção cirúrgica do tumor primário com finalidade curativa é um dos principais protocolos de tratamento para os pacientes com CEC operáveis (Wolff *et al.*, 2012). Além disso, o manejo da doença metastática cervical é considerado um dos mais importantes aspectos do tratamento desta neoplasia no qual os pacientes podem ser submetidos ao esvaziamento cervical eletivo (quando não há metástase evidente) ou terapêutico (na presença de metástase regional) (Alam *et al.*, 2012; Wolff *et al.*, 2012). No caso da radioterapia (RT), o principal desafio é controlar o tumor com o mínimo de dano aos tecidos normais adjacentes. Para

isso, a RT de intensidade modulada tem demonstrado redução na frequência e na gravidade desses danos (Wolff *et al.*, 2012). Convencionalmente, cinco frações de 1,8 a 2 grays (Gy) 5 dias por semana, durante 6,5 a 7 semanas, com uma dose total de 66 a 70 Gy é direcionada sob o sítio primário do tumor (região cervicofacial do tumor) e sobre a fossa supraclavicular (Zackrisson *et al.*, 2003, Wolff *et al.*, 2012). Protocolos quimioterápicos em combinação com regimes radioterápicos são indicados para pacientes em estágios mais avançados e têm demonstrado melhora no controle local da doença e no prognóstico dos pacientes. Esta combinação de tratamento pode ser realizada como uma terapia neoadjuvante para reduzir o volume do tumor, como adjuvante da cirurgia ou quando não se opta pela cirurgia (Hino *et al.*, 2011). Os fármacos convencionalmente mais utilizados são o metotrexato, a carboplatina, a cisplatina, o 5-fluorouracil, o paclitaxel e o docetaxel (Specenier & Vermorken, 2010; da Silva *et al.*, 2012) sendo que a combinação de mais de um agente é utilizada a fim de diminuir o risco de seleção de subpopulações celulares resistentes (da Silva *et al.*, 2012). Entretanto, cabe salientar que o tratamento cirúrgico é muitas vezes desfigurante e que os tratamentos quimio e/ou radioterápicos ocasionam complicações orais aos pacientes que podem ser agudas e desenvolver-se durante a terapia com um curso transitório e resolução após o tratamento, tais como a mucosite, a xerostomia, a disgeusia, a candidose e a radiodermite (Mosel *et al.*, 2011) ou surgirem após a conclusão do tratamento, como as cáries relacionadas à xerostomia, o trismo, a fibrose e a atrofia da mucosa, a necrose dos tecidos moles e a osteorradionecrose. Além disso, muitas complicações agudas podem persistir e se tornarem tardias gerando morbidade significativa aos pacientes como é o caso da xerostomia e das alterações do paladar (disgeusia) (Chua *et al.*, 2007; Dirix *et al.*, 2009; Deboni *et al.*, 2012).

2.7. Desafios na abordagem do câncer bucal

Atualmente, as modalidades terapêuticas para pacientes com CEC oral ainda são baseadas na predição de índices de estadiamento clínico e os atuais protocolos falham na estratificação adequada de pacientes com alto risco de recidivas locais. Conseqüentemente, de 10-30% dos pacientes desenvolvem recidivas mesmo após a ressecção cirúrgica com margens histopatologicamente livres de neoplasia (Tabor *et al.*, 2001; Sepiashvili *et al.*, 2012). Além disso, os fatores prognósticos atualmente utilizados são subjetivos e relativamente inconfiáveis devido à natureza heterogênea do tumor e a resposta variável à terapia (Shiptzer *et al.*, 2009). Diante disso, a busca por marcadores biológicos se faz necessária tanto para o entendimento da natureza molecular e do comportamento agressivo do CEC oral (Shiptzer *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2011) quanto para o desenvolvimento de potenciais ferramentas diagnósticas e prognósticas auxiliares para uso clínico (Messadi *et al.*, 2009).

2.8. A espectrometria de massas como ferramenta na identificação de biomarcadores

Biomarcadores tumorais podem ser representados por DNA, mRNA, proteínas, peptídeos, mas também por carboidratos, ou pequenas moléculas, como os metabolitos e outras moléculas celulares (Sidransky, 2002). Além disso, um biomarcador pode ser uma única molécula ou uma combinação de várias moléculas e, idealmente, deve permitir análises fáceis e confiáveis e demonstrar alta sensibilidade analítica e especificidade (Kulasingam & Diamandis, 2008). Atualmente, a alta sensibilidade na detecção do perfil de expressão de proteínas diferenciais, modificações protéicas e interações proteína-proteína com a possibilidade de utilização efetiva faz da proteômica um campo emergente (Mann, 2006; Liang *et al.*, 2009). Além disso, as metodologias da proteômica são consideradas, muitas vezes, mais vantajosas em relação às metodologias da genômica para a detecção de biomarcadores para o câncer e metas para terapias moleculares (Indovina *et al.*, 2012). Isso se deve ao fato que os perfis de proteínas

podem representar com mais precisão o estado de uma doença, pois a maioria das funções biológicas são realizadas por proteínas (Stroncek *et al.*, 2005). Inversamente, alterações na expressão de um gene nem sempre tem consequências funcionais evidentes e pode não refletir a expressão da proteína ou da atividade da mesma devido a uma vasta gama de possíveis modificações pós-traducionais (Sung & Cho, 2008). Entre as inúmeras ferramentas proteômicas, a espectrometria de massas (MS) é a mais importante apresentando-se como uma tecnologia em rápido desenvolvimento, tanto para análises qualitativas e quantitativas de proteínas, para investigações de modificações pós-traducionais, localização subcelular e interações proteicas. Além disso, os recentes avanços nesta área vêm gerando enorme impacto sobre a eficiência e abrangência da proteômica nos estudos sobre o câncer, abrindo caminho para a descoberta de potenciais biomarcadores e para desvendar redes e vias celulares desreguladas em tumores humanos (Matta *et al.*, 2009; Makawita & Diamandis, 2010; Liang *et al.*, 2012). Entretanto, cabe salientar que as análises proteômicas se diferenciam pela utilização ou não da MS na metodologia. Para as abordagens proteômicas que não empregam a MS é fundamental o conhecimento prévio das proteínas que estão sendo testadas, pois dependem da utilização de anticorpos específicos (Qin & Ling, 2012). Entre as técnicas incluídas nesta abordagem estão o ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima (ELISA), a imuno-histoquímica (IHQ), o western blot (WB) e, mais recentemente, o microensaio de tecido (do inglês *tissue microarray-TMA*) e o microensaio de proteína (do inglês *Protein Microarray- PMA*). Por outro lado, para as abordagens proteômicas que utilizam a MS não é necessário o conhecimento biológico prévio das proteínas possibilitando a descobertas de marcadores até então desconhecidos e isso faz com que essa abordagem seja mais vantajosa em relação às demais (Bertucci & Gonçalves, 2008).

A MS é uma ferramenta para análise proteômica que tem por objetivo medir um grande número de proteínas desconhecidas em uma amostra através da separação química e física dos íons e pela determinação da razão massa/carga

(m/z) dos mesmos (Sparkman, 2000). O espectrômetro de massas por sua vez é a ferramenta principal dentro da MS e consiste em uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector no qual diversas fontes de ionização podem ser empregadas para avaliação de amostras clínicas. As técnicas mais amplamente utilizadas são por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (do inglês MALDI-TOF) e a fonte de ionização por eletrospray (ESI) (Qin & Ling, 2012). Em conjunto com a MS, vários métodos podem ser realizados previamente para separar as proteínas extraídas a partir de amostras complexas. A cromatografia líquida de alto desempenho juntamente com a espectrometria de massas em tandem conhecida como proteômica *Shotgun* ou pela sigla LC-MS/MS consiste na digestão enzimática das proteínas seguida pela separação dos peptídeos por hidrofobicidade por um sistema de cromatografia líquida seguida pela análise no espectrômetro de massas o que permite a análise rápida e a identificação da sequência dos peptídeos (Wu & MacCoss, 2002) (Figura 4). A principal vantagem do método *Shotgun* é a identificação global das proteínas de uma amostra, bem como a capacidade de fornecer o perfil do proteoma de forma sistemática e dinâmica (Wu & MacCoss, 2002; Alves *et al.*, 2007). Além disso, a proteômica *Shotgun* é uma ferramenta robusta para a obtenção da quantificação em larga escala, tanto relativa quanto absoluta, do proteoma de amostras complexas e pode ser aplicada para projetos experimentais que buscam marcadores proteicos a fim de definir, por exemplo, um fenótipo tumoral (Nesvizhskii, 2007; Cheng *et al.*, 2009; Yates *et al.*, 2009).

Com relação às diferentes estratégias proteômicas baseadas na MS, as três mais utilizadas são os métodos de marcação com isótopos estáveis, isóbaros e a quantificação sem marcação (*label-free*), as quais têm sido amplamente utilizadas na identificação de biomarcadores no câncer (Chaerkady & Pandey, 2007; Martinkova *et al.*, 2009). A MS baseada na utilização de isótopos estáveis, incluindo-se a marcação com isótopo estável em aminoácidos para células em cultura (do inglês SILAC) (Ong *et al.*, 2002) e isóbaros para quantificação relativa e absoluta (do inglês iTRAQ e TMT) (Ross *et al.*, 2004; Raso *et al.*, 2012) são

atualmente métodos populares para estudar a expressão diferencial de proteínas, modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína em amostras variando de linhagens de células cancerosas, amostras teciduais até fluidos corporais (Chaerkady & Pandey, 2007). Estes métodos são úteis na identificação de biomarcadores para o câncer seja para detecção precoce, como alvos terapêuticos, ou para o monitoramento da resposta ao tratamento. Entretanto, embora os métodos de marcação isotópica estável proporcionem flexibilidade para o estudo de alterações proteicas em amostras complexas estes métodos têm limitações potenciais, como o aumento do tempo e complexidade na preparação das amostras, a necessidade de uma concentração da amostra mais elevada, o custo elevado dos reagentes e a marcação incompleta (Spellmann *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2012).

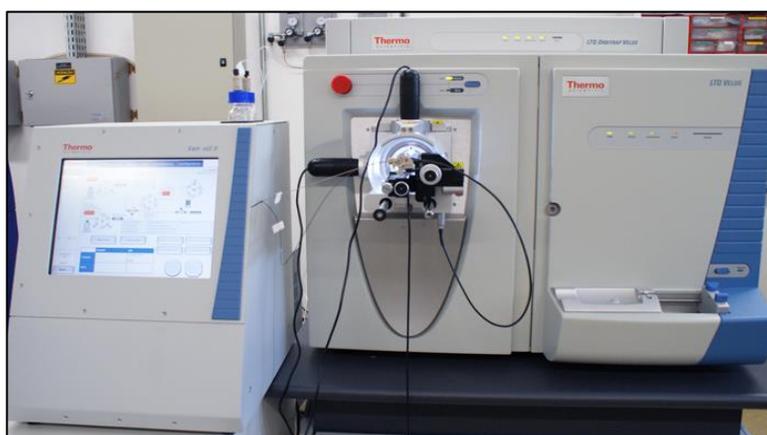


Figura 4 – Nano cromatógrafo LC PROXEON EASY nLC II acoplado a um espectrômetro de massas do tipo LTQ Orbitrap Velos. (LNBio/CNPEM)

Por essas razões, o método *label-free* tem sido amplamente utilizado por ser mais rápido e com preparo de amostras mais simplificados, dentro do possível. Neste método a quantificação relativa geralmente inclui a contagem dos espectros dos peptídeos e medições da área dos picos cromatográficas (Zhu *et al.*, 2010). A contagem dos espectros envolve a contagem de espectros dos peptídeos derivados de uma proteína em comparação à mesma proteína em outra

amostra gerando uma quantificação relativa. Por sua vez, a medição dos picos cromatográficos (do inglês *extracted ion chromatogram*, XIC) é feita através da análise da intensidade dos íons que é dada pelas áreas dos picos de peptídeos ou pela altura dos mesmos (Liang *et al.*, 2012). Além disso, diferentemente do método de marcação isotópica em que as amostras são reunidas para análise das proteínas, no método *label-free* as amostras são analisadas separadamente no espectrômetro de massas acoplado a um sistema de cromatografia líquida para a quantificação relativa. Como resultado, o método de quantificação *label-free* não requer preparação adicional como nos métodos de quantificação com isótopos estáveis e isóbaros e por isso pode ser aplicado diretamente para qualquer número de amostras obtidas a partir de qualquer fonte (Zhu *et al.*, 2010).

As premissas básicas da maioria estudos de descoberta de biomarcadores é usar a alta capacidade de coleta de dados da MS para comparar amostras biológicas entre tecido tumoral e normal a fim de identificar proteínas que são diferencialmente abundantes entre as duas amostras (Veenstra, 2007). Para atender a necessidade de comparar a abundância de proteínas em diferentes amostras, um número diverso de abordagens quantitativas no campo da proteômica baseada na MS, com diferentes vantagens técnicas e desafios, estão sendo desenvolvidas e isoladamente ou em combinação permitem a descoberta de biomarcadores com potencial em pesquisa biomédica para o câncer e futura tradução na prática clínica (Liang *et al.*, 2012).

Inúmeros softwares de bioinformática podem ser utilizados para análise dos dados gerados pela proteômica baseada na MS. Entre estes, a plataforma *MetaboAnalyst* é uma ferramenta abrangente que fornece uma variedade de métodos de análise estatística multivariada adaptados inicialmente para análise de dados da metabolômica, mas que suporta uma grande variedade de tipos de dados incluindo as contagens espectrais gerados pela LC-MS/MS possibilitando a descoberta de biomarcadores e sua classificação (Xia *et al.*, 2009; Xia & Wishart, 2011). PLS-DA (do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) e SVM (do inglês *Support Vector Machine*) são modelos estatísticos empregados para análise

de um grande número de variáveis como nos casos dos dados gerados pela MS no qual a quantidade expressiva de dados pode dificultar a caracterização das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos analisados.

O software IPA (do inglês *Interactive pathway analysis of complex 'omics data*) é uma ferramenta dentro da plataforma *Ingenuity* que permite analisar, integrar e compreender dados em grande escala derivados de expressão gênica, de microarrays, da metabolômica e da proteômica que geram listas de genes ou proteínas. Tal ferramenta permite procurar informações específicas sobre genes, proteínas, produtos químicos, drogas além de construir modelos interativos a partir dos sistemas experimentais aliados com anotação funcional das interações. Além disso, a análise através deste *software* facilita a compreensão do significado de dados complexos em busca de um alvo específico ou biomarcador candidato no contexto de grandes sistemas biológicos ou químicos, apoiados pela base de conhecimento altamente estruturada do *Ingenuity* (*Ingenuity Systems*, 2012).

O banco de dados *DAVID* (do inglês *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) fornece um conjunto abrangente de ferramentas de anotação funcional que possibilita entender o significado biológico de uma grande lista de genes. Entre as ferramentas, o *Gene Ontology* (GO) é um banco de dados com vocabulário unificado para genes e produtos gênicos com a finalidade de fornecer anotações, tais como, localização, função celular e processos biológicos envolvidos (Smith *et al.*, 2007). Por sua vez, a Enciclopédia Kyoto para Genes e Genomas (KEGG) é um banco de dados para a compreensão de funções, vias e redes de interações moleculares de diversos sistemas biológicos desde uma célula, um organismo ou até mesmo de um ecossistema a partir de informações a nível molecular, obtidas, especialmente, a partir de tecnologias experimentais de elevado rendimento, tais como as da proteômica baseada na MS (Kanehisa *et al.*, 2004; Kanehisa *et al.*, 2006).

2.9. Associação da espectrometria de massas a ferramentas não proteômicas

A MS pode ser empregada juntamente com ferramentas não proteômicas a fim de contribuir significativamente para a descoberta e o desenvolvimento de específicos e seletivos biomarcadores. A tecnologia da microdissecção a laser (ML) possibilita o isolamento de uma população celular de uma mistura de tipos celulares heterogêneos favorecendo a posterior análise por MS do perfil protéico de um tipo celular particular de interesse a partir de uma amostra de tecido tumoral como um todo (ex.: células epiteliais neoplásicas em CEC oral) aumentando as chances de identificação de potenciais biomarcadores (Li *et al.*, 2004; Johann *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2011). Para isso, um sistema de laser infravermelho para captura e de laser ultravioleta para corte é acoplado a um microscópio para obtenção de subpopulações celulares sob visualização microscópica direta (Espina *et al.*, 2007). Dessa forma, a ML permite o isolamento de células neoplásicas eliminando a heterogeneidade das amostras teciduais que consistem, não somente de ilhas de células tumorais, mas também de componentes do estroma, de infiltrado inflamatório e de áreas necróticas e podem contribuir na geração de resultados confundidores (Indovina *et al.*, 2012).

2.10. Busca por biomarcadores para o câncer identificados pela proteômica

Um biomarcador para o câncer é uma molécula biológica que pode ser encontrada no sangue, na saliva ou em outros fluidos corporais ou tecidos sendo considerado um sinal da presença de um tumor maligno (Xiao *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2012). Além disso, biomarcadores podem servir como poderosas ferramentas no diagnóstico precoce, monitoramento da progressão do estado de uma doença e para determinar a resposta do organismo a um determinado tratamento, além de serem úteis para o desenvolvimento de novas drogas (Xiao *et al.*, 2005). O estudo de proteínas como biomarcadores em câncer iniciou em 1847

com a descoberta por Henry Bence-Jones das famosas “proteínas de Bence-Jones” na urina de pacientes com mieloma múltiplo (Bence-Jones, 1847; Kyle, 1994). Em 1986, Sinclair *et al.* identificaram tais proteínas no sangue e em 1988, as proteínas de Bence-Jones foram aprovadas pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) para uso rotineiro como um teste imunodiagnóstico para o mieloma múltiplo. Atualmente, apesar de mais de 1.200 proteínas terem sido identificadas com níveis de expressão diferenciada entre tumores e amostras normais, poucas foram consideradas como candidatas a biomarcadores para o câncer humano (Polanski & Anderson, 2007). Além disso, menos de 10 proteínas foram aprovadas para testes de diagnóstico em câncer a partir de 2006 pela FDA, pois para a maioria destes marcadores ainda falta sensibilidade e especificidade (Polanski & Anderson, 2007). Exemplos de marcadores aprovados são o antígeno carcinoembrionário (do inglês CEA), os antígenos para o câncer (do inglês CA), o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (do inglês Her-2/Neu), o antígeno prostático específico (do inglês PSA), o fator de crescimento semelhante a insulina II (do inglês IGF-II) e a cadeia secretada do receptor de imunoglobulina polimérica (do inglês sPIgR) (Tabela 1). Entretanto, painéis de biomarcadores têm emergido como uma possibilidade para suprir a falta de sensibilidade e especificidade dos marcadores individualmente. Por exemplo, um painel de quatro biomarcadores conhecidos (prolactina, osteopontina, leptina e IGF-II) quando empregados isoladamente não podem distinguir pacientes com câncer de ovário de pacientes controles, entretanto, quando empregados em conjunto alcançam uma sensibilidade e uma especificidade de 95% para o diagnóstico desta neoplasia (Mor *et al.*, 2005).

Recentemente, a proteômica baseada na MS tem gerado a identificação contínua de novos potenciais biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e preditores de tratamento para os cânceres mais comuns no sexo masculino em diferentes tipos de amostras e através de diferentes abordagens metodológicas sendo que alguns exemplos podem ser observados, respectivamente, nas tabelas 2 e 3. Entretanto, validações extensas ainda são necessárias para que estas

moléculas possam ser utilizadas clinicamente. Como é o exemplo do painel de marcadores CD98, fascin, 14-3-3 eta e sPIgR identificados por ESI-MS/MS e validados por ELISA os quais foram aprovados pela FDA como biomarcadores de diagnóstico para câncer de pulmão (Xiao *et al.*, 2005; Polanski & Anderson, 2007) (Tabela 1).

Tabela 1 - Lista de marcadores diagnóstico para o câncer aprovados pela FDA

MARCADOR	NEOPLASIA	REFERÊNCIA
CEA	Efusão pleural maligna	Li <i>et al.</i> , 2003
CEA	Câncer peritoneal disseminado	Yamamoto <i>et al.</i> , 2004
Her-2/Neu	Câncer de mama estágio IV	Cook <i>et al.</i> , 2001
Antígeno tumoral da bexiga	Câncer urotelial	Mian <i>et al.</i> , 2000
Tireoglobulina	Câncer da tireóide metastático	Lima <i>et al.</i> , 2002
Alfa-fetoproteína	Carcinoma hepatocelular	De Massi <i>et al.</i> , 2005
PSA	Câncer de próstata	Gann <i>et al.</i> , 1995
CA 125	Carcinoma pulmonar de células não pequenas	Dabrowska <i>et al.</i> , 2004
CA 19,9	Câncer pancreático	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2004
CA 15,3	Câncer de mama	Ciambellotti <i>et al.</i> , 1995
Prolactina, osteopontina, leptina, IGF-II	Câncer de ovário	Mor <i>et al.</i> , 2005
CD98, fascin, 14-3-3 eta, sPIgR	Câncer de pulmão	Xiao <i>et al.</i> , 2005

Fonte: Adaptado de Polanski & Anderson, 2007.

Tabela 2 – Potenciais biomarcadores para o câncer de pulmão identificados por MS.

Marcador	Fonte	Método	Potencial Biomarcador	Referência
Catepsina D, citoqueratina 6D e 8 (CK6D e CK8)	Tecido	GEL 2D, MALDI-MS, ESI-MS	Prognóstico	Bergman <i>et al.</i> , 2000
9 proteínas enzimáticas envolvidas na antioxidação, desintoxicação ou com vias de energia	Tecido	MALDI-MS	Diagnóstico	Chen <i>et al.</i> , 2002
Fator de inibição de migração (MIF), ciclofilina A (CYP-A)	Tecido	MALDI-TOF-MS	Diagnóstico	Campa <i>et al.</i> , 2003
Fosfoglicerato quinase 1 (PGK1)	Tecido	GEL 2D, MS	Prognóstico	Chen <i>et al.</i> , 2003
Oncoproteína 18 (OP18)	Tecido	GEL 2D, ESI-EM/EM	Prognóstico	Chen <i>et al.</i> , 2003
Haptaglobina β (HP β)	Sangue	LC-ESI-MS/MS	Diagnóstico	Kang <i>et al.</i> , 2011
Amiloide sérico A (SAA)	Sangue	MALDI-TOF-MS, LC-MS/MS	Diagnóstico	Howard <i>et al.</i> , 2003 Sung <i>et al.</i> , 2011
Sorcin (resposta a quimioterapia)	Linhagens celulares	ICAT, LC-ESI-MS/MS	Potencial terapêutico	Qu <i>et al.</i> , 2006
Kallikrein B1 (KLKB1)	Sangue	LC-ESI-MS/MS	Diagnóstico	Heo <i>et al.</i> , 2007
S100 A11	Tecido	GEL 2D, MALDI-TOF-MS, MS/MS	Prognóstico	Tian <i>et al.</i> , 2007
Isoformas das citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 (CK7, 8, 18 e 19)	Tecido	GEL 2D, MALDI-TOF-MS, ESI-MS/MS	Prognóstico	Gharib <i>et al.</i> , 2008
Miosina não muscular IIA, vimentina	Tecido	LC-MS/MS	Prognóstico	Maeda <i>et al.</i> , 2008
Periostin, multimerin 2, CD166, glicoproteína 2 de membrana associada a lisossomo (LAMP-2)	Efusão pleural	LC-ESI-MS/MS	Diagnóstico	Olterman <i>et al.</i> , 2008
Fosfohistidina fosfatase 14kDa (PHP14)	Linhagens celulares	GEL 2D, ESI-TOF-MS/MS	Prognóstico	Xu <i>et al.</i> , 2008
Calmodulina, timosina β4 e β10, cofilin 1	Tecido	MALDI-MS	Prognóstico	Xu <i>et al.</i> , 2008
S100 A6	Tecido	SELDI-TOF-MS	Prognóstico	De Petris <i>et al.</i> , 2009
Anexina A3 (ANXA3)	Tecido	GEL 2D, MALDI-TOF-MS	Prognóstico	Liu <i>et al.</i> , 2009
Proteína C2 da doença de Niemann-Pick (NPC2)	Efusão pleural	LC-MS/MS	Diagnóstico	Pernemalm <i>et al.</i> , 2009
Apolipoproteína C-III (APO C-III)	Sangue	SELDI-TOF-MS, MALDI-TOF-MS/MS	Diagnóstico	Ueda <i>et al.</i> , 2009
Anexina A2 (ANXA2), 14-3-3 α, citoqueratina 19 (CK19), proteína de choque térmico 27 (HSP27)	Tecido	GEL 2D, MALDI-TOF-MS	Prognóstico	Yao <i>et al.</i> , 2009
Antiquimiotripsina α1 (ACT), fator de crescimento semelhante a insulina ligado a proteína 3 (IGFBP3), prostaglandina D sintase tipo lipocalina (L-PGDS)	Sangue	LC-ESI-MS/MS	Diagnóstico	Zeng <i>et al.</i> , 2010
Complemento 9 (C9)	Sangue	LC-ESI-MS/MS	Diagnóstico	Narayanasamy <i>et al.</i> , 2011
Haptaglobina (HP)	Sangue	MALDI-MS, MS/MS	Diagnóstico	Tsai <i>et al.</i> , 2011
Haptaglobin, calpoptetina, glicoproteína zinco α 2 (AZGP1)	Saliva	GEL 2D, MALDI-TOF-MS, LC-MS/MS	Diagnóstico	Xiao <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Adaptado de Indovina *et al.*, 2012.

Tabela 3 – Potenciais biomarcadores para o câncer de próstata identificados por MS.

Marcador	Fonte	Método	Potencial Biomarcador	Referência
Proteína 29 do retículo endoplasmático, isoforma 1 (Erp29)	Tecido	GEL 2D MALDI-TOF MS, MS/MS	Diagnóstico	Myung <i>et al.</i> , 2004
Proteína de ligação de cálcio S100 A11 (S100A11)	Tecido	GEL 2D MALDI-TOF MS, MS/MS	Diagnóstico	Rehman <i>et al.</i> , 2004 Schaefer <i>et al.</i> , 2004
AGR2 (AGR2)	Tecido	GEL 2D MALDI-TOF MS, MS/MS	Diagnóstico	Zhang <i>et al.</i> , 2005 Kovalyov <i>et al.</i> , 2006 Weitzig <i>et al.</i> , 2007 Shishkin <i>et al.</i> , 2009
Proteína NM23B, nucleosídeo fosfato di cálcio quinase B	Tecido	GEL 2D MALDI-TOF MS, MS/MS	Diagnóstico	Johansson <i>et al.</i> , 2006
Chaperonina (HSPD1) Proteína Dj-1 (Dj-1)	Tecido	GEL 2D MALDI-TOF MS, MS/MS	Diagnóstico	Bindukumar <i>et al.</i> , 2008
Anexina 2, isoforma 2 (ANXA2-i2)	Tecido	GEL 2D MALDI-TOF-MS, MS/MS	Diagnóstico	Hastie <i>et al.</i> , 2008 Shiozawa <i>et al.</i> , 2008
Proteína de ligação da próstata (neuropolipeptídeo h3 PARP1)	Tecido	GEL 2D MALDI-TOF MS, MS/MS	Diagnóstico	Li <i>et al.</i> , 2008 Woods Ignatoski <i>et al.</i> , 2008 Shishkin <i>et al.</i> , 2009
Proteína de ligação de ácidos graxos, isoforma 5 (E-FABP)	Tecido	GEL 2D MALDI-TOF MS, MS/MS	Diagnóstico	Morgan <i>et al.</i> , 2008 Shishkin <i>et al.</i> , 2009
Complexo ferritina de cadeia leve (K-(L)F) Dissulfeto de isomerase (ER60) Histona H3, família 3A (H3f3a) N-acetilneuraminato de fosfato sintase (NaNs) PRO2675 contendo domínio de albumina (PRO2675) PRO 2044 contendo domínio de albumina (PRO 2044)	Tecido	GEL 2D MALDI-TOF MS, MS/MS	Diagnóstico	Shishkin <i>et al.</i> , 2009
Apolipoproteína A-II (APOA2) Antitripsina alfa 1 (AAT) Complemento C3 (C3f) Tanstirretina (TTR) Tripsina inter alfa inibidor de cadeia pesada H4 (ITIH4f) Quininogênio de alto peso molecular (KNG)	Sangue	GEL 2D LC-MS/MS	Diagnóstico	Jayapalan <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Shishkin *et al.*, 2010; Jayapalan *et al.*, 2012

Segundo a “*American Society of Clinical Oncology (ASCO)*”, órgão regulador do uso de marcadores tumorais para o câncer de mama, uma série de proteínas candidatas vem sendo identificadas pela proteômica baseada na MS (Haris *et al.*, 2007) a partir do sangue, do fluido obtido a partir de aspiração da mama e do tecido tumoral (Qin & Ling, 2012). Alguns exemplos de marcadores para esta neoplasia que se apresenta como a mais frequente no sexo feminino podem ser observados na tabela 4. Potenciais biomarcadores identificados por ferramentas proteômicas baseadas na MS para outras neoplasias malignas humanas estão sumarizadas na tabela 5.

Tabela 4 – Potenciais biomarcadores identificados por MS para o câncer de mama.

Marcador	Método	Fonte	Referência
Thymosin α -1 Prothymosin- α	LC-MALDI-MS	Tecido	Traub <i>et al.</i> , 2006
HSP-60 HSP-70 HSP-90	Gel 2D-MALDI-MS	Linhagens celulares Tecido	You <i>et al.</i> , 2008 Zagouri <i>et al.</i> , 2010
Citoqueratinas Vimentina Fibronectina Anexinas A1 e A2 Peroxiredoxin 1	Gel 2D-MALDI-MS	Tecido	Schulz <i>et al.</i> , 2009
STAT5 BCL2 GATA3 GATA4 Her-2	LC-MALDI-MS	Tecido	Harigopal <i>et al.</i> , 2009
S100A6 S100A8 Ubiquitina	ML-MALDI-MS LC-MS/MS	Tecido	Sander <i>et al.</i> , 2008 Pietrowska <i>et al.</i> , 2010
Chaperona α B cristalina	ML-MALDI-MS	Tecido	Kabbage <i>et al.</i> , 2008
Inter- α -tripsina inibidor de cadeia pesada H4	MALDI-MS	Sangue	Winden <i>et al.</i> , 2010
Fibrinopeptídeo A Fibrinogênio α Apolipoproteína A-VI Transtirretina	ML-MALDI-MS	Sangue	Winden <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Qin & Ling, 2012.

Tabela 5 - Potenciais biomarcadores identificados por MS para outras neoplasias malignas

Marcador	Neoplasia	Método	Fonte	Referência
2-hidroxioglutarato Ácido 3-hidroxi-butírico Enolase1 Nucleolin S100A6 Haptoglobina alfa-1 Apolipoproteína CI e CIII Catapsina B ATP sintase Proibitin	Adenocarcinoma da tireóide	LC-MS/MS	Tecido fresco Sangue Linhagens celulares	Srisomsap <i>et al.</i> , 2002 Fan <i>et al.</i> , 2009 Kashat <i>et al.</i> , 2010 Sofiadis <i>et al.</i> , 2010 Rakheja <i>et al.</i> , 2011 Yao <i>et al.</i> , 2011
BIG2 PRDX6 REG1a Manose ligada a lectin 2 Miosin cadeia leve Quinase 2 Oxidase sulfidrilica 1 BCAM ICAM1 MMP9 DJ1 A1BG	Adenocarcinoma de pâncreas	LC-MS/MS	Suco pancreático Sangue Linhagens celulares	Tian <i>et al.</i> , 2008 Antwi <i>et al.</i> , 2009 Yu <i>et al.</i> , 2009 Rong <i>et al.</i> , 2010 Park <i>et al.</i> , 2011
Metanefrina Normetanefrina	Carcinoma adrenocortical	LC-MS/MS	Urina	Adler <i>et al.</i> , 2008 Marrington <i>et al.</i> , 2010
Fator eucariótico de iniciação 4A-I Queratina tipo I citoesquelético 14 S100-A8 Elastase 3B Carboxipeptidase Tioeredoxin Plastin-2 queratina Complexo T subunidade teta Serpina B5 Serpina B9 Álcool desidrogenase [NADP+] NADP+ 1 oxidoreductase Aldose 1 epimerase Estatimin S100-A11 S100-A6	Adenocarcinoma de cólon	Gel 2D-LC-MS/MS	Tecido fresco	Giusti <i>et al.</i> , 2012
Anexina A2 (ANXA2)	Adenocarcinoma de endométrio	Gel 2D-ESI-QTOF	Linhagens celulares Modelo animal	Zhou <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Giusti *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012.

2.11. Potenciais biomarcadores para os cânceres de cabeça e pescoço identificados pela proteômica baseada na espectrometria de massas

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é uma das neoplasias com maior morbidade para os seres humanos e está associado a um pobre prognóstico e a qualidade de vida seriamente comprometida (Matta *et al.*, 2009). Estudos de biomarcadores individuais incluindo p16, p53, Bcl-2, ciclina D1 (CCND1), Cox-2, receptores de tirosina-quinase tais como, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF); metaloproteinases de matriz (MMPs) e marcadores de instabilidade genômica têm demonstrado resultados inconsistentes e por vezes contraditórias (Brinkman & Wong, 2006; Deshpande & Wong, 2008; Molinolo *et al.*, 2009). Apesar do uso do EGFR como alvo terapêutico, os benefícios na sobrevida de pacientes com tumores localmente avançados ainda se mantêm modestos. Entretanto, estes biomarcadores são os que mais têm se destacado no manejo de pacientes com CCE de cabeça e pescoço. Neste cenário, a MS tem emergido como a ferramenta proteômica mais poderosa para identificação de potenciais biomarcadores bem como para a compreensão de mecanismos moleculares também para o CCP e diversos métodos vêm sendo empregados com alto rendimento e resultados promissores (Schaij-Visser *et al.*, 2010; Al-Tarawneh *et al.*, 2011). Além disso, inúmeras proteínas diferencialmente expressas no CCP, incluindo o CEC oral, já foram identificadas por MS, através de análises *in vitro* com linhagens celulares tumorais e de queratinócitos humanos orais normais e/ou através de análises *in vivo* a partir de tecido, saliva e sangue (Matta *et al.*, 2009; Schaij-Visser *et al.*, 2010; Al-Tarawneh *et al.*, 2011) (Tabela 6). Entretanto, cabe salientar que nenhuma dessas moléculas ainda é usada rotineiramente na prática clínica.

Tabela 6 - Potenciais biomarcadores para o CCP identificados por MS.

Marcador	Método	Fonte	Referência
<p>Proteínas do choque térmico (HSP)</p> <p>HSPB1</p>	<p>Gel 2D/DIGE-MALDI-MS Gel 2D-CL-MS/MS ML-LC-MS/MS</p>	<p>Linhagens celulares Tecido fresco</p>	<p>Onda <i>et al.</i>, 2002 Chen <i>et al.</i>, 2004 He <i>et al.</i>, 2004 Baker <i>et al.</i>, 2005 Koike <i>et al.</i>, 2005 Turhani <i>et al.</i>, 2006 Lo <i>et al.</i>, 2007 Staab <i>et al.</i>, 2007 Koehn <i>et al.</i>, 2008 Ralhan <i>et al.</i>, 2008 Wang <i>et al.</i>, 2008 Ye <i>et al.</i>, 2008 Ralhan <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>Cristalina B (semelhante a HSP20) (CRYAB)</p>	<p>Gel 2D-MALDI-MS LC-MS/MS</p>	<p>Tecido fresco</p>	<p>Chen <i>et al.</i>, 2004 He <i>et al.</i>, 2004 Turhani <i>et al.</i>, 2006 Lo <i>et al.</i>, 2007 Wang <i>et al.</i>, 2008</p>
<p>HSPD1</p>	<p>Gel 2D/DIGE-MALDI-MS ML-LC-MS/MS</p>	<p>Linhagens celulares Tecido fresco</p>	<p>He <i>et al.</i>, 2004 Staab <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>HSP70-1</p>	<p>ML-LC-MS/MS</p>	<p>Linhagens celulares Tecido fresco</p>	<p>Chen <i>et al.</i>, 2004 Baker <i>et al.</i>, 2005 Staab <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>HSP90B1</p>	<p>ML-LC-MS/MS</p>	<p>Tecido fresco</p>	<p>Ralhan <i>et al.</i>, 2008</p>
<p>Anexinas (ANX)</p> <p>ANX1</p>	<p>Gel 2D-MALDI-MS LC-MS/MS</p>	<p>Tecido fresco</p>	<p>Chen <i>et al.</i>, 2004 Koike <i>et al.</i>, 2005 Onda <i>et al.</i>, 2006 Turhani <i>et al.</i>, 2006 Ralhan <i>et al.</i>, 2008 Wang <i>et al.</i>, 2008</p>
<p>ANX2 ANX5</p>	<p>Gel 2D-MALDI-MS</p>	<p>Tecido fresco</p>	<p>Chen <i>et al.</i>, 2004 Koehn <i>et al.</i>, 2008</p>
<p>ANX8</p>	<p>Gel 2D-MALDI-MS</p>	<p>Tecido fresco</p>	<p>Ralhan <i>et al.</i>, 2008</p>
<p>Ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs)</p> <p>HNRNA1 HNRNA2B1 HNRNC1C2 HNRNH3 HNRPD</p>	<p>LC-MS/MS</p>	<p>Linhagens celulares</p>	<p>Staab <i>et al.</i>, 2007 Staab <i>et al.</i>, 2007 Wang <i>et al.</i>, 2008 Ralhan <i>et al.</i>, 2008</p>

Regulação REDOX			
Manganase superóxido dismutase (MnSOD)	Gel 2D MALDI-MS Gel 2D-LC-MS/MS	Linhagens celulares Tecido fresco	Chen <i>et al.</i> , 2004 Koike <i>et al.</i> , 2005 Lo <i>et al.</i> , 2007 Onda <i>et al.</i> , 2007 Patel <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2009
Peroxirredoxin 1 (PRDX1) Peroxirredoxin 2 (PRDX2)	LC-MS/MS	Tecido fresco	Wang <i>et al.</i> , 2008 Patel <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2008
Peroxiredoxin 3 (PRDX3) Peroxiredoxin 4 (PRDX4) Peroxiredoxin 5 (PRDX5)	Gel 2D-MS	Linhagens celulares	Staab <i>et al.</i> , 2007 Wang <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2008
1-D-mio-inositol-1,4,5 trifosfato 3-quinase A (1-D-mio-ITPKA) Galectina 1 (LGALS1)	Gel 2D-MALDI-MS	Linhagens celulares Tecido fresco	Kato <i>et al.</i> , 2006 He <i>et al.</i> , 2004 Wang <i>et al.</i> , 2008
Galectina 7 (LGALS7)	Gel 2D-MS	Tecido fresco	Chen <i>et al.</i> , 2004 Turhani <i>et al.</i> , 2006 Wang <i>et al.</i> , 2008
Glutaciona S-transferase (GST)	Gel 2D-MS	Tecido fresco	Chen <i>et al.</i> , 2004 Lo <i>et al.</i> , 2006 Turhani <i>et al.</i> , 2006 Koehn <i>et al.</i> , 2008 Ye <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2008
Lin- 7C (Lin-7C)	Gel 2D-MS	Linhagens celulares	Onda <i>et al.</i> , 2007
Piruvato quinase (PK1) Piruvato quinase M1 (PKM1)	Gel 2D- MALDI-MS	Tecido fresco	Chen <i>et al.</i> , 2004 Turhani <i>et al.</i> , 2006 Koehn <i>et al.</i> , 2008
Piruvato quinase isoenzima M2 (PKM2) Estatimin 1 (STMN1)	Gel 2D-MS	Tecido fresco	Koike <i>et al.</i> , 2005 Wang <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008 Ye <i>et al.</i> , 2008
Antígeno carcinoma de células escamosas (SCC-A)	Gel 2D-MS	Tecido fresco	Chen <i>et al.</i> , 2004 Turhani <i>et al.</i> , 2006 Koehn <i>et al.</i> , 2008
Vimentina (VIM)	Gel 2D-LC-MS/MS	Tecido fresco	Lo <i>et al.</i> , 2007 Patel <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2008

HNRNPE1	LC-MS/MS	Tecido parafinizado	Patel <i>et al.</i> , 2008
HNRPK	LC-MS/MS	Secretoma linhagens celulares	Ralhan <i>et al.</i> , 2008
14-3-3s YWHAZ (YWHAZ)	iTRAQ-LC-MS/MS	Secretoma linhagens celulares	Ralhan <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2009
Estratífina (14-3-3 sigma) (SFN)	Gel 2D-MS LC-MS/MS iTRAQ-LC-MS/MS	Secretoma linhagens celulares Tecido	Chen <i>et al.</i> , 2004 Baker <i>et al.</i> , 2005 Staab <i>et al.</i> , 2007 Lo <i>et al.</i> , 2007 Koehn <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2009
Proteína quinase C inibidor de proteína 1 (YWHAB/KCIP-1) 14-3-3 epsilon (YWHAE) 14-3-3 gama (YWHA G) 14-3-3 teta (YWHAQ)	LC-MS/MS	Tecido fresco	Baker <i>et al.</i> , 2005 Patel <i>et al.</i> , 2008 Patel <i>et al.</i> , 2008
Proteínas da família S100 S100A2 S100A6 S100A7	iTRAQ-LC-MS/MS	Secretoma de linhagens celulares	Roesch-Ely <i>et al.</i> , 2007 Patel <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008 Ralhan <i>et al.</i> , 2009
S100A8	Gel 2D-LC-MS/MS	Tecido fresco	Lo <i>et al.</i> , 2007 Ralhan <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008
S100A9	Gel 2D, MALDI-TOF LC-MS/MS	Linhagens celulares Tecido fresco Saliva	He <i>et al.</i> , 2004 Hu <i>et al.</i> , 2007 Ohshiro <i>et al.</i> , 2007 Dowling <i>et al.</i> , 2008 Hu <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008 Ye <i>et al.</i> , 2008
S100A11 S100A14	Gel 2D-LC-MS/MS	Tecido fresco	Ralhan <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008
Tiorredoxin	Gel 2D, MALDI-TOF, LC-MS/MS	Saliva	Hu <i>et al.</i> , 2007 Ohshiro <i>et al.</i> , 2007 Hu <i>et al.</i> , 2008 Dowling <i>et al.</i> , 2008

Desmogleína-3 Citoqueratina4 Citoqueratina16 Desmoplakin Vimentina	LC-MS/MS	Tecido parafinizado	Patel <i>et al.</i> , 2008
α -defensinas 1-3	SELDI-TOF-MS	Tecido fresco	Roesch-Ely <i>et al.</i> , 2007
14-3-3 sigma 14-3-3 zeta/delta	iTRAQ-LC-MS/MS	Tecido fresco	Ralhan <i>et al.</i> , 2008 Matta <i>et al.</i> , 2008
Ubiquitina proteína de reação cruzada Superóxido dismutase Sinal transdutor e ativador de transcrição 1-Alfa/Beta GTP proteína de ligação 1 Timidina fosforilase Serpín H1 Beta ig-h3 Filamina A Filamina B Fascin Anexina A3 Anidrase carbônica 2	LC-MALDI-MS	Linhas celulares Tecido fresco	Chi <i>et al.</i> , 2009
Proteína de ligação 90K/Mac-2 S100-A9 CD59 Catalase	LC de fase reversa-MS/MS	Saliva	Hu <i>et al.</i> , 2008
Queratina 13 Queratina 4 Transglutaminase 3 Anexina I	LC-MS	Tecido parafinizado	Negish <i>et al.</i> , 2009

Fonte: Adaptado de Matta *et al.*, 2009.

2.12. A complexidade do CEC oral e a importância da proteômica clínica

O CEC oral é o CCP mais prevalente e apresenta uma grande heterogeneidade celular e molecular no qual um grande número de genes e produtos proteicos estão potencialmente envolvidos na carcinogênese oral (Shah *et al.*, 2011). A carcinogênese oral por sua vez é um processo multifatorial com várias etapas modulado por fatores ambientais e genéticos no qual diferentes mecanismos estão envolvidos na progressão da aquisição de mutações (Saawarn *et al.*, 2011) e relacionados com a autonomia na aquisição da sinalização de crescimento (oncogenes), inibição de sinais de crescimento (genes supressores de tumor), fuga da apoptose, imortalização celular, angiogênese e, finalmente,

invasão e metástase estão presentes simultaneamente (Simionescu *et al.*, 2008; Pérez-Sayáns *et al.*, 2009). Portanto, existe a associação entre diferentes genes, seus produtos proteicos e o CEC oral no qual muitos destes genes já foram previamente descritos na literatura enquanto outros apresentam funções biológicas desconhecidas e precisam ser estudados (Pérez-Sayáns *et al.*, 2009).

A atividade do ciclo celular e a proliferação de células tumorais malignas envolvem a perda dos mecanismos de controle que garantem o funcionamento celular normal (Todd *et al.*, 2002; Saawarn *et al.*, 2011) e uma série de estudos que têm investigado a expressão de algumas proteínas envolvidas nestes mecanismos biomoleculares demonstram a identificação de potenciais biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico do CEC oral (Dragomir *et al.*, 2012). Entre os mecanismos envolvidos na patogênese e progressão do CEC aqueles que regulam a transição do ciclo celular da fase G1 para S têm sido estudados com maiores detalhes (Bradley *et al.*, 2006; Dragomir *et al.*, 2012). As proteínas p53 e p16 são proteínas que controlam o ciclo celular sendo responsáveis pela retirada e apoptose de células mutadas e também pela pausa na proliferação através da manutenção do estado hipofosforilado da proteína retinoblastoma (Rb) (Dragomir *et al.*, 2012). Mutações no gene p53 têm sido encontradas em mais de 50% dos CEC de cabeça e pescoço (Brennan *et al.*, 1995) e superexpressão de p53 está presente em mais ou 65% destas lesões (Nadal *et al.*, 1995). Entretanto, atualmente não existe um consenso sobre a ocorrência e valor prognóstico da expressão aberrante dessa proteína (Kato *et al.*, 2008; Abrahao *et al.*, 2011). As proteínas quinases dependentes de ciclina (CDKs) e a proteína ciclina D1 (CCND1) também são bastante relevantes na carcinogênese do CEC de cabeça e pescoço como um todo (Nadal & Cardesa, 2003; Saawarn *et al.*, 2011), pois estímulos mitogênicos e fatores de crescimento determinam a ativação da ciclina D que, por sua vez, ativa a CDK4 e a CDK6 resultando na fosforilação da proteína Rb que libera um fator de transcrição garantindo assim a proliferação celular (Nilsson *et al.*, 2004). Além disso, a superexpressão de CCND1 já foi associada com pobre prognóstico no CEC oral (Marsit *et al.*, 2008,

Sathyan *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009). Portanto, o acúmulo e a cooperação entre inúmeras proteínas são necessários antes que a célula afetada expresse um fenótipo francamente maligno (Henriksson *et al.*, 2006). Para isso, as modernas abordagens da proteômica associada à MS têm sido amplamente utilizadas para descoberta de proteínas diferencialmente expressas no CEC oral em comparação ao tecido normal (Schaaij-Visser *et al.*, 2010).

Entretanto, o mais relevante não é a identificação de proteínas isoladamente, mas a identificação de alterações em um conjunto de proteínas que podem contribuir para traçar um perfil de expressão protéica específico alterado nesta neoplasia (do inglês “*protein expression signature*”) podendo servir como um indicador do processo de carcinogênese (Schaaij-Visser *et al.*, 2010, Borrebaeck, 2012) de forma a extrapolar do campo da proteômica voltada somente para a ciência para o campo da proteômica voltada para a clínica.

3. PROPOSIÇÃO

3.1. Proposição geral

Identificar potenciais biomarcadores tumorais para o CEC oral que possam futuramente ser auxiliares no diagnóstico, prognóstico e tratamento dessa doença.

3.2. Proposições específicas

3.2.1. Comparar o perfil do proteoma encontrado em amostras teciduais de pacientes com CEC com amostras controle de tecido da mucosa oral normal.

3.2.2. Buscar por processos biológicos e vias que tais marcadores possam estar relacionados entre si e com o processo de oncogênese do CEC oral através da utilização de ferramentas de bioinformática.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e TCLE

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas referentes à ética em pesquisa envolvendo seres humanos deliberada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP através do projeto “*Análise da Expressão de Proteínas e Peptídeos em Carcinomas Orais de Células Escamosas*” (processo 090/2011; anexo I). Todos os pacientes submetidos a este estudo concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2. Coletas das amostras teciduais

Fragments teciduais medindo entre 0,3 e 0,5 cm foram obtidos juntamente com espécimes de biópsia incisional de CEC oral de diferentes sítios da cavidade oral de 10 pacientes atendidos no Orocentro da FOP-UNICAMP. Como controles foram coletados fragmentos de mucosa oral clinicamente normal medindo entre 0,3 e 0,5 cm da mesma amostra de pacientes com CEC. Estas amostras teciduais (10 de CEC e 10 de mucosa oral normal) foram utilizadas para análise por MS. Após a coleta do tecido, foi realizada a lavagem do fragmento com solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 1X (PBS 1X) seguida pelo congelamento imediato em criotubos (NUNC) previamente identificados a -80°C. Espécimes teciduais representativas e evitando áreas de necrose de todos os pacientes com CEC oral foram também fixadas em formalina 10% e processadas para análise histopatológica com coloração de hematoxilina e eosina e classificadas pelo sistema proposto pela OMS em 2005 (Figura 5).

4.3. Seleção de amostras do arquivo

Para validação por imuno-histoquímica (IHQ), foram selecionados do arquivo da Patologia da FOP-UNICAMP 11 blocos de amostras teciduais parafinizadas de pacientes com diagnóstico prévio de CEC oral e para os controles 11 blocos de amostras parafinizadas de mucosa oral normal.

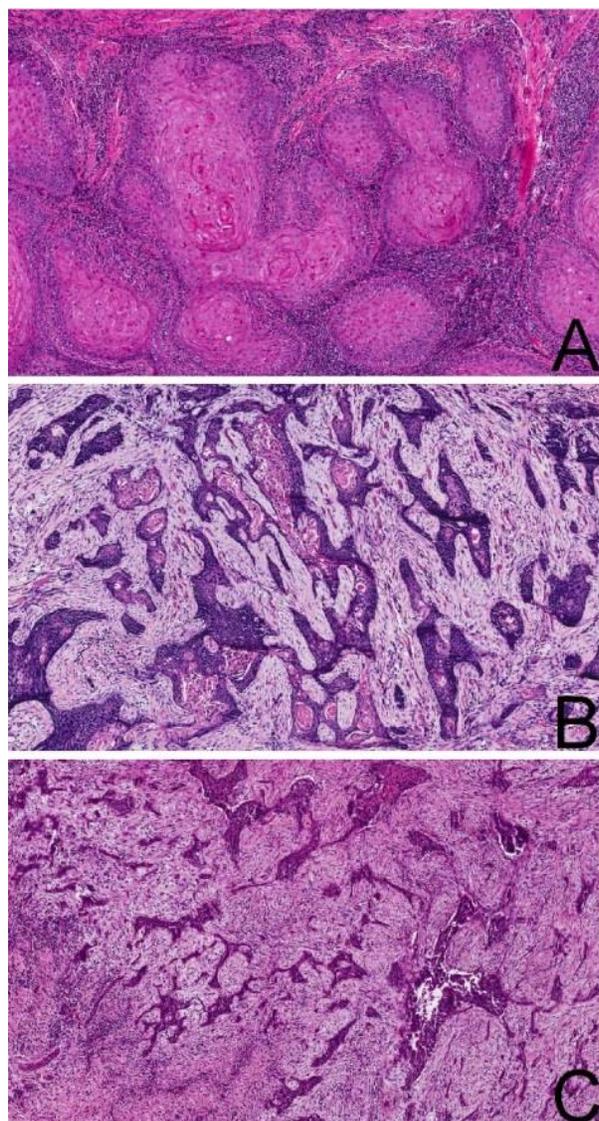


Figura 5 - Imagens histológicas representativas da amostra de pacientes do estudo. CEC oral bem diferenciado (A), moderadamente diferenciado (B) e pobremente diferenciado (C) (H & E, aumento original 100x, Microscópio Modelo DMR, Leica).

4.4. Perfil da amostra de pacientes com CEC oral

O perfil clínicopatológico dos 21 pacientes com CEC oral com amostras teciduais utilizadas neste estudo está sumarizado na tabela 7.

4.5. Preparo das amostras teciduais e corte congelado

A inclusão dos 10 pares de amostras teciduais de CEC oral e mucosa oral normal previamente congelados a -80°C foi realizada através da utilização do Tissue Tek O.C.T. Compound (Optimal Cutting Temperature) (Sakura) e criomoldes de plástico até a cobertura completa da amostra para posterior corte. Todo preparo foi realizado em ambiente climatizado com temperatura por volta de 18°C e as amostras foram mantidas em isopor com gelo seco a -78°C durante todo o processo de inclusão. Após, cortes de $8\ \mu\text{m}$ de espessura foram realizados em um criostato portátil (Leica Microsystem) a -20°C disponibilizado gentilmente pela professora Juliana Trindade Clemente Napimoga do Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP/UNICAMP. Lâminas de vidro com membrana plástica para o sistema Arcturus de ML (Arcturus PEN Membrane Glass Slides) (Life Technologies) foram empregadas para montagem dos cortes. Todas as lâminas foram imediatamente estocadas em uma caixa plástica a -80°C .

Tabela 7 - Características clinicopatológicas da amostra de pacientes com CEC oral.

PARÂMETRO	PACIENTES	
	Número	%
Idade		
Média±Desvio Padrão: 61,2 ± 0,74 anos		
Variação: 36-89 anos		
Gênero		
Masculino	17	81
Feminino	4	19
Hábito de Fumar		
Sim	13	61,9
Não	2	9,5
Ex-fumante	6	28,6
Hábito de Beber		
Sim	10	47,6
Não	8	38,1
Ex-etilista	3	14,3
Localização		
Língua	10	47,6
Rebordo Alveolar	5	23,8
Palato mole	3	14,3
Assoalho bucal	3	14,3
Diferenciação Histopatológica		
Bem diferenciado	5	23,8
Moderadamente diferenciado	12	57,1
Pobremente diferenciado	4	19,1

4.6. Preparo das lâminas para microdissecção a laser

As lâminas com os cortes montados dos 10 pares de amostras teciduais de CEC oral e mucosa oral normal armazenadas a -80° C foram mantidas por 30 segundos a temperatura ambiente climatizada de 18° C e posteriormente foram submetidas à coloração em tubos plásticos cônicos de 50 ml (Corning Costar, E.U.A.) através da sequência de etanol (Merck) 75% por 2 minutos, seguida por

lavagem com água deionizada (Millipore Corporation) por 30 segundos e posterior coloração com hematoxilina de Mayer por 40 segundos, lavagem com água deionizada por 30 segundos e coloração imediata com eosina seguida de mais uma lavagem final. Após, foi realizada a desidratação com a sequência de etanol 75% por 1 minuto, etanol 95% por 30 segundos, etanol 100% por 30 segundos e ao final xilol (Merck) por 5 minutos. Posteriormente, as lâminas foram secas por 5 minutos e seguiram imediatamente para o microscópio de microdissecção a laser (MML).

4.7. Microdissecção a laser das amostras teciduais

As lâminas coradas foram microdissecadas no MML Arcturus^{XT™} (Life Technologies) gentilmente cedido pelo professor Francisco Humberto Nociti Júnior do Departamento de Prótese e Periodontia da FOP/UNICAMP. Os parâmetros padronizados e usados para tais amostras de tecido fresco foram os seguintes: potência entre 55-80 mW, tamanho de laser ultravioleta (UV) entre 50-60 μm , duração do laser UV entre 15-25 ms, velocidade do laser UV entre 200-526 $\mu\text{m}/\text{seg}$ e área microdissecada de interesse padronizada em torno de 9000 μm^2 . As áreas microdissecadas corresponderam, respectivamente, ao tecido epitelial pavimentoso estratificado não-ceratinizado e ceratinizado das amostras de mucosa oral normal (Figura 6) e ao epitélio neoplásico, bem como as ilhas epiteliais neoplásicas invasivas presentes no tecido conjuntivo (Figura 7). Estas foram excisadas pelo feixe de laser UV e capturadas pelo feixe de laser infravermelho (IR) no qual a população celular epitelial de interesse foi aderida a película plástica dos CAPs do sistema Arcturus^{XT™} (CapSure Macro LCM Caps) (Life Technologies), obtendo-se ao final um CAP para cada amostra (total de 20 CAPs) armazenados a -80°C para serem posteriormente analisados por MS.

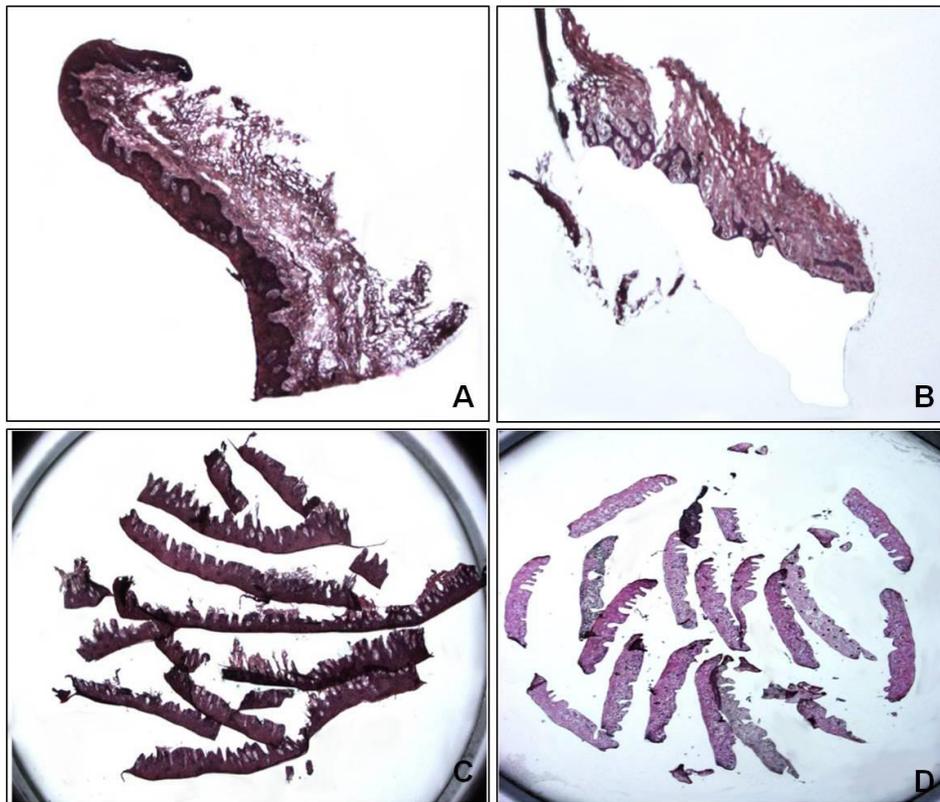


Figura 6 – Microdissecção a laser do epitélio oral normal, respectivamente, a lâmina antes da microdissecção (A) e depois da microdissecção (B). Em B, note a presença somente do remanescente de tecido conjuntivo (aumento original: 2x). Em (C) e (D) observe o CAP com tecido epitelial microdissecado (C) e (D) (H & E, aumento original: 2x MML, Arcturus).

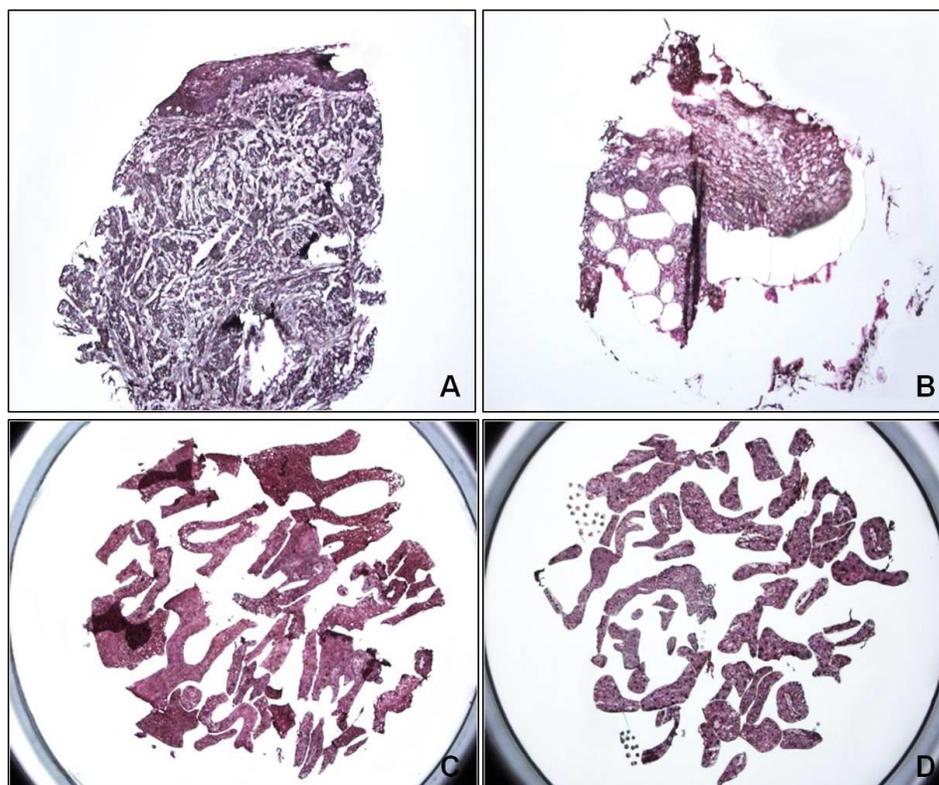


Figura 7 – Microdissecção a laser do tecido tumoral (CEC oral), respectivamente, a lâmina antes da microdissecção com a presença das ilhas de epitélio neoplásico invadindo o tecido conjuntivo (A) e a lâmina depois da microdissecção (B). Note em B a presença somente do tecido conjuntivo remanescente. Em C e D observe o CAP com epitélio neoplásico microdissecado (H&E, aumento original: 2x, MML, Arcturus).

4.8. Preparação das amostras teciduais para MS

Os 20 CAPs com $9000 \mu\text{m}^2$ de tecido epitelial microdissecado acoplados a tubos plásticos de 500 μl (Eppendorf) foram tratados com uréia (Sigma) na concentração final 1,6 M seguido pela redução com ditioneitol (Sigma) a 5 mM por 25 minutos a 56°C , alquilação com iodoacetamida (Fluka) a 14 mM por 30 minutos a temperatura ambiente protegido da luz e digestão com tripsina (Promega) por 16 horas a 37°C (proporção enzima:substrato, 1:50). A reação foi parada com ácido fórmico (Tedia) a 0,4% e as amostras secas em um concentrador a vácuo modelo SPD 1010 speedvac system (ThermoSavant). As amostras foram armazenadas a -

20°C para posterior análise no espectrômetro de massas.

4.9. Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)

As amostras foram ressuspensas em 20 µl de ácido fórmico a 0,1% e 4,5 µl foram analisadas no espectrômetro de massas LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) conectado ao sistema de cromatografia líquida EASY-nLC (Proxeon Biosystem) através da fonte de *nanoeletrospray* (Proxeon). Os peptídeos foram separados por um gradiente de acetonitrila de 2-90% em ácido fórmico a 0,1% com uma pré-coluna-coluna EASY (2 cm x 100 µm id e de 5 µm de tamanho de partícula) e uma coluna analítica PicoFrit (20 cm x 75 µm id e de 5 µm de tamanho de partícula) (New Objective), a um fluxo de 300 nl/min durante 200 minutos. A tensão do *nanoeletrospray* foi ajustado para 2.1 kV e a temperatura da fonte foi de 275° C. Todos os métodos de instrumento para o Orbitrap Velos LTQ foram realizados no modo de aquisição de análise dependente dos dados. A resolução no Orbitrap foi definida para $r=60.000$ e os 20 íons de peptídeos mais intensos com carga ≥ 2 foram sequencialmente isolados e fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) (normalizada de 35%). A exclusão dinâmica foi habilitada com uma lista de exclusão de 500 peptídeos, duração da exclusão de 60 segundos e contagem de repetição de 1. Uma ativação de $q=0,25$ e tempo de ativação de 10 ms foram utilizados.

4.10. Análise dos dados brutos

Listas de picos (msf) foram gerados a partir dos arquivos de dados usando o software Discoverer Proteome versão 1.3 (Thermo Fisher Scientific) com o algoritmo do Sequest e comparados com Banco de Dados *International Protein Index* (IPI) versão 3.86 (91522 sequências; 36.630.302 resíduos) com carbamidometilação como modificação fixa, modificação de metionina como

modificação variável, uma clivagem perdida de tripsina e uma tolerância de 10 ppm para o precursor e de 1 Da para fragmentos. Os dados foram analisados no ScaffoldQ+ v.3.4.5 com os parâmetros ajustados para se obter uma taxa de falso-positivos menor que 1%. A identificação das proteínas foi realizada através da contagem dos espectros totais dos peptídeos normalizados pelo valor quantitativo do Scaffold (Didangelos *et al.*, 2011, Aragão *et al.*, 2012).

4.11. Análise estatística e bioinformática

A partir dos dados das contagens espectrais normalizados no Scaffold, proteínas diferencialmente expressas entre as amostras de CEC oral e de mucosa oral normal foram definidas pela razão maior que 1,5 e valor de $p < 0,05$ segundo o teste *t* Student. A razão foi calculada a partir das médias das contagens dos espectros somados ao valor de 1 e normalizados pelo valor quantitativo para o CEC (n=10) e para mucosa oral normal (n=10).

Os mesmos dados das contagens espectrais normalizadas pelo Scaffold foram utilizados para análise multivariada supervisionada por PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) na plataforma MetaboAnalyst (Xia *et al.*, 2009). Para esta análise, os dados foram normalizados por autoescalamento, cujo propósito é permitir que todas as variáveis possam exercer influências equitativas nos resultados além de torná-las adimensionais. O modelo de PLS-DA teve seus coeficientes de calibração (rCal) e validação (rval) determinados com precisão. As proteínas com o maior índice VIP (Variável de Importância em Projeção) foram consideradas proteínas marcadoras de classe (CEC ou mucosa oral normal) e potenciais biomarcadores para esta análise.

Como complementar a esse modelo, um modelo SVM (*Support Vector Machine*) também foi construído a partir da contagem espectrais das proteínas normalizadas pelo Scaffold com o mesmo objetivo de segregar proteínas para as duas classes (CEC e mucosa oral normal) através de uma abordagem "um contra um". Para isso, o conjunto de dados foi dimensionado de -1 a 1, a fim de eliminar a

influência de dimensão variável. A análise multivariada por SVM foi processada em MATLAB R2009a (MathWorks Inc., Natick, MA) utilizando a caixa de ferramentas LIBSVM). O algoritmo c-svc, do pacote "libsvm" do matlab v.7.4.1, foi aplicado, sendo C e γ parâmetros otimizados após uma rede de busca. O modelo foi validado pela validação cruzada e sua qualidade acessada pela acurácia na classificação das amostras, sendo selecionadas as variáveis com as maiores contribuições na construção do melhor modelo de classificação. Cada uma destas variáveis selecionadas, que correspondem às proteínas identificadas, foi associada a uma das duas classes (CEC ou mucosa oral normal) e consideradas, portanto como classificadores.

Para obtenção de uma visão gráfica global dos potenciais biomarcadores para o CEC oral um *Heat Map* foi construído associando as proteínas com expressão diferenciada e identificadas, respectivamente, pelo teste *t* Student $p < 0,05$ e pela razão $> 1,5$ e pelas análises multivariadas por PLS-DA e SVM. O *Heat map* foi construído na plataforma quimiométrica do software MetaboAnalyst 2,0 usando *Pearson* como medida de distância. Todos os valores foram então transformados pelo *Z score*, considerando-se as contagens espectrais de cada proteína em diferentes amostras teciduais.

Para explorar as redes biológicas de interação, as proteínas diferencialmente expressas com $p < 0,05$ segundo teste *t* Student e razão $> 1,5$ e as identificadas pelas análises multivariadas por PLS-DA e SVM foram submetidas à análise no software *Ingenuity* (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA). Esta análise foi realizada a partir de um arquivo de texto baseado no número de acesso (IPI das proteínas) e redes biológicas foram geradas a partir das interações entre os genes mapeados. Além disso, a análise funcional das redes foi realizada para identificar as funções biológicas que foram mais significativas para os genes da rede.

Como análise complementar ao *Ingenuity*, as proteínas identificadas pelo teste *t* Student $p < 0,05$ e razão $> 1,5$ e por PLS-DA e SVM foram submetidas a uma análise de processos biológicos e vias enriquecidas utilizando a ferramenta

de Classificação Funcional *DAVID* alimentados pelo GO e KEGG. Foram considerados significativos para essa análise somente as vias e processos biológicos com valor de $p < 0,05$.

4.12. Validação

4.12.1. Cultura de células

As linhagens celulares SCC-4, SCC-9, SCC-15, SCC-25, HSC3, HaCat (Figura 8) e HGK foram utilizadas neste trabalho. As linhagem SCC-4 (CRL-1623), SCC-9 (CRL-1629), SCC15 (CRL-1623), SCC-25 (CRL-1628) são derivadas de CEC oral e comercializadas pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas VA, EUA), enquanto a linhagem HSC3 (JRCB 0623) também derivada de CCE da cavidade bucal é comercializada pelo *Japan Health Science Research Resources Bank*. A linhagem HaCat formada por queratinócitos humanos normais imortalizados, mas não transformados oriundos da pele (Boukamp et al., 1988) foi gentilmente cedida pelo Dr. André Vettore (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo-SP) e a linhagem de queratinócitos *Normal Human Gengival Keratinocyte* (HGK) isolada de tecidos de biópsias gengivais (Salo et al., 1991; Makela et al., 1994; Makela et al., 1999) foi gentilmente cedida pela Dra. Tuula Salo (Institute of Dentistry, Oulu-Finlândia).

As linhagens SCC-4, SCC-9, SCC-15 e SCC-25 foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* e *Ham's F-12 Nutrient Mixture* (DMEM/F12) (Invitrogen) suplementada com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona-Eurofarma) e solução antibiótica/antimicótica (Invitrogen) na diluição de 1:100. A linhagem HSC3 foi cultivada em DMEM/F-12, suplementado com 10% de FBS, 0,4 µg/ml hidrocortisona, solução antibiótica/antimicótica na diluição de 1:100 e enriquecida com 0,05 µg/ml de ácido ascórbico. A linhagem HGK foi cultivada em meio de cultura *keratinocyte growth medium* (KGM) (Clonetics Corporation, San

Diego, CA), livre de cálcio e soro, e suplementado com fator de crescimento epidérmico, hidrocortisona, insulina, extrato pituitário bovino, 200 IU/ml penicilina, 50 pg/ml gentamicina e 2,5 pg/ml (Fungizone; Clonetics Corporation). Por sua vez, a linhagem HaCat foi cultivada com *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de FBS, 0,4 µg/ml hidrocortisona e solução antibiótica/antimicótica na diluição de 1:100. Todas as linhagens foram cultivadas em frascos plásticos (Corning) de 25, 75 e 100 cm² a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂ e 95% de umidade. As células foram subcultivadas quando atingiam uma confluência de 60 a 70% e o meio de cultura foi trocado a cada 48 h. As linhagens SCC-4, SCC-9, SCC-15, SCC-25, HSC3, HaCat e HGK foram utilizadas para avaliação da expressão gênica do fator eucariótico de alongação delta 1 (EEF1D) por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) e para detecção da proteína EEF1D por Western Blot (WB).

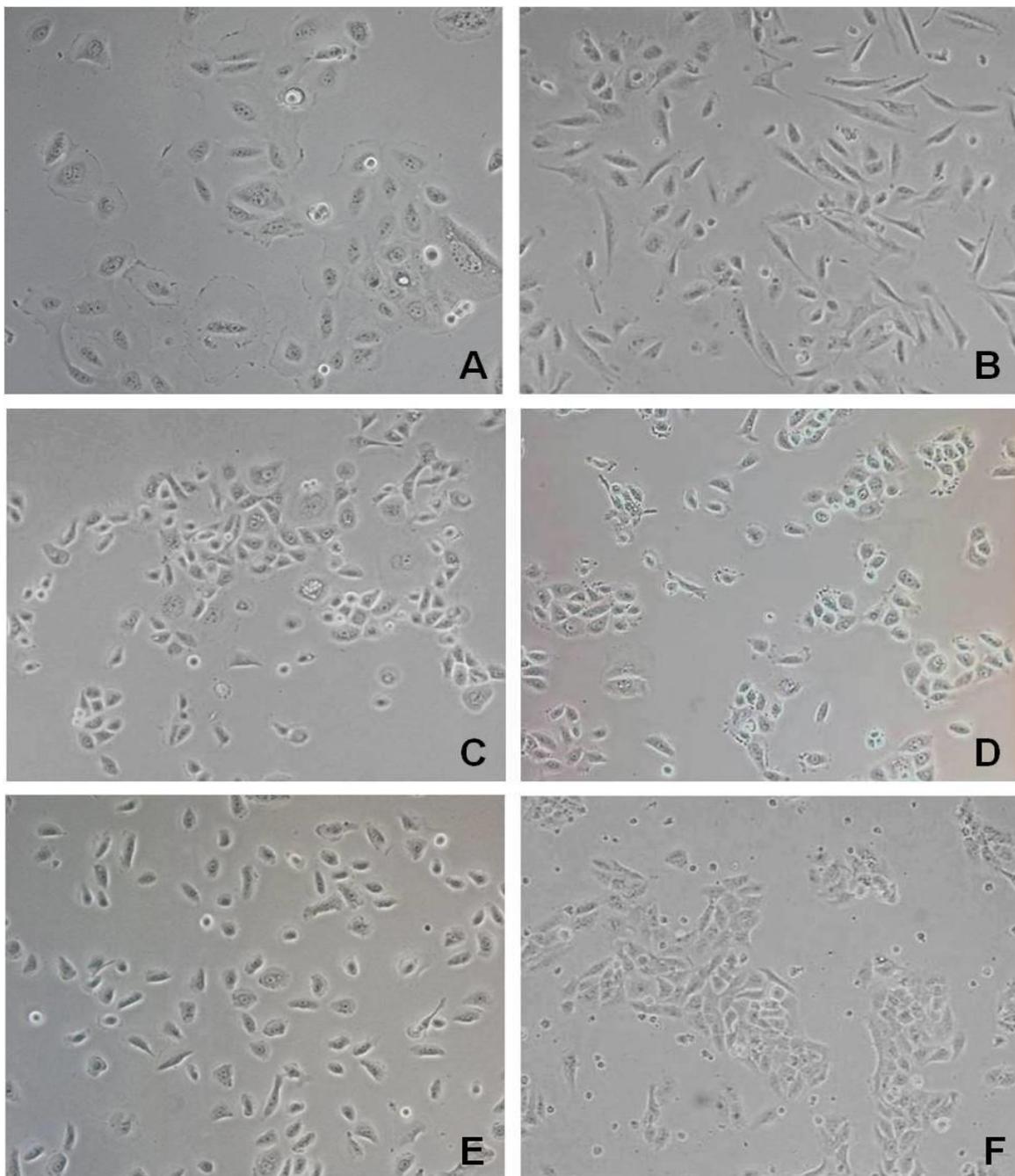


Figura 8 - Aspecto morfológico das linhagens celulares SCC-4 (A), SCC-9 (B), SCC-15 (C), SCC-25, (D), HSC3 (E) e HaCat (F) em culturas subconfluentes, observadas em microscopia de contraste de fase (aumento original: 100x).

4.12.2. Modelo animal

Foram utilizadas para validação por WB da proteína EEF1D, amostras tumorais da mucosa oral da língua de camundongos *BALB/c Nude* tumor este desenvolvido a partir do modelo ortotópico murino após 20 dias de implantação de células SCC-9 na borda lateral direita da língua do animal (Figura 9). O tecido controle foi obtido a partir do mesmo modelo após a implantação de queratinócitos normais da linhagem HaCat. A aprovação junto a Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNICAMP foi obtida através do projeto intitulado “Análise de proteínas e peptídeos em carcinoma oral de células escamosas utilizando modelo experimental para o desenvolvimento de tumores em animais” (Processo 2291-1; anexo II).

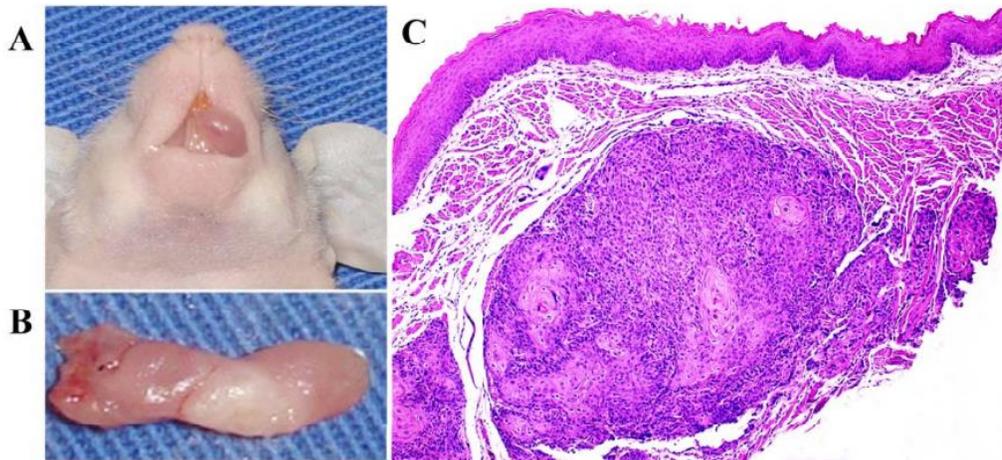


Figura 9 – Tumor desenvolvido na cavidade oral do camundongo *BALB/c Nude* após injeção de células SCC-9. (A) Amostra do tumor dissecada. (B) Aspecto histológico do carcinoma de células escamosas. Note o desenvolvimento do tumor no interior do tecido conjuntivo (H&E, aumento original: 4x, Granato *et al.*, 2013 submetido).

4.12.3. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR)

4.12.3.1. Extração de RNA total

A técnica de isotiocianato de guanidina foi usada para extração do RNA total das linhagens celulares de SCC-4, SCC-9, SCC-15, SCC-25, HSC3 e HGK (Chomczynski & Sacchi, 1987). O valor correspondente a 1.000.000 de células plaqueadas em frasco plástico de 100 cm² foi coletado por 48h e lavado com PBS 1x gelado e 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen) foi adicionado e mantido por 5 minutos em temperatura ambiente. Após adição de 0,2 ml de clorofórmio (Merck) para cada tubo, uma agitação vigorosa por 15 s foi realizada. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 min a 10.200 rpm (centrífuga modelo 5417R, Eppendorf) a temperatura de 4°C. A fase aquosa da solução foi transferida para tubos novos e 0,5 ml de álcool isopropílico (Merck) foi adicionado para precipitação do RNA. Esta mistura foi homogeneizada, incubada em temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 10.200 rpm a 4°C por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 1 ml de etanol a 75% (Merck). Após nova centrifugação a 8.400 rpm a 4°C por 5 min, o precipitado foi seco, ressuspenso em água livre de DNases e de RNases (Invitrogen) e estocado a temperatura de -80°C até o momento de sua utilização.

4.12.3.2. Análise da Concentração e Integridade do RNA

Alíquotas de 1µl foram estocadas a -80°C para determinação da concentração do RNA das linhagens celulares por espectrofotometria com comprimento de onda de 260 e 280 nm (NanoDrop™ 2000c, Thermo Scientific), usando-se o fator de correção próprio para o RNA. A razão entre as medidas espectrofotométricas a 260 e 280 nm nos forneceu uma estimativa da qualidade

da extração do RNA total extraído de cada amostra. Somente foram utilizadas as amostras com razão entre 1,8 e 2,0. Após a extração dos RNAs totais, a integridade dos mesmos foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após eletroforese de 2 µg de em gel de agarose a 1,2% contendo 1,8 ml de formaldeído na concentração de 37% e corado com 10 mg/ml de brometo de etídeo (Invitrogen). Após a separação eletroforética a 70 V por 2 h, o gel foi documentado com o sistema Kodak Digital Science™ equipado com a câmera digital DC40 (Eastman Kodak Co.) (Figura 10).

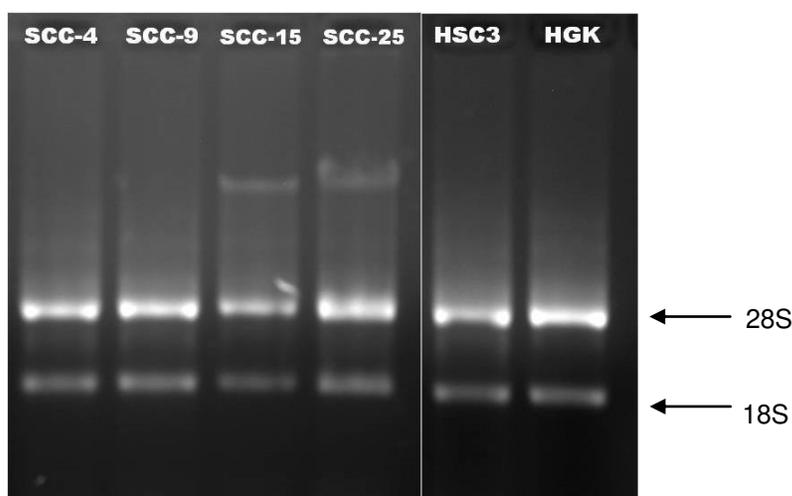


Figura 10 - Gel analítico de agarose do RNA total isolado a partir das linhagens celulares.

4.12.3.3. Síntese dos cDNAs

Previamente à síntese dos cDNAs, 2 µg de RNA total de cada amostras foram incubados com 1U (unidade) da enzima desoxirribonuclease I (DNase I, Amp Grade, Invitrogen) por 10 min em temperatura ambiente para eliminação de possíveis contaminações com DNA genômico. A inibição da DNase foi realizada pela adição de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 25 mM e pH

8 (Invitrogen) sob aquecimento a 65°C por 10 min. A síntese dos cDNAs a partir de 2µg de RNA total foram reversamente transcritos em reações com volume final de 21µl e realizada em 3 etapas. Na primeira etapa, foi adicionado 0,5µg de *primers* oligo-dT (Invitrogen) e uma mistura contendo 0,5mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) (Invitrogen). Após incubação por 5 minutos a 65°C e resfriamento das amostras em gelo, foi adicionado 5x tampão de síntese (TRIS-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl 215 mM) (Invitrogen), ditioneitol (DTT) a 0,1M e 40 U/µl da enzima RNaseOUT (Invitrogen) por 2 minutos a 42°C. Na última etapa, foram adicionadas 200 U/µl da enzima Superscript II RT (Invitrogen) e a mistura incubada por 50 min a 42°C e por 15 min a 70°C. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

4.12.3.4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR foram realizadas no equipamento Step One Plus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.) utilizando-se o SYBR®Green PCR Master Mix (Sigma). Os primers (Tabela 8) utilizados para quantificar os níveis de RNAs mensageiros para *EEF1D* foram delineados a partir das sequências dos respectivos RNAs mensageiros provenientes do GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information - NIH, E.U.A. - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com o auxílio do programa Primer Express® software for Real Time PCR version 3.0 (Applied Biosystems). Os transcritos para *EEF1D* e para o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foram amplificados em reações de 25 µl contendo 5 µl de cada cDNA diluído em água *DNase/RNase free* na proporção de 1:5, 12,5 µl de SYBR Green JumpStart™Taq ReadyMix™, 2 µl da mistura dos primers a 0,4 µM (Forward e Reverse para cada gene) e 5,5 µl de H₂O *DNase e RNase free* (Invitrogen). As condições das reações de PCR foram: 95°C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95°C por 20 s e 60°C por 1 min e 1 ciclo de 95°C por 15s, 60°C por 1 min e 95°C por 15 s. Para normalização dos resultados, utilizamos os transcritos para *GAPDH* e para análise

da expressão gênica foi realizado o método da curva padrão. A expressão diferencial dos transcritos alvo foi determinada pelo método da quantificação relativa das linhagens de câncer em relação a linhagem controle de queratinócito normal corrigidas pelo gene referência GAPDH. Calculou-se a expressão gênica por equação matemática, que analisa individualmente as eficiências de amplificação de cada gene (SDS version 2.0, Applied Biosystems).

Tabela 8 - Sequências dos primers para a amplificação dos transcritos de EEF1D e GAPDH.

Descrição	Sequência	Código no Genbank
EEF1D <i>Forward</i>	5'-AGCTCGTCGTCCGGATTG-3'	NM_032378.4
EEF1D <i>Reverse</i>	5'-GTACCACGCCACGCAGACT-3'	
GAPDH <i>Forward</i>	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'	NM_002046.4
GAPDH <i>Reverse</i>	5'- CAGAGTAAAAGCAGCCCTGGT-3'	

4.12.4. Western Blot

Extratos proteicos das linhagens celulares previamente descritas e de amostras teciduais obtidas a partir de modelo animal foram preparados para validação da proteína EEF1D. Após a tripsinização de 2.000.000 de células de cada linhagem celular cultivadas em um frasco plástico de 100 cm² por 48 horas, o *pellet* foi homogeneizado em 80 µl de tampão de lise (ANITA Buffer + inibidores de proteases) contendo 10% de sacarose, 1% de Triton X-100, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA, 10 mM de NaF, 1 mM de Na₃VO₄ e *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche), no gelo por 30 min, sendo homogeneizados a cada 10 min. Após este período, o material

foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4°C e os sobrenadantes coletados, sendo alíquotas de 2 µl de cada extrato protéico separadas para a dosagem da concentração de proteínas. Todos os extratos protéicos foram imediatamente congelados em gelo seco e estocados a -80°C, onde foram mantidos até o momento do uso. A dosagem das concentrações de proteína total das amostras foram realizadas pelo método de Bradford de acordo com as instruções do fabricante (Bradford Reagent, Sigma) em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm (Nanodrop™ 2000c, Thermo Scientific). Quantidades de 30 µg para reações com o anticorpo anti-EEF1D de proteína total foram separadas eletroforéticamente em um gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 12% (SDS-PAGE) com tampão redutor e foram transferidas para membranas de nitrocelulose. A análise por Western blot foi realizada de acordo com Burnette (1981). As membranas foram bloqueadas por 2 h com leite desnatado 5% em PBS contendo 0,1% de Tween-20 e incubadas com o anticorpo primário por 2 h. Os anticorpos primários foram: anti-EEF1D (Sigma) (35 kDa, diluição 1:10.000), anti-β-actina (Sigma) (45 kDa, 1:30.000) e anti-GAPDH (Sigma) (37 kDa, 1:30.000). Após 3 lavagens consecutivas com solução de PBS com 0,01% de Tween-20, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-rabbit para EEF1D, anti-mouse para β-actina (ambos diluição 1:1000, GE Health Care) e anti-rabbit para GAPDH diluição 1:5000 conjugados a peroxidase por 1 h. As soluções contendo os anticorpos foram preparadas com solução de 5% leite desnatado em PBS. Após uma nova série de lavagens, as membranas foram processadas usando o kit de quimioluminescência para Western blot *Enhanced Chemiluminescent* Western blot kit (GE Healthcare) e expostas a películas radiográficas extraorais ultra-sensíveis (Ektavision G, Kodak) .

Para as amostras teciduais do modelo ortotópico, após a coleta estas foram homogeneizadas com nitrogênio líquido utilizando almofariz e pilão e as proteína teciduais foram separadamente ressuspensas com 50 µl de tampão de extração (8M de ureia, 75 mM de NaCl, 50 mM Tris, pH 8,2, cocktail inibidor de protease completo isento de mini-EDTA) (Roche), suplementado com 50 mM NaF,

glicerofosfato 50 mM, 1 mM de ortovanadato de sódio, 10 mM pirofosfato de sódio, 1 mM PMSF) (Villén & Gygi, 2008) e incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após centrifugação a 11.300 rpm (centrífuga modelo 5417R, Eppendorf) durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi quantificado utilizando o reagente do método de Bradford (BioRad) na leitora de microplacas ASYS ExpertPlus (Analítica) com comprimento de onda ajustado em 595 nm como descrito por Paes Leme *et al.*, 2012. Quantidades de 40 µg para reações com o anticorpo anti-EEF1D de proteína total foram separadas eletroforéticamente em um gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 12% (SDS-PAGE) com tampão redutor e foram transferidas para membranas de nitrocelulose. A análise por Western blot foi realizada de acordo com Burnette (1981) e semelhante à realizada para as linhagens celulares.

Após secagem, as películas radiográficas foram digitalizadas em *scanner* GS 700 (Bio Rad) para a realização da densitometria óptica das bandas utilizando-se o programa Molecular Analyst (Bio Rad). As áreas de pico correspondentes foram consideradas como valor da densidade óptica para a proteína EEF1D. Área homogênea na mesma altura das bandas foi utilizada como fundo para minimizar variações. Todas as bandas tiveram seus valores normalizados pelo valor da leitura da banda da proteína normalizadora respectiva do grupo.

4.12.5. Imuno-histoquímica

Para as reações imuno-histoquímicas foram realizados cortes de 3 µm de espessura dos tecidos incluídos em parafina e colocados sobre lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Company, EUA). Inicialmente os cortes foram desparafinizados com duas seqüências de xilol (Merck) por 10 minutos cada em temperatura ambiente, hidratados em solução de concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%) (Merck) e, posteriormente, lavados em água corrente por 30

segundos. O procedimento para a recuperação antigênica foi realizado através da imersão das lâminas em solução de 10 mM ácido cítrico pH 6.0 em panela de pressão elétrica durante 15 minutos. Após 30 minutos em temperatura ambiente para resfriamento, os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 20 volumes em 5 incubações de 5 minutos cada seguido por 2 trocas com água destilada e uma troca com 1X wash buffer (Dako). Após, os cortes foram incubados por 16 horas a 4°C com o anticorpo primário anti-EEF1D (diluição 1:10.000, Sigma) diluído no agente diluente da Dako. No dia seguinte, após 2 trocas com *wash buffer* os cortes foram incubados com o sistema LSAB como recomendado pelo fabricante (LSAB+System-HRP kit, Dako, Glostrup, Denmark) seguido por revelação com solução contendo 0,6 mg/ml de 3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB; Sigma), 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,1% de H_2O_2 por 2 minutos. Ao final, as lâminas foram lavadas em água corrente por 8 minutos, contra-coradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavadas com água corrente por 8 min, desidratadas através de 3 banhos em solução de etanol a 100%, diafanizadas em xilol com 2 trocas de 10 minutos cada e finalmente montadas em Bálsamo do Canadá.

A intensidade de marcação por pixel para EEF1D foi calculada com auxílio do escaneador de lâminas histológicas ScanScope CS (Aperio®). Uma área total de 22591 μm^2 correspondente as 5 áreas teciduais mais representativas (hot spots) foi padronizada para análise das amostras de CEC e mucosa oral normal.

4.12.6. Análise estatística

O teste estatístico de ANOVA baseado em Kruskal-Wallis com $p \leq 0,05$ foi realizado para análise dos resultados da expressão gênica de EEF1D por qRT-PCR nas linhagens celulares. A razão entre a produção da proteína EEF1D e a proteína normalizadora empregada para cada experimento foi realizada para

análise dos resultados obtidos por WB para as linhagens celulares e para o tecido do modelo ortotópico. O teste de Mann-Whitney com $p \leq 0,05$ foi realizado para análise da intensidade de marcação de EEF1D por IHQ. Todos os gráficos foram construídos com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc. EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Análise proteômica baseada em espectrometria de massas associada à microdissecção a laser

5.1.1. Identificação de potenciais biomarcadores para o CEC oral por MS

Neste estudo, foi utilizado o desenho experimental mostrado na Figura 11 para a preparação das amostras baseado em LC-MS/MS associado a ML seguida por análise de bioinformática e validação. Usando ScaffoldQ+, uma lista de 2529 proteínas com menos de 1% de taxa de falso-positivos foi gerada e destas 107 proteínas mostraram diferença estatisticamente significativa na expressão entre as amostras de CEC oral e mucosa oral normal sendo, respectivamente, 63 e 44 proteínas com expressão aumentada e diminuída em CEC oral (teste *t* Student, $p < 0,05$ e razão $> 1,5$) (Tabela Suplementar 1, anexo III).

5.1.2. Segregação de potenciais biomarcadores para o CEC oral através da análise multivariada por PLS-DA e SVM

Os modelos de análises multivariadas por PLS-DA e SVM foram construídos com a finalidade de identificar as proteínas para cada classe (CEC e mucosa oral normal). Respectivamente, 40 e 70 potenciais marcadores foram classificados pela análise por PLS-DA e por SVM (Tabela Suplementar 2, anexo IV). A segregação completa pela análise por PLS-DA para as 40 proteínas VIPs entre as 2 classes pode ser observada na figura 12. Na figura 13, é possível observar a segregação entre as classes CEC e mucosa oral normal para os 70

marcadores indicados pelo SVM. A lista das proteínas segregadas por classe para ambos os modelos pode ser visualizado na tabela 9.

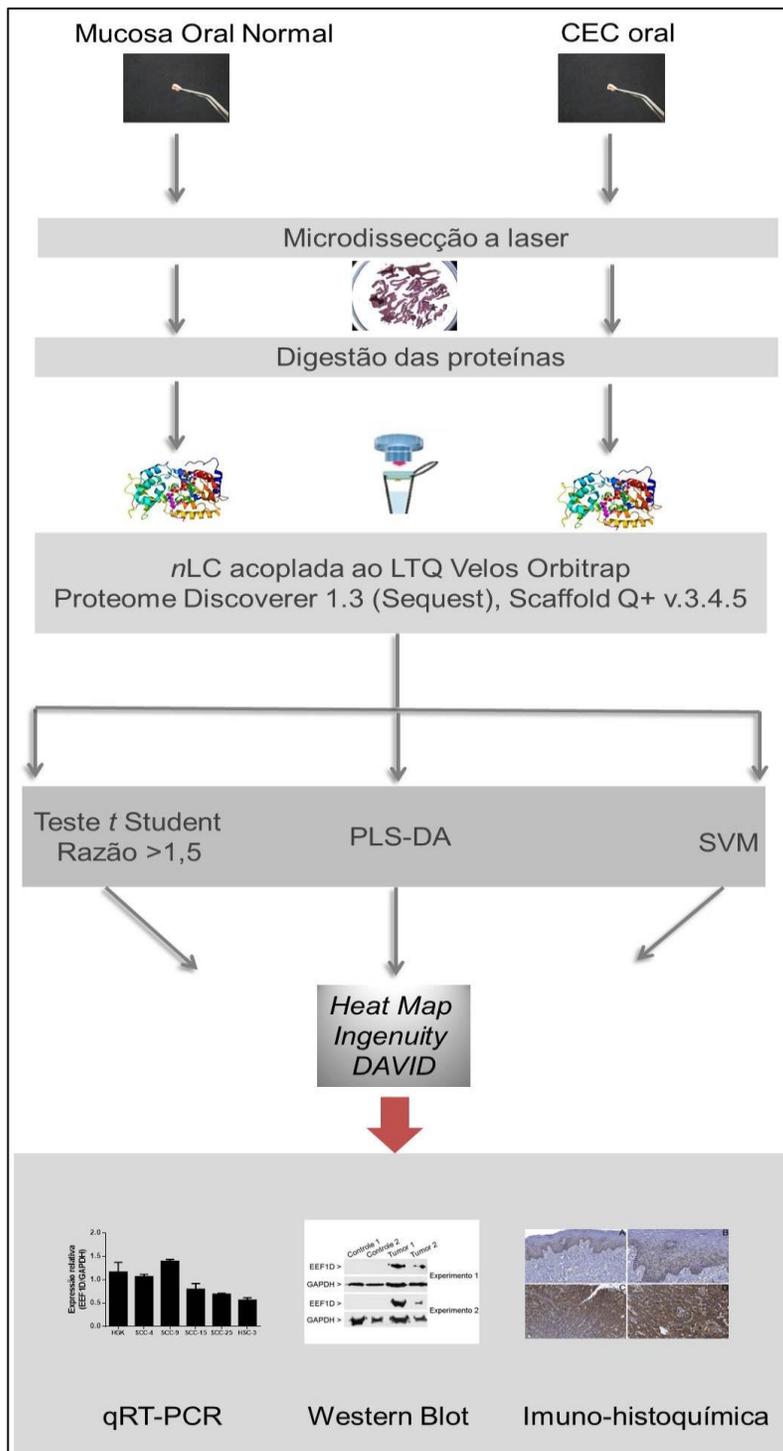


Figura 11 - Fluxograma de trabalho experimental utilizado para identificação de potenciais biomarcadores para o CEC oral.

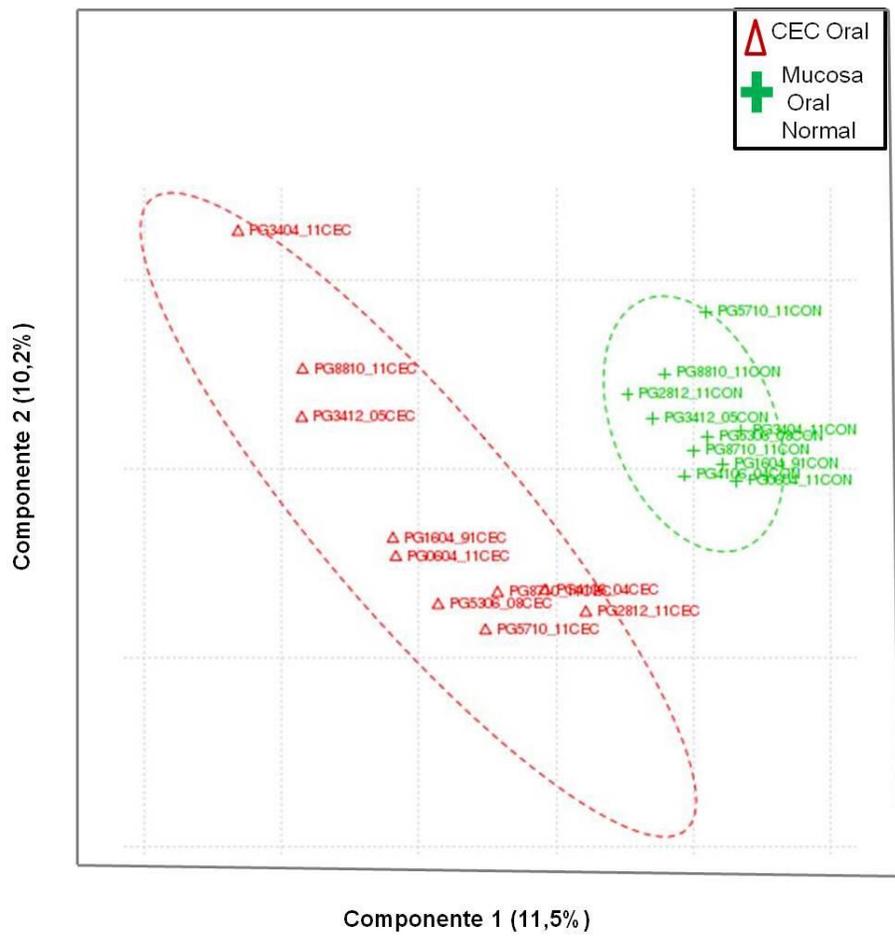


Figura 12- Segregação completa das proteínas por classe segundo a análise por PLS-DA

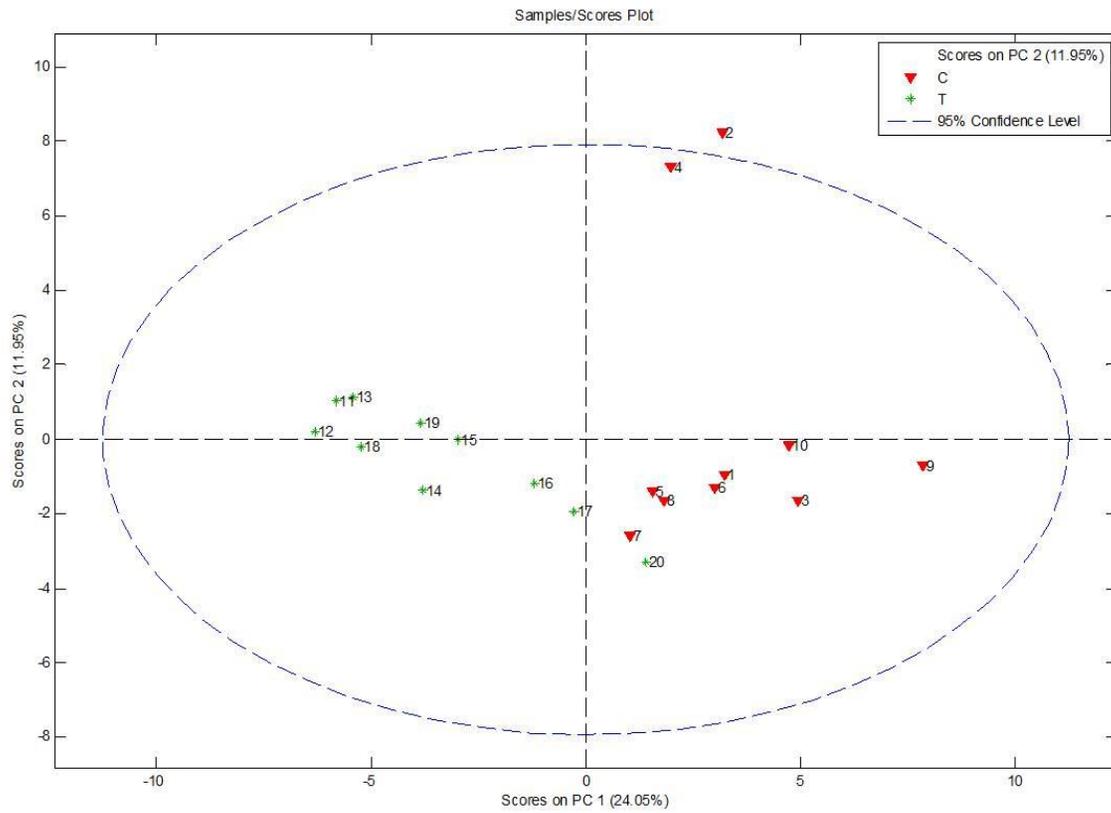


Figura 13 – Segregação quase completa dos marcadores entre as classes CEC e mucosa oral normal, exceto pela amostra 20 segundo o modelo SVM. Entretanto, é possível observar uma distinção entre os dois grupos de amostras.

Tabela 9 – Marcadores de classe segregados pelas análises por PLS-DA e SVM.

PLS-DA	Mucosa Oral Normal	SVM
-Isoforma 3 espectrina cadeia alfa		-Queratina, tipo II citosquelal 2 oral
-FLJ53421cDNA, muito semelhante a <i>Homo sapiens</i> , proteínas da família de ligação guanilato, membro 6 (GBP6), mRNA		-Proteína do choque térmico beta 1
-Isoforma 1 da 3-hidroxiacil coA desidrogenase tipo 2		-ATP sintase subunidade alfa, mitochondrial
-FLJ50378cDNA, altamente semelhante a fenilalanina tRNA sintetase cadeia alfa		-Proteína S100-A14
-Periplakin		- Transaldolase
-Domínio 3 proteína LY6/PLAUR		- Proteína vacuolar associada à proteína 35
-Proteína S100 A14		- Complexo citocromo b-c1 subunidade 2, mitochondrial
-Fosfoglucomutase 2		- UDP-glucose 6 desidrogenase
-Proteína do choque térmico beta1		-60S ribossomal proteína L8
-Alfa 2-macroglobulina semelhante a proteína 1		- Potencial receptor transitório canal catiônico subfamília M membro 7
-D-3 fosfoglicerato desidrogenase		- Isoforma 4 de Dynein cadeia pesada 14, axonemal
-Fator de coagulação XIII A		- Isoforma 1 da Proteína POF1B
-Queratina, tipo 1 citoesquelal 19		- D-3-fosfoglicerato desidrogenase
-Isoforma 1 de queratina, tipo II citoesquelal 73		- Isoforma 2 da desidrogenase aldeído graxo
-Proteína GUCA1B (Fragmento)		- Isoforma 1 de 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase tipo 2
-Proteína quinase, cAMP dependente tipo II, alfa, isoforma CRA_b		- Enoil-CoA hidratase, mitochondrial
-		- Isoforma 2 da proteína 3 com atividade inibitória, Melanoma
-		- Isoforma 2 do canal aniônico voltagem dependente seletivo proteína 3
-		- Acetil-CoA acetiltransferase, mitochondrial
-		- Isoforma 1 de ATP de ligação sub-família membro 1
-		-Proteína Jade 3
-		-Prolargin
-		-Fator de coagulação XIII cadeia A

-
- Alfa cristalina cadeia B
 - Isoforma 2 da hidroxiaçil coenzima A desidrogenase, mitocondrial
 - Epóxido hidrolase 1
 - NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 alfa subcomplexo subunidade 9, mitocondrial
 - cDNA FLJ50378, altamente similar a fenilalanina-tRNA sintetase cadeia alfa
 - ATP-dependente RNA helicase DHX8
 - Isoforma 1 do fator de clivagem e poliadenilação subunidade 6
 - Insulina enzima de degradação
 - RNA de ligação proteína 3
 - Isoforma 4 de StAR relacionada com a transferência, proteína 13
 - Ras proteína relacionada a Rab-1B
 - Isoforma 1 do fator ativador de plaquetas subunidade alfa acetil hidrolase IB subunidade alfa
 - 24-hidroxicolesterol 7 alfa hidroxilase
 - Isoforma 2 do receptor transitório do canal catiônico subfamília V membro 3
 - Isoforma 2 da proteína não caracterizada C18orf54
 - Proteína quinase, cAMP dependente, regulatória, tipo II, alfa, isoforma CRA_b
 - NADH desidrogenase [ubiquinona] beta 1 subcomplexo subunidade 4
 - Mitocondrial transportadora homóloga 2
 - Monoglicerídeo lipase isoforma 1
 - Transcricional ativador da proteína Pur-alfa
 - PDZ domínio contendo proteína GIPC1
 - Isoforma 1 do fator de crescimento epidérmico receptor quinase substrato 8 semelhante a proteína 130
-

PLS-DA	CEC Oral	SVM
-Isoforma 2 filamina A		- Queratina, tipo I citoesquelal 17
-EEF1D		- Fibrinogênio cadeia beta
-L-lactato desidrogenase A isoforma 3		- Isoforma Gama B de fibrinogênio cadeia gama
-Miosina cadeia 12A		- Isoforma 1 do Fibrinogênio cadeia alfa
-Isoforma 1 de microtúbulo de actina fator de ligação cruzada 1 isoforma 1/2/3/5		- Isoforma 1 do microtúbulo de actina ligação cruzada, isoformas 1/2/3/5
-Isoforma 2 de basigin		- Isoforma 4 de Nesprin-1
-Isoforma 1 miosina 9		- Isoforma 1 de citoplasmático FMR1 proteína 1 de interação
-Isoforma 4 de plectina		- Isoforma 2 de proteína vacuolar associada a proteína 13D
-Isoforma beta 4C da integrina beta 4		- Esperma associado a antígeno 17
-Proteína não caracterizada		- DmX semelhante a proteína 1
-Isoforma 2 do fator eucariótico de iniciação da tradução 3 subunidade B		- Isoforma 1 provável transportadora de fosfolípido ATPase VD
-Microtúbulo associado à proteína		- Vitronectina
-RNA de ligação, proteína EWS isoforma 1		- Sindecin 1
-Proteína 44kDa		- Proteína 202 kDa
-Isoforma Del-701 transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3		- Isoforma 1 de fosfotidilinositol 3, 4, 5 trifosfato 5 fosfatase 1
-Fascin		-Isoforma 2 de Fibulina 2
-Fator eucariótico de iniciação da tradução 2 subunidade 1		- Miosina-Ie
-Isoforma 1 de MAP7 contendo domínio		- Proteína não caracterizada
-Filamina B isoforma 1		- Complemento C1q subcomponente subunidade C
-Queratina, tipo I citoesquelal 17		- Serina treonina quinase receptor associada a proteína
-FLJ56074cDNA altamente similar a proteína reguladora do oxigênio 150kDa		- Proteína não caracterizada
-tRNA <i>splicing</i> ligase homóloga RtcB		- Isoforma 1 de ATP dependente RNA helicase DDX19B
-Prefoldin subunidade 2		- Flotillin 2
-cDNAFLJ fis, clone TST04067, altamente similar a purina nucleosídeo fosforilase		- Espiral enrolada do domínio contendo proteína 130

5.1.3. Construção de *Heat map*

O *heat map* gerado pela plataforma MetaboAnalyst com os potenciais biomarcadores identificados pelo teste *t* Student $p < 0,05$ e razão $> 1,5$ associados com as proteínas segregadas pelas análises por PLS-DA e SVM mostra a separação quase completa das proteínas em *clusters* para o CEC e para mucosa oral normal (Figura 14).

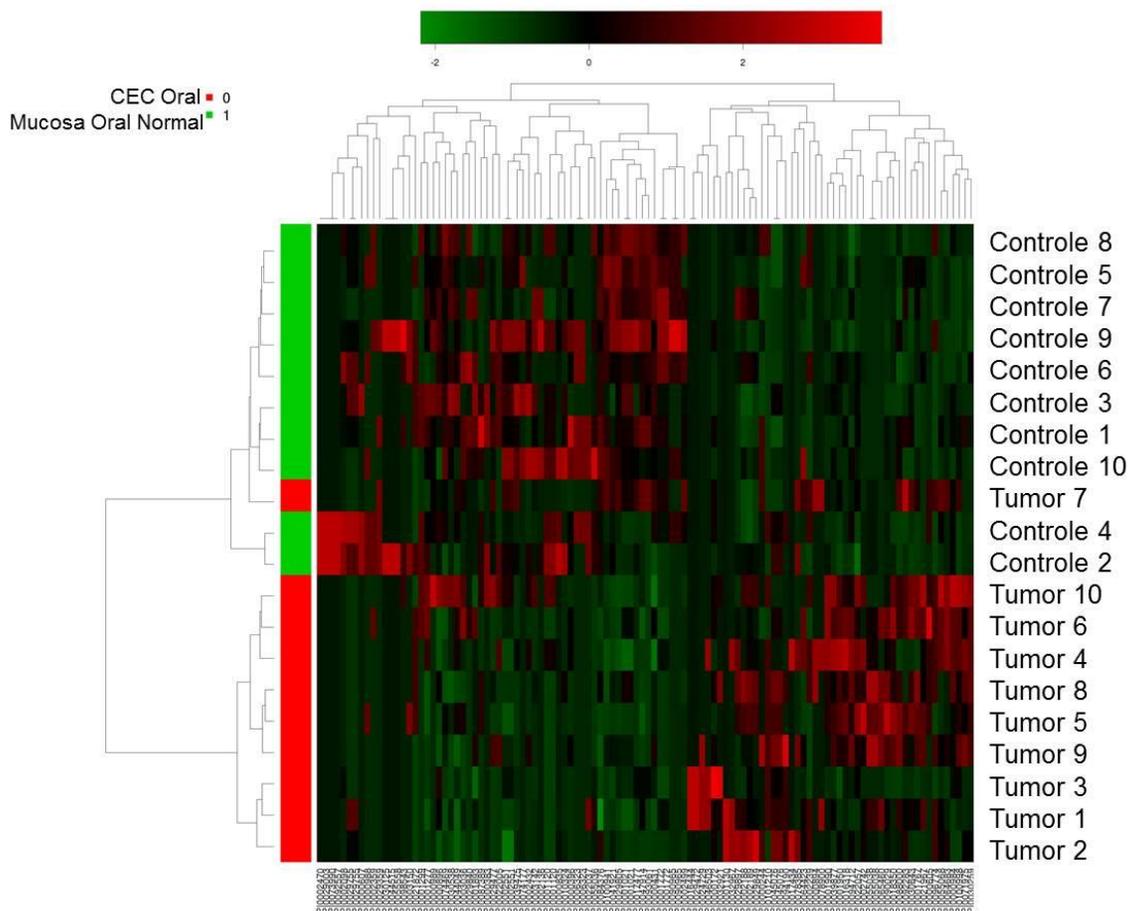


Figura 14 – *Heat Map* mostrando os *clusters* das proteínas identificadas por MS. Observe que no canto superior esquerdo (em vermelho) estão localizadas as proteínas mais expressas na mucosa oral normal em comparação as do CEC oral. Por outro lado, as proteínas localizadas no canto inferior direito (em vermelho) correspondem às proteínas mais expressas no câncer em relação ao controle.

5.1.4. Busca de redes biológicas e funcionalidade dos marcadores através do *Ingenuity*

A análise das proteínas com $p < 0,05$ e razão $> 1,5$ através do *Ingenuity* mostrou que as principais funções das proteínas da rede foram relacionadas à sinalização célula-célula e interação, ao desenvolvimento da pele e ao câncer (Tabela 10). A análise dos marcadores fornecidos por PLS-DA e SVM mostrou também mostrou que as proteínas da rede estavam relacionadas ao câncer, a manutenção e função celular, a replicação do DNA, a recombinação e ao reparo (Tabela 10). Redes de interação das proteínas foram construídas a partir dessas análises no qual é possível observar que tanto a rede gerada com $p < 0,05$ e razão $> 1,5$ quanto à rede gerada para o PLS-DA e SVM convergem para as proteínas quinases reguladoras de sinais extracelulares (ERK1 e 2), proteína quinase ativadora 38 delta (p38 MAPK), para o fator nuclear cadeia leve kappa intensificador de células B ativadas (NFkB) e para a proteína quinase B (Akt) que aparecem como moléculas chave nas redes (Figuras 15 e 16).

Tabela 10 - Funções biológicas das redes em ordem decrescente de significância e marcadores com expressão aumentada gerados pelo *Ingenuity*.

Funções da rede para $p < 0,05$ e razão $> 1,5$	
1 Sinalização célula-célula e interação, desenvolvimento da pele, câncer	
2 Doenças neurológicas, injúrias e anormalidades, replicação do DNA, recombinação e reparo	
3 Movimentação e organização celular, desenvolvimento tecidual	
4 Organização celular, doenças dermatológicas, doenças hereditárias	
5 Câncer, doenças gastrointestinais, doenças hematológicas	
Funções da rede para PLS-DA e SVM	
1 Desordens de desenvolvimento, doenças hematológicas, desordens hereditárias	
2 Organização celular, desenvolvimento tecidual, movimentação celular	
3 Câncer, função e manutenção celular, replicação do DNA, recombinação e reparo	
4 Morte e sobrevivência celular, desordens de desenvolvimento, desordens hereditárias	
5 Morte celular e sobrevivência, sinalização célula-célula e interação, desenvolvimento e função do sistema hematológico	
Proteínas superexpressas ($p < 0,05$ e razão $> 1,5$)	PLS-DA e SVM
Lactotransferrina (LTF)	Integrina beta 4 (ITGB4)
Integrina alfa 6 (ITGA6)	Fascin 1 (FSCN)
Integrina beta 4 (ITGB4)	Filamina B (FLNB)
Miosina 1B (MYO1B)	Microtúbulo de actina fator de ligação
Fascin 1 (FSCN1)	cruzada 1 (MACF1)
Filamina B (FLNB)	Fibrinogênio cadeia beta (FGB)
Mieloperoxidase (MPO)	Filamina A (FLNA)
Microtúbulo de actina fator de ligação cruzada 1 (MACF1)	Queratina 17 (KRT17)
Serpin H1	Purina nucleosídeo fosforilase (PNP)
Família transportadora de soluto 2 (transportador de	Basigin (BSG)
glicose facilitada) membro 1 (SLC2A1)	Fator eucariótico de alongação delta 1 (EEF1D)

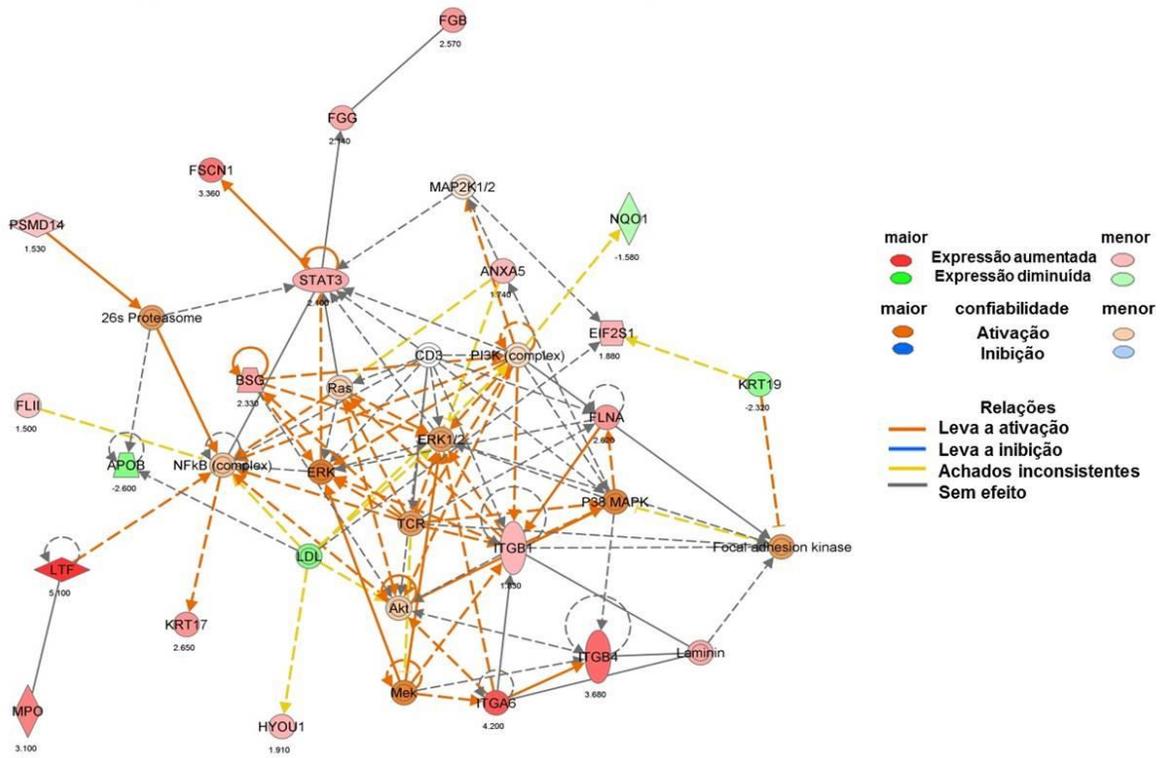


Figura 15 - Rede biológica entre as proteínas com $p < 0,05$ e razão $> 1,5$. Observe que as proteínas chaves em câncer são ativadas principalmente pelas proteínas ERK, p38MAPK, NFkB, PI3K e Akt.

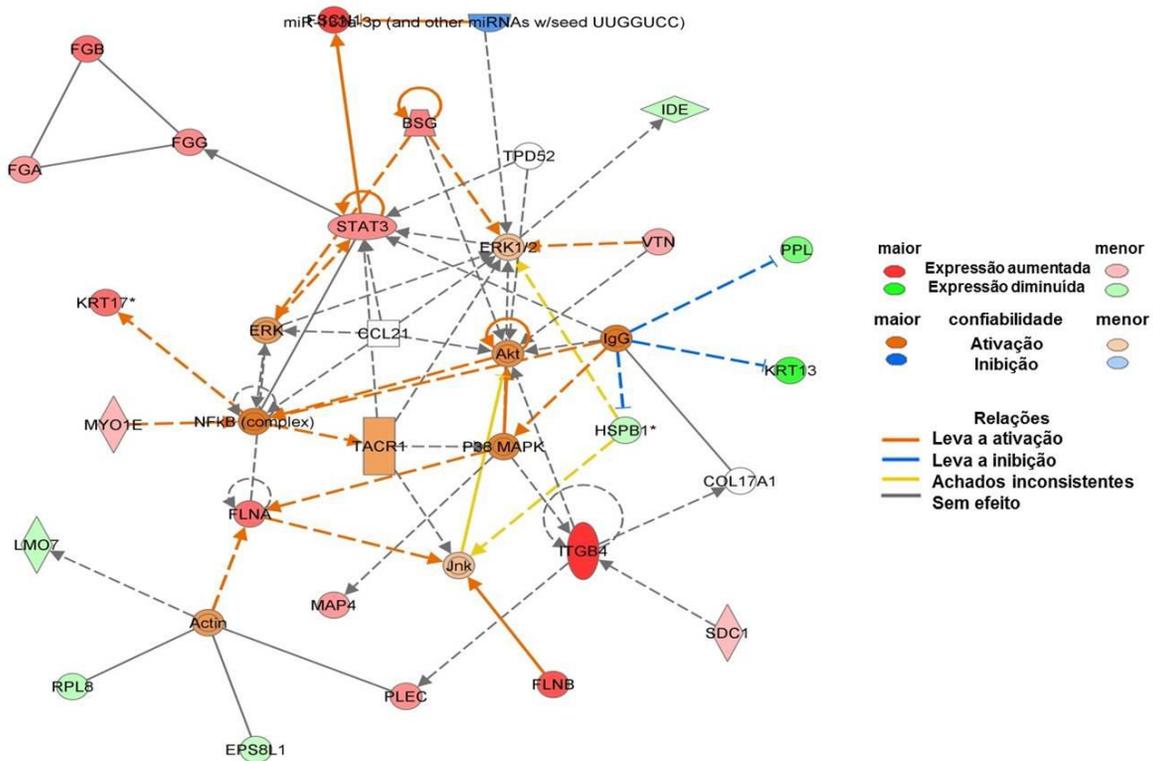


Figura 16 – Rede biológica entre os marcadores indicados por PLS-DA e SVM. De forma similar a rede anterior, as proteínas também convergem para ERK, p38 MAPK, NFkB e Akt responsáveis pela ativação da rede.

5.1.5. Enriquecimento de vias para o CEC oral através da ferramenta de classificação funcional *DAVID*

As proteínas submetidas à análise de enriquecimento usando X2K software (Chen *et al*, 2012.) contra os bancos de dados Gene Ontology (GO) e contra a Enciclopédia de Kyoto para genes e genomas (KEGG) geraram processos biológicos e importantes vias relacionadas ao CEC oral (Tabela 11). Os principais processos biológicos enriquecidos ($p < 0,05$) para o CEC oral foram a adesão celular, a regulação da motilidade celular, a via de sinalização mediada por integrinas, a ancoragem celular, a aderência juncional, a migração celular e a junção celular. A análise também revelou vias significativamente enriquecidas

($p < 0,05$), tais como, a via de adesão focal, de regulação do citoesqueleto de actina e da interação do receptor da matriz extracelular (MEC). Cabe salientar que a grande maioria das proteínas, com destaque para as integrinas (ITGB1, ITGB4, ITGA6) estiveram presentes em diversos processos biológicos e vias mostrando a possível relação entre elas dentro das redes previamente geradas pelo *Ingenuity* e destacando alguns dos prováveis mecanismos mais importantes e ativados no CEC oral.

Tabela 11 - Processos biológicos e vias enriquecidas para o CEC oral a partir da Ferramenta de Classificação Funcional DAVID.

Processos biológicos <i>Gene Ontology</i>	Valor de p	Genes
Adesão celular	2,41E-05	LAMB1, ITGB4, ITGB1, ACTN1, ITGA6
Regulação da motilidade celular	0,0013	CAP 1, MSN, ITGB1, TPM 4, MACF1, STAT 3, MYH9, ITGA6
Via de sinalização mediada por integrinas	0,0019	ITGB4, ITGB1, MYH9, ITGA6
Ancoragem celular	0,0051	ITGB1, ACTN1, MYH9, ITGA6
Aderência juncional	0,0035	ACTN1, ITGB1, MYH9, ITGA6
Migração celular	0,016	CAP 1, MSN, ITGB1, MYH9, ITGA6
Junção celular	0,018	MACF1, ACTN1, SLC2A1, ITGB1, MYH9, ITGA6
KEGG Vias	Valor de p	Genes
Adesão focal	2,21E-06	LAMB1, MYL12A, ITGB4, ITGB1, FLNB, TNC, ACTN1, FLNA, ITGA6
Regulação do citoesqueleto de actina	3,78E-04	MYL12A, ITGB4, MSN, ITGB1, ACTN1, MYH9, ITGA6
Interação do receptor da MEC	5,72E-04	LAMB1, ITGB4, ITGB1, TNC, ITGA6

5.2. Validação

5.2.1. Resultado da expressão de mRNA por qRT-PCR

Na análise estatística usando ANOVA baseado em Kruskal-Wallis para as linhagens celulares SCC-4, SCC-9, SCC-15, SCC-25, HSC3 e HGK não foi observada significância estatística na expressão de mRNA de EEF1D entre as linhagens celulares tumorais e a linhagem de queratinócito normal (Figura 17).

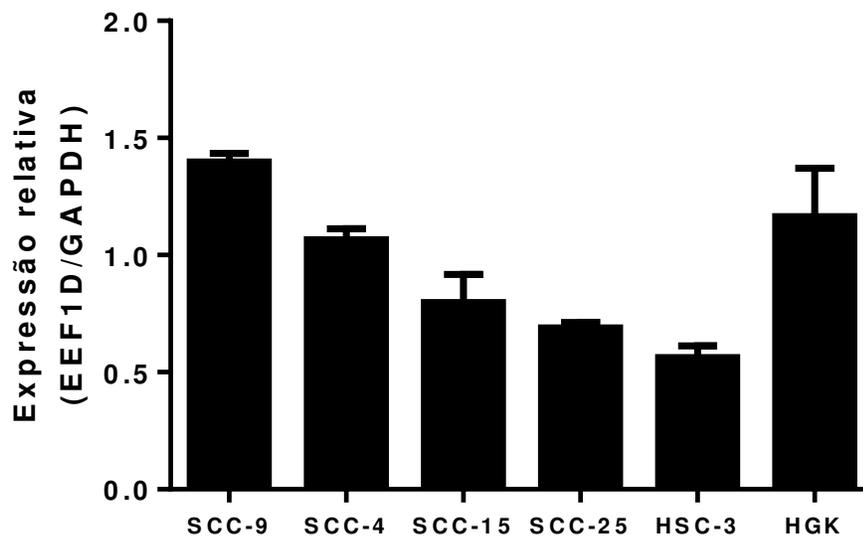


Figura 17 - Expressão relativa de mRNA de EEF1D por qRT-PCR para as linhagens celulares. Note que a linhagem SCC-9 foi a única com expressão aumentada em relação à linhagem HGK.

5.2.2. Resultados da análise por Western Blot

Uma produção aumentada de EEF1D nas linhagens tumorais SCC-9 e HSC3 em relação à linhagem de queratinócito controle HGK foi observada através do ensaio de WB das linhagens celulares SCC-4, SCC-9, SCC-15, SCC-25, HSC3 e HGK para a proteína EEF1D normalizada pela proteína β -actina (Figura 18). O ensaio de WB para as linhagens SCC-9 e HaCat para EEF1D normalizada por

GAPDH mostra uma produção relativa aumentada de EEF1D para a linhagem tumoral em relação a linhagem de queratinócito controle HaCat (Figura 19). No ensaio com as amostras teciduais obtidas a partir do modelo ortotópico foi possível observar uma produção relativa aumentada da proteína EEF1D nas amostras tumorais em relação ao tecido de mucosa oral normal (Figura 20).

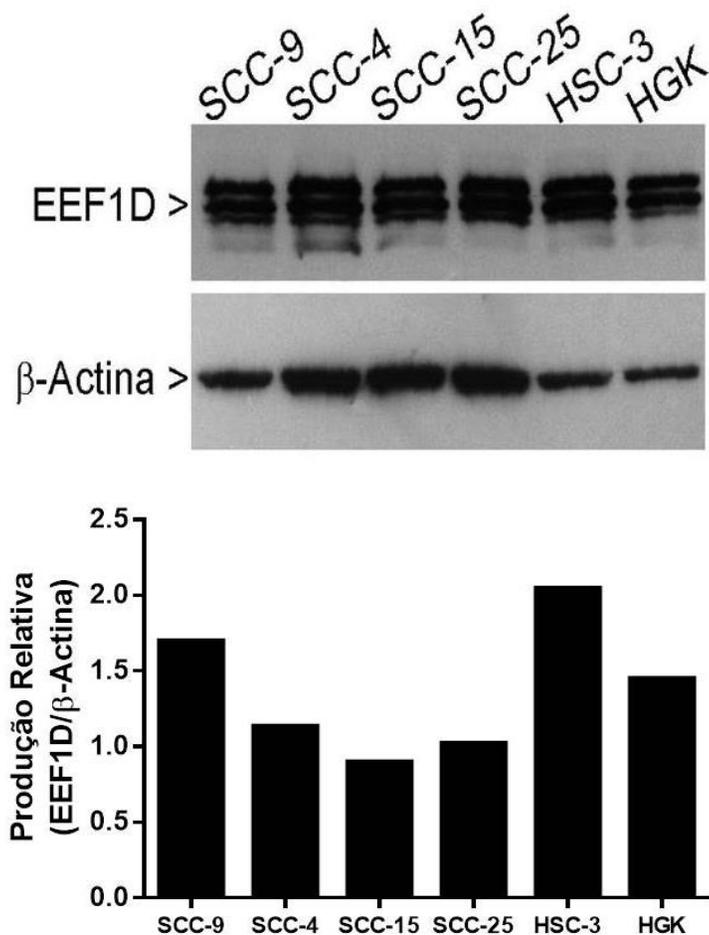


Figura 18 – Produção relativa de EEF1D em linhagens celulares. Observe a maior expressão nas linhagens SCC-9 e HSC-3 em comparação a linhagem de queratinócito normal HGK.

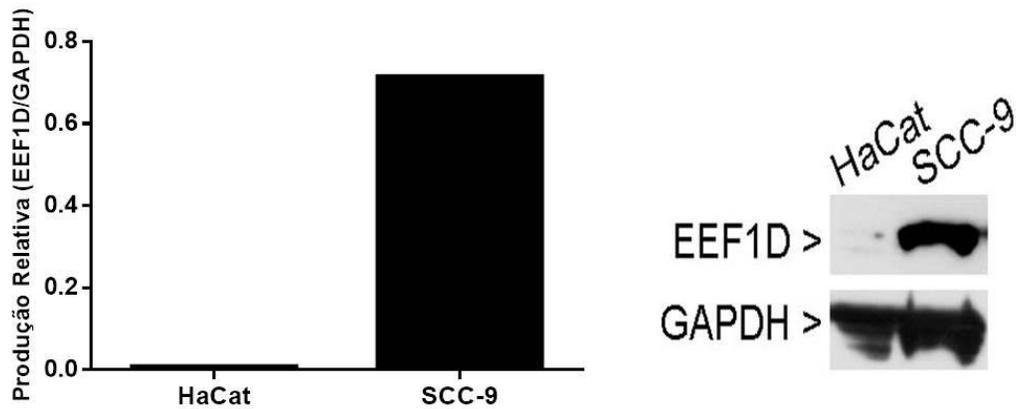


Figura 19 - Produção relativa de EEF1D nas linhagens SCC-9 e HaCat observada através do ensaio de WB. Note a produção significativamente aumentada de EEF1D na linhagem tumoral SCC-9 em comparação a linhagem de queratinócito normal HaCat.

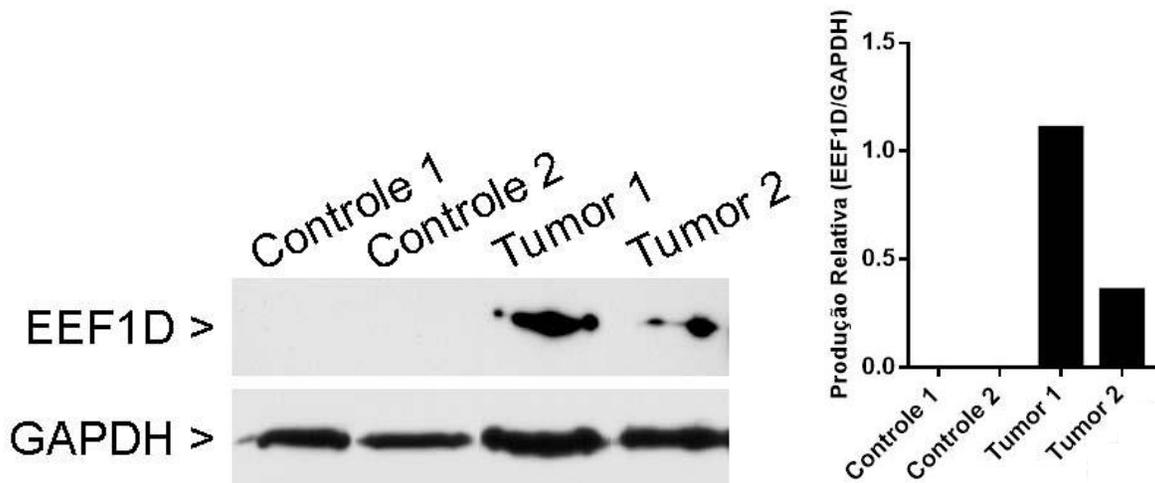


Figura 20 - Produção relativa de EEF1D nas amostras teciduais do modelo ortotópico de CEC oral através do ensaio de WB. Observe a produção relativa aumentada de EEF1D nas amostras de tecido tumoral em comparação ao tecido controle.

5.2.3. Resultado das reações de imuno-histoquímica

A avaliação imuno-histoquímica (IHQ) de EEF1D mostrou positividade citoplasmática de marcação em todos os casos (CEC e mucosa oral normal). Uma marcação perinuclear e pontilhada, correspondendo a região de retículo endoplasmático rugoso, predominantemente na camada parabasal e em parte da camada espinhosa foi observada no epitélio oral normal, enquanto que a marcação no CEC oral foi difusa e significativamente mais intensa em todo o componente tumoral (Figura 21). Considerando a intensidade de marcação, a expressão IHQ de EEF1D foi significativamente maior no epitélio tumoral em comparação ao epitélio de mucosa normal ($p=0,0014$; Figura 22).

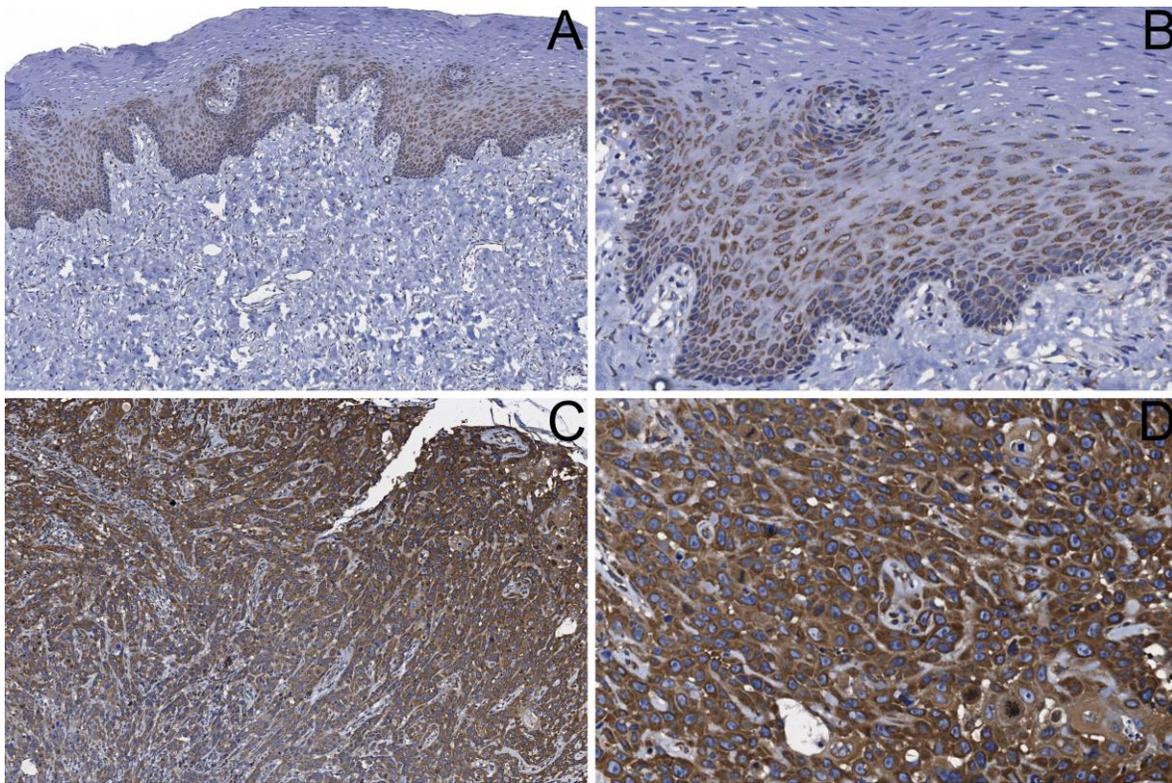


Figura 21 – Imunopositividade de EEF1D no epitélio oral normal (A) (aumento 140x). Em maior aumento é possível observar a marcação citoplasmática e perinuclear e predominantemente na camada parabasal (B) (aumento 300x). Em (C) e (D), note a marcação citoplasmática mais intensa e difusa em todo componente tumoral invasivo do CEC oral (aumento 140x e 300x, respectivamente, em C e D) (ScanScope CS, Aperio).

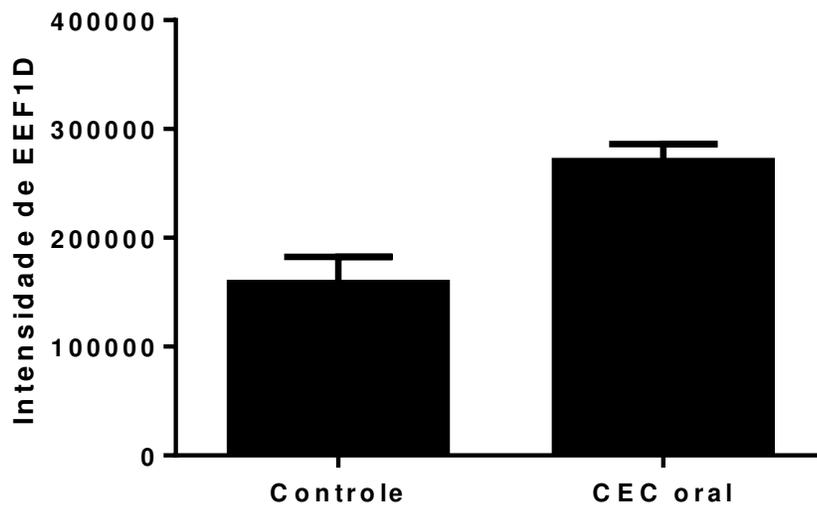


Figura 22 – Intesidade de marcação da proteína EEF1D na amostra de 12 casos de CEC e mucosa oral normal. Observe a maior marcação no tumor em comparação aos casos controle ($p=0,0014$). A intensidade de marcação foi calculada por pixel a partir de 5 *hot spots* padronizadas com auxílio do ScanScope CS (Aperio).

6. DISCUSSÃO

6.1. A eficiência da associação da microdissecção a laser, espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática na descoberta de potenciais biomarcadores para o CEC oral

A taxa de descoberta de biomarcadores com utilização clínica de rotina ainda é um desafio para a grande maioria dos cânceres, inclusive para o CEC oral, devido principalmente à falta de especificidade dos marcadores para cada tipo de câncer, as diferenças individuais entre os tumores e a heterogeneidade dos tecidos tumorais (Jemal *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2012). Tais aspectos reforçam a necessidade de investigar também os possíveis papéis biológicos associados a estas moléculas para a melhor compreensão, como foi realizado em nosso estudo, com relação à carcinogênese oral.

O perfil dos pacientes deste estudo foi de homens, na sexta década de vida, fumantes (n=13) ou ex-fumantes (n=6), etlistas (n=10) ou ex-etlistas (n=3), com lesões de CEC oral, principalmente, em borda lateral de língua (n=10) e tumores moderadamente diferenciados (n=12) (Tabela 6). Bitu *et al.* (2012), Lohavanichbutr *et al.* (2012) e Souza Setubal Destro *et al.* (2012) também estudaram uma amostra de pacientes com CEC oral com perfis semelhantes ao do presente estudo o que demonstra a avaliação de pacientes com perfil clássico em inúmeros estudos na busca de potenciais biomarcadores para essa neoplasia.

O fluxograma de trabalho experimental utilizado foi baseado na associação de ML a LC-MS/MS (Figura 11) e bioinformática para análise de 10 pares de tecido fresco de CEC oral e mucosa oral normal na busca de potenciais biomarcadores. Esse estudo mostrou a identificação de 2529 proteínas para o CEC oral com uma taxa de falso positivo menor que 1%. Patel *et al.* (2008) associaram ML e MS para análise *label free* de 12 amostras de CEC oral e 4

amostras de mucosa oral normal parafinizadas e foi possível identificar 2271 proteínas como potenciais biomarcadores para o CEC oral. Negishi *et al.* (2009) associaram ML a LC-MS/MS através de uma análise *label free* para o estudo de 10 pares de amostras de CEC e mucosa oral normal parafinizadas e 72 potenciais biomarcadores foram identificados com expressão diferenciada para esta neoplasia. Chi *et al.* (2009) utilizaram ML e MS associadas à marcação com ITRAQ em 3 pares de amostras de tecido fresco de CEC oral e mucosa oral normal e 1233 proteínas foram identificadas. Liu *et al.* (2012) utilizaram uma metodologia semelhante com análise *label-free* em amostras teciduais para identificação de biomarcadores para o câncer de mama e 2265 proteínas foram identificadas. Por sua vez, Chang *et al.* (2011) também utilizaram a associação de ML a LC-MS/MS através da marcação com iTRAQ em amostras teciduais de CEC oral e de linfonodos metastáticos e 2901 proteínas foram identificadas com o mesmo objetivo. Logo, é possível afirmar que tal abordagem é uma estratégia eficiente na identificação de um grande número de potenciais biomarcadores para o câncer.

Dados proteômicos com alta reprodutibilidade foram obtidos pela quantificação *label-free* dos espectros gerados como empregado também nos estudos de Liu *et al.*, 2012 e Shapiro *et al.*, 2012. Paralelamente, cabe salientar que a combinação da ML a MS permite a detecção de proteínas expressas somente pelo componente epitelial tumoral, pois o emprego da ML possibilita o isolamento de populações homogêneas de células a partir de amostras complexas de tecido, tais como as de biópsias congeladas de CEC oral. Conseqüentemente, este isolamento do epitélio neoplásico como foi realizado em nosso estudo permitiu a detecção pela proteômica *Shotgun* de proteínas presentes neste tecido o que pode melhorar a compreensão dos mecanismos celulares associados ao conjunto de proteínas que estavam presentes no epitélio sem interferências de proteínas do tecido conjuntivo (Patel *et al.*, 2008).

Outra estratégia importante deste estudo foi o uso de ferramentas estatísticas e de bioinformática avançadas para trabalhar com grandes quantidades de dados a fim de encontrar um painel de proteínas potenciais biomarcadores que possam contribuir para o melhor entendimento do CEC oral. Para isso, o teste *t* Student ($p < 0,05$) e a razão da contagem dos espectros das proteínas (razão $> 1,5$) foram realizados paralelamente as análises multivariadas por PLS-DA e por SVM permitindo assim o estudo de todas as proteínas identificadas por LC-MS/MS de maneira combinada e de certa forma original para o estudo de CEC oral. 24 potenciais biomarcadores proteicos foram segregados para o CEC oral através da análise por PLS-DA no nosso estudo (Tabela 9). Zhou *et al.* (2009) utilizaram PLS-DA e obtiveram a segregação de 5 metabólitos séricos potenciais biomarcadores para o diagnóstico precoce do CEC oral. Farshidfar *et al.* (2012) também utilizaram a análise por PLS-DA para segregação 124 metabólitos séricos como potenciais marcadores de metástase para o câncer colorretal. Zhang *et al.* (2012) utilizaram MS associada a análise por PLS-DA e 12 metabólitos séricos marcadores de pacientes com alto risco foram segregados para câncer esofágico. Logo, é possível afirmar que o modelo por PLS-DA é vantajoso, pois permite a partir de um grande número de proteínas iniciais identificadas por MS segregar marcadores exclusivos para a classe tumoral em relação ao controle, aumentando as chances e confiabilidade de identificação de um biomarcador realmente relacionado ao câncer (Figura 12).

No presente estudo, a análise multivariada por SVM também foi empregada como modelo adicional à análise por PLS-DA para segregação dos marcadores entre as classes CEC e mucosa oral normal (Figura 13) e 24 potenciais biomarcadores foram segregados para o CEC oral por esse modelo (Tabela 9). Os valores de acurácia, sensibilidade, especificidade e valor preditivo do modelo SVM para o nosso estudo foram, respectivamente, de 90%, 80%, 100% e 100%. Zhong *et al.* (2008) associaram o ensaio de ELISA a análise por SVM para detectar marcadores séricos auxiliares no diagnóstico do CEC oral no qual 5

potenciais marcadores foram sugeridos por esse modelo. A acurácia, sensibilidade, especificidade e valor preditivo do modelo SVM para esse estudo foram de 88,54%, 93,13%, 84,05% e 92,57%, respectivamente. Han *et al.* (2012) identificaram 3 potenciais biomarcadores séricos associados à resistência a quimioterapia para o câncer pulmonar de pequenas células através da associação da proteômica baseada em MS a da análise multivariada por SVM. Neste estudo, o modelo classificador por SVM separou os biomarcadores com uma sensibilidade de 92,4% e uma especificidade de 92,5%. Zhai *et al.* (2012) também associaram MS à análise por SVM para distinguir marcadores séricos para o câncer esofágico de marcadores para lesões pré-malignas e 5 potenciais biomarcadores foram discriminados para essa neoplasia através desse modelo. Logo, tal modelo de análise apresenta-se como uma poderosa ferramenta com alta acurácia, especificidade e sensibilidade para classificação e discriminação de marcadores em estudos com um pequeno número de amostras de alta complexidade, tais como as de CEC oral.

Além disso, cabe salientar que de modo geral, as análises multivariadas por PLS-DA e SVM contribuíram para sugestão de possíveis biomarcadores específicos para o CEC oral (Tabela 9). Portanto, a estratégia empregada neste estudo de construção desses dois modelos demonstrou ser relevante, pois ampliou o número de proteínas indicadas como marcadores para o CEC oral tendo em vista que muitas proteínas indicadas como biomarcadores em um modelo não foram indicadas pelo outro modelo o que demonstra que um modelo foi complementar ao outro (Tabela 9). Somado a isso, o presente estudo foi pioneiro em associar MS com análises multivariadas por PLS-DA e SVM em amostras teciduais microdissecadas para identificação de potenciais biomarcadores para o CEC oral, fato que fortalece a complexidade do fluxo de trabalho utilizado.

Para demonstrar graficamente nossos resultados, um *heat map* também foi construído com a lista de proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$, razão

>1,5) em associação com os potenciais biomarcadores classificados por PLS-DA e SVM o que permitiu a observação através de *clusters* do nível de expressão das proteínas entre as amostras comparadas em nosso estudo (CEC e mucosa oral normal). Yang *et al.* (2012) construíram um *heat map* com os potenciais biomarcadores obtidos pela análise *label-free* e também observaram a formação dos *clusters* de proteínas para o câncer colorretal e para o tecido normal. Logo, é possível afirmar que a construção de um *heat map* permite a visualização gráfica colorida da relação existente entre os potenciais biomarcadores identificados e as amostras do estudo levando em consideração a abundância das proteínas em cada condição.

O software *Ingenuity* finalmente permitiu integrar os dados da proteômica baseada em MS através da construção de redes biológicas (Figura 15 e 16) para as 107 proteínas obtidas pelo teste *t* Student com $p < 0,05$ e razão $> 1,5$ (Tabela suplementar 1) e para as 40 e 70 proteínas segregadas, respectivamente, pelas análises multivariadas por PLS-DA e SVM (Tabela suplementar 2) destacando as conexões diretas entre os biomarcadores com expressão diferenciada selecionados por este software (Tabela 10). Cabe salientar que a alta complexidade e a natureza dinâmica da biologia das redes (Bensimon *et al.*, 2012) contribuíram para decifrar a assinatura dos candidatos a biomarcadores no CEC oral que podem ter um papel na biologia desta neoplasia. Entre as funções relacionadas com os marcadores dentro das redes são à sinalização célula-célula e a interação, o desenvolvimento do câncer, a replicação do DNA, a recombinação e o reparo, a movimentação e a organização celular, a morte celular e a sobrevivência podem ser processos cruciais e interdependentes a serem investigados na carcinogênese oral.

De maneira semelhante ao nosso estudo, diversos estudos utilizaram as redes geradas pelo *Ingenuity* para buscar interações biológicas relevantes associadas às proteínas diferencialmente expressas para diferentes tipos de neoplasia. Van Houdt *et al.* (2011) analisaram 32 proteínas superexpressas em

câncer colorretal e uma rede relacionada com a apoptose foi identificada. Nipp *et al.* (2011) analisaram 92 proteínas superexpressas em câncer da tireóide e identificadas por MS para descobrirem uma forte relação de todos os candidatos a biomarcadores com a via do fator de necrose tumoral beta (TNF- β) de transição epitélio-mesênquima. Em nosso estudo, as integrinas, potenciais biomarcadores para o CEC oral já foram descritas como moléculas importantes e relacionadas com a via de transição epitélio-mesênquima (Salo *et al.*, 1991; Felding-Habermann B, 2003). Liu *et al.* (2012) analisaram 287 proteínas diferencialmente expressas a partir de linhagens celulares de câncer cervical e uma importante rede relacionada com a apoptose e com o controle do ciclo celular foi sugerida pelo *Ingenuity*. Davalieva *et al.* (2012) indicaram 50 proteínas diferencialmente expressas de 5 amostras teciduais de câncer de mama e redes relacionadas ao metabolismo celular foram sugeridas para esta neoplasia. Logo, através da aplicação dessa ferramenta de bioinformática, é possível desenhar redes biológicas e estabelecer um potencial panorama de interação entre as proteínas diferencialmente expressas. Além disso, a apresentação integrada de complexas redes moleculares subjacentes aos diferentes processos neoplásicos (Koehn *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009) pode contribuir para desvendar possíveis caminhos relacionados a carcinogênese, inclusive, oral como foi realizado no nosso estudo.

Importantes vias e processos biológicos para as proteínas candidatas a biomarcadores para o CEC oral foram determinados com auxílio da Ferramenta de Classificação Funcional *DAVID* nos bancos de dados GO e KEGG (Tabela 11). A via de sinalização mediada por integrinas, a adesão focal e a interação do receptor da matriz extracelular (MEC) foram vias significativamente enriquecidas no nosso estudo e previamente destacadas como importantes caminhos relacionados à metástase locorregional do CEC oral através da utilização da ferramenta *DAVID* e fluxo de trabalho semelhante (Chang *et al.*, 2011). Nan *et al.* (2010) também associaram ML a LC-MS/MS e utilizaram a ferramenta *DAVID* para interpretar a função biológica das proteínas identificadas e obtidas a partir de 6 amostras

teciduais de câncer de pulmão. Entre os inúmeros processos biológicos, a adesão celular foi associada a esta neoplasia. Portanto, é possível afirmar que esta ferramenta de classificação é útil na categorização de potenciais biomarcadores obtidos de estudos sobre câncer que utilizam dados em larga escala como principal metodologia devido à geração de uma grande quantidade de moléculas com potencial biológico a ser investigado. Além disso, tal ferramenta permite não somente a identificação de procesos biológicos e vias enriquecidas, mas também de outras proteínas que podem estar associadas na mesma via a fim de compor um painel de marcadores para câncer. Diversas moléculas pertinentes podem ao mesmo tempo participar de funções distintas e compartilharem de funções biológicas comuns, como foi observado em nosso estudo (Tabela 11). Vale ressaltar que no caso do CEC oral a heterogeneidade desta neoplasia pode ser melhor compreendida através da análise das proteínas agrupadas de acordo com funções biológicas e moleculares sugeridas por essa ferramenta, pois é mais racional e eficiente relacionar módulos biológicos de interesse do que relacionar centenas de moléculas individuais (Huang *et al.*, 2007).

Portanto, todas as ferramentas utilizadas mostraram ser de grande valia para o enriquecimento dos resultados de proteômica baseada em MS, pois cada uma indicou de maneira complementar, usando algoritmos particulares, proteínas adicionais, possibilitando a ampliação do número de potenciais biomarcadores para o CEC oral. Além disso, cabe salientar que algumas moléculas já foram identificadas previamente em diversos tipos de câncer, inclusive oral, o que indica a força e robustez do fluxo de trabalho aplicado neste estudo (Tabela 12).

Tabela 12- Potenciais biomarcadores para o CEC oral identificados através da associação de ML a LC-MS/MS seguida por análises de bioinformática.

IPI ID	Gene	Proteína	p<0,05 Razão>1,5	Ingenuity	GO/ KEGG	PLS- DA	SVM	Características dos potenciais biomarcadores identificados por MS	Validação por ensaio funcional	Citações
IPI00450768	KRT17	Queratina tipo I citoesquelético 17	✓	✓		✓	✓	Biomarcador tecidual para o CCE de pulmão Expressão aumentada em CEC oral Superexpressão em CCE esofágico	IHQ -	Poschmann <i>et al.</i> , 2009 Thiel <i>et al.</i> , 2011 Zhang <i>et al.</i> , 2012
IPI00550385	MACF1	Isoforma 1 do microtúbulo de actina ligação cruzada fator 1, isoformas 1/2/3/5	✓		✓	✓	✓	-		
IPI00010214	S100A14	Proteína S100-A14	✓			✓	✓	Potencial biomarcador para CCE de cabeça e pescoço Proteína com expressão diferenciada e potencialmente envolvida na malignização da leucoplasia oral	-	Ralhan <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2009
IPI00011200	PHGDH	D-3-fosfoglicerato desidrogenase	✓			✓	✓	-		
IPI00017726	HSD17B10	Isoforma 1 de 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase tipo 2	✓			✓	✓	-		
IPI00025512	HSPB1	Proteína do choque térmico beta-1				✓	✓	Potencial biomarcador para o câncer de fígado Potencial envolvimento em resposta a processos regulatórios no câncer de mama Proteína diferencialmente expressa em CEC oral e de outras localizações da cabeça e pescoço	- - - WB	Darby <i>et al.</i> , 2011 Jia & Souchelnytskyi, 2011 Polachini <i>et al.</i> , 2012 Outras referências Tabela 6
IPI00063234	PRKAR2A	Proteína quinase, cAMP dependente, regulatória, tipo II, alfa, isoforma CRA_b	✓			✓	✓	-		
IPI00297550	F13A1	Fator de coagulação XIII cadeia A	✓			✓	✓	Potencial biomarcador para o câncer de mama	-	Rezaul <i>et al.</i> , 2010
IPI00909657	-	cDNA FLJ50378, altamente similar a fenilalanina-tRNA sintetase cadeia alfa	✓			✓	✓	-		
IPI00004310	LYPD3	Ly6/PLAUR domínio contendo proteína 3	✓			✓		-		
IPI00174775	KRT73	Isoforma 1 da queratina tipo II citoesquelético 73	✓			✓			-	
IPI00298057	PPL	Periplakin	✓	✓		✓		Potencial biomarcador de metástase locorregional em CCE esofágico	WB	Hatakeyama <i>et al.</i> , 2006

IPI00419215	α2ML1	Alfa 2 macroglobulina semelhante a Proteína 1	✓			✓		Protease inibitória da saliva associada a diversas patologias incluindo o CEC oral	-	Sun <i>et al.</i> , 2009
IPI00479145	KRT19	Queratina tipo I citoesquelal 19	✓	✓		✓		Potencial biomarcador para o câncer de pulmão Expressão diferenciada em câncer de cólon Expressão aumentada em CEC oral	-	Gharib <i>et al.</i> , 2002 Hamelin <i>et al.</i> , 2011 Thiel <i>et al.</i> , 2011
IPI00550364	PGM2	Fosfoglucomutase-2	✓			✓		Expressão diferenciada em meningiomas	-	Saydam <i>et al.</i> , 2010
IPI00843765	SPTAN1	Isoforma 3 de espectrina cadeia alfa, cérebro	✓			✓		-		
IPI00909657	-	cDNA FLJ50378, altamente similar a fenilalanina-tRNA sintetase cadeia alfa	✓			✓		-		
IPI00930614	GUCA1B	Proteína GUCA1B (Fragmento)	✓			✓				
IPI01009416	-	cDNA FLJ53421, altamente similar a Homo sapiens família de proteína de ligação guanilato, membro 6 GBP6, mRNA	✓			✓		-		
IPI00006052	PFDN2	Prefoldin subunidade 2	✓			✓				
IPI00009841	EWSR1	RNA ligado a proteína EWS isoforma 1	✓			✓		-		
IPI00017672	-	cDNA FLJ25678 fis, clone TST04067, altamente similar a PURINA NUCLEOSÍDEO FOSFORILASE	✓			✓		-		
IPI00019502	MYH9	Isoforma 1 da	✓		✓	✓		Expressão diferenciada em amostras parafinizadas de câncer pancreático		Paulo <i>et al.</i> , 2012

		Miosina 9									
IPI00019906	BSG	Isoforma 2 de Basigin	✓			✓		-			
IPI00027422	ITGB4	Isoforma Beta-4C da Integrina beta-4	✓	✓	✓	✓		Papel crítico de adesão celular no câncer de cólon	Ensaio de adesão celular	Pouliot <i>et al.</i> , 2000	
IPI00163187	FSCN1	Fascin	✓	✓		✓		Potencial biomarcador para diferenciação da gradação histológica para o carcinoma pancreático Biomarcador para cancer de pulmão aprovado pela FDA Potencial biomarcador para CCE de cabeça e pescoço	- IHQ -	Lu <i>et al.</i> , 2004 Craven <i>et al.</i> , 2006 Polanski & Anderson, 2007 Ralhan <i>et al.</i> , 2008	
IPI00219678	EIF2S1	Fator eucariótico de iniciação da tradução 2 subunidade 1	✓			✓		-			
IPI00220573	MYL12A	Miosina regulatória cadeia 12A	✓		✓	✓		-			
IPI00302592	FLNA	Isoforma 2 da Filamina A	✓		✓	✓		Potencial biomarcador de diagnostic para o cancer de próstata Potencial biomarcador para CCE de cabeça e pescoço	WB -	Lin <i>et al.</i> , 2007 Chi <i>et al.</i> , 2009	
IPI00306436	STAT3	Isoforma Del-701 do sinal de transdução e ativador da transcrição 3	✓		✓	✓		-			
IPI00398779	PLEC	Isoforma 4 da Plectina	✓			✓		Potencial biomarcador de prognóstico para o CCE de cabeça e pescoço promovendo a migração e invasão das células neoplásicas	WB, IHQ, silenciamento gênico e ensaios funcionais	Katada <i>et al.</i> , 2012	
IPI00550689	C22orf28	tRNA <i>splicing</i> RtcB ligase homóloga	✓			✓		-			
IPI00646839	-	Proteína não caracterizada	✓			✓					
IPI00654605	MAP7D1	Isoforma 1 de MAP7 contendo domínio proteína 1	✓			✓		-			
IPI00719752	EIF3B	Isoforma 2 do fator eucariótico de iniciação da tradução 3	✓			✓		-			

		subunidade B								
IPI00880007	MAP	Microtúbulo associado a proteína	✓			✓		-		
IPI00900293	FLNB	Filamina B isoforma 1	✓	✓	✓	✓		Potencial biomarcador para CCE de cabeça e pescoço Expressão diminuída em linhagem celular de leucemia mielóide Expressão aumentada em câncer de cólon		Chi <i>et al.</i> , 2009 Burande <i>et al.</i> , 2009 Fan <i>et al.</i> , 2012
IPI00922838	-	cDNA FLJ56074, altamente similar a proteína reguladora do oxigênio 150kDa	✓			✓		Supereexpressão em condições de hypóxia como em tumores malignos Fator angiogênico promovendo a progressão tumoral	-	Boraldi <i>et al.</i> , 2007
IPI00947127	LDHA	L-lactato desidrogenase cadeia A isoforma 3	✓			✓		-		
IPI01009986	EEF1D	Fator eucariótico de alongação delta 1	✓			✓		Potencial inibidor de proteína quinase alvo de terapia para o câncer Relacionada com invasão em CCE de pulmão Expressão aumentada em CEC oral Potencial biomarcador para câncer de cólon	- - - qRT-PCR IHQ WB	Keenan <i>et al.</i> , 2009 Gyenis <i>et al.</i> , 2011 Polachini <i>et al.</i> , 2012 Shen <i>et al.</i> , 2013
IPI00001723	ATP10D	Isoforma 1 provável transportadora de fosfolípido ATPase VD	✓				✓	-		
IPI00002441	SDC1	Syndecan 1					✓	Promove migração na linhagem de CEC oral SCC-9	qRT-PCR Ensaio funcional Imunofluorescência	Aragão <i>et al.</i> , 2012
IPI00008943	DDX19B	Isoforma 1 de ATP dependente RNA helicase DDX19B					✓	-		
IPI00011306	CCDC130	Espiral enrolada do domínio contendo proteína 130					✓	-		
IPI00021885	FGA	Isoforma 1 do Fibrinogênio cadeia alfa					✓	-		
IPI00021891	FGG	Isoforma Gama B de fibrinogênio cadeia gama	✓				✓	Diferencialmente expressa no sangue de pacientes com carcinoma hepatocelular	-	Chen <i>et al.</i> , 2011
IPI00022394	C1QC	Complemento C1q subcomponente subunidade C					✓	-		
IPI00164441	-	Proteína 202 kDa					✓	-		
IPI00174345	SPAG17	Esperma associado a antígeno 17					✓	-		

IPI00247295	SYNE1	Isoforma 4 de Nesprin-1					✓	-		
IPI00294728	DMXL1	DmX semelhante a proteína 1					✓	-		
IPI00298497	FGB	Fibrinogênio cadeia beta	✓				✓	Proteína com expressão diferenciada e potencialmente envolvida na malignização da leucoplasia oral	-	Wang <i>et al.</i> , 2009
IPI00298971	VTN	Vitronectina					✓	Potencial biomarcador sérico de diagnóstico para o câncer de mama	WB IHQ ELISA	Kadowaki <i>et al.</i> , 2011
IPI00329213	INPP5D	Isoforma 1 de fosfotidilinositol 3, 4, 5 trifosfato 5 fosfatase 1	✓				✓	-		
IPI00329672	MYO1E	Miosina-Ie					✓	-		
IPI00465038	FBLN2	Isoforma 2 de Fibulina 2					✓	-		
IPI00644231	CYFIP1	Isoforma 1 de citoplasmático FMR1 proteína 1 de interação					✓	-		
IPI00783859	VPS13D	Isoforma 2 de proteína vacuolar associada a proteína 13D					✓	-		
IPI00789008	FLOT2	Flotillin 2					✓	-		
IPI00941907	STRAP	Serina treonina quinase receptor associada a proteína					✓	Envolvida na progressão tumoral do Sarcoma de Ewing	WB	Anumanthan <i>et al.</i> , 2006
IPI00967744	-	Proteína não caracterizada					✓	-		
IPI01012107	-	Proteína não caracterizada					✓	-		
IPI00003833	MTCH2	Mitocondrial transportadora homóloga 2					✓	-		
IPI00003968	NDUFA9	NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 alfa subcomplexo subunidade 9, mitocondrial	✓				✓	-		
IPI00006077	PHF16	Proteína Jade 3					✓	-		
IPI00008359	KRT76	Queratina, tipo II citosquelal 2 oral					✓	-		

IPI00008964	RAB1B	Ras proteína relacionada a Rab-1B					✓	-		
IPI00009883	CYP39A1	24-hidroxicolesterol 7 alfa hidroxilase					✓	-		
IPI00009896	EPHX1	Epóxido hidrolase 1					✓	-		
IPI00012772	RPL8	60S ribosomal proteína L8					✓	-		
IPI00012998	CPSF6	Isoforma 1 do fator de clivagem e poliadenilação subunidade 6					✓	Diferencialmente expressa em linhagens celulares de câncer de colon	WB	Larriba <i>et al.</i> , 2010
IPI00018931	VPS35	Proteína vacuolar associada a proteína 35					✓	-		
IPI00020987	PRELP	Prolargin	✓	✓			✓	Expressão diminuída em câncer de colorretal	-	Fan <i>et al.</i> , 2012
IPI00021369	CRYAB	Alfa cristalina cadeia B	✓	✓			✓	Proteína com expressão diferenciada e potencialmente envolvida na malignização da leucoplasia oral Potencial biomarcador para CCE de cabeça e pescoço	-	He <i>et al.</i> , 2004 Turhani <i>et al.</i> , 2006 Lo <i>et al.</i> , 2007 Wang <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2009
IPI00023591	PURA	Transcricional ativador da proteína Pur-alfa					✓	Associada com a progressão de adenoma para carcinoma colorretal	-	Albrethsen <i>et al.</i> , 2010
IPI00024320	RBM3	RNA de ligação proteína 3					✓	-		
IPI00024705	GIPC1	PDZ domínio contendo proteína GIPC1					✓	-		
IPI00024993	ECHS1	Enoil-CoA hidratase, mitocondrial	✓				✓	Expressão diferenciada em câncer renal Potencial biomarcador para câncer gástrico	-	Hwa <i>et al.</i> , 2005 Kocevar <i>et al.</i> , 2012
IPI00030363	ACAT1	Acetil-CoA acetiltransferase, mitocondrial					✓	-		
IPI00031420	UGDH	UDP-glucose 6 desidrogenase					✓	Superexpressa em linhagem celular de câncer de cólon	-	Van Houdt <i>et al.</i> , 2011

IP100031508	DHX8	ATP-dependente RNA helicase DHX8					✓	-		
IP100103242	POF1B	Isoforma 1 da Proteína POF1B	✓				✓	Proteína salivar humana com potencial de diagnóstico para o câncer bucal	-	Yan <i>et al.</i> , 2009
IP100218728	PFAH1B1	Isoforma 1 do fator ativador de plaquetas subunidade alfa acetil hidrolase IB subunidade alfa					✓	Expressão diferenciada em linhagens celulares e potencial biomarcador de metástase em câncer de mama	-	Kreunin <i>et al.</i> , 2007
IP100220059	NDUFB4	NADH desidrogenase [ubiquinona] beta 1 subcomplexo subunidade 4					✓	-		
IP100220373	IDE	Insulina enzima de degradação					✓	-		
IP100290032	TRPM7	Potencial receptor transitório canal catiônico subfamília M membro 7					✓	-		
IP100293590	MGLL	Monoglicerídeo lipase isoforma 1					✓	-		
IP100294779	VDAC2	Isoforma 2 do canal aniônico voltagem dependente seletivo proteína 3					✓	-		
IP100298406	HADH	Isoforma 2 da hidroxiacil coenzima A desidrogenase, mitocondrial	✓				✓	-		
IP100301250	EPS8L2	Isoforma 1 do fator de crescimento epidérmico receptor quinase substrato 8 semelhante a					✓	Expressão sérica aumentada em pacientes com câncer pancreático	-	Yu <i>et al.</i> , 2009

		proteína 1								
IPI00305383	UQCRC2	Complexo citocromo b-c1 subunidade 2, mitocondrial	✓				✓	-		
IPI00394758	ALDH3A2	Isoforma 2 da desidrogenase aldeído graxo	✓	✓			✓	-		
IPI00440493	ATP5A1	ATP sintase subunidade alfa, mitochondrial					✓	-		
IPI00445152	-	Isoforma 2 da proteína não caracterizada C18orf54					✓	-		
IPI00555580	TRPV3	Isoforma 2 do receptor transitório do canal catiônico subfamília V membro 3					✓	-		
IPI00739902	MIA3	Isoforma 2 da proteína 3 com atividade inibitória, Melanoma					✓	-		
IPI00741772	STARD13	Isoforma 4 de StAR relacionada com a transferência, proteína 13					✓	-		
IPI00744692	TALDO1	Transaldolase	✓				✓	Potencial biomarcador para câncer gástrico	WB	Kocevar <i>et al.</i> , 2012
IPI00873899	ABCF1	Isoforma 1 de ATP de ligação subfamília membro 1					✓	-		
IPI00925578	DNAH14	Isoforma 4 de Dynein cadeia pesada 14, axonemal					✓	-		

IPI00985430	-	Proteína não caracterizada					✓	-		
IPI00216225	ITGA6	Isoforma Alfa-6X1X2A da Integrina alfa-6	✓	✓	✓			Potencial biomarcador relacionado ao rompimento da camada basal e invasão em câncer de próstata	-	Khamis <i>et al.</i> , 2010
IPI00376344	MYO1B	Isoforma 1 da Miosina-Ib	✓	✓				-		
IPI00007244	MPO	Isoforma H17 da Mieloperoxidase	✓	✓				-		
IPI00032140	SERPINH1	Serpina H1	✓	✓				Potencial biomarcador relacionado com a angiogênese em câncer de mama	-	Hill <i>et al.</i> , 2011
IPI00220194	SLC2A1	Família transportadora de soluto 2, transportador de glicose, membro 1	✓	✓	✓			-		
IPI00031008	TNC	Isoforma 1 da Tenascina	✓		✓			-		
IPI00010154	GDI1	Rab GDP dissociação inibidor alfa	✓					-		
IPI00396321	LRRC59	Proteína de repetição rica em Leucina contendo 59	✓					Potencial biomarcador de metástase para o câncer de mama	IHQ	Terp <i>et al.</i> , 2012
IPI00013976	LAMB1	Laminina subunidade beta-1	✓		✓			-		
IPI00796705	-	cDNA FLJ55990, altamente similar ao domínio LIM e proteína de ligação a actina 1	✓					-		
IPI00759776	ACTN1	Alfa-actinina-1 isoforma A	✓		✓			Potencial biomarcador para o diagnóstico e estratificação de grupos de risco para os sarcomas de tecidos moles	-	Suehara <i>et al.</i> , 2006

IPI00794900	-	cDNA FLJ56016, altamente similar a C-1-tetrahydrofolato sintase, citoplasmática	✓					-		
IPI00783097	GARS	Glicil-tRNA sintetase	✓					-		
IPI00007928	PRPF8	Pré-mRNA do processamento do <i>splicing</i> fator 8	✓					-		
IPI00012268	PSMD2	Proteossoma 26S não-ATPase reguladora subunidade 2	✓					-		
IPI00217563	ITGB1	Isoforma Beta-1A da integrina beta-1	✓		✓			-		
IPI00880007	KIF5B	Quinesina-1 cadeia pesada	✓					Potencial biomarcador associado a resistência a quimioterapia com paclitaxel em câncer de mama		Froidevaux-Klipfel <i>et al.</i> , 2011
IPI00329801	ANXA5	Anexina A5	✓					Potencial biomarcador para CCE de cabeça e pescoço Potencial biomarcador e alvo terapêutico para o câncer de mama, pâncreas e laringe	-	Chen <i>et al.</i> , 2004 Kohen <i>et al.</i> , 2008 Deng <i>et al.</i> , 2013
IPI00006379	NOP58	Proteína nucleolar 58	✓					-		
IPI00027626	CCT6A	Complexo T proteína 1 subunidade zeta	✓					-		
IPI00010779	TPM1	Isoforma 1 da Tropomiosina alfa-4	✓		✓			Expressão diminuída em câncer renal Expressão aumentada em CEC oral Expressão associada a presença de metástase locorregional em CEC oral	-	Hwa <i>et al.</i> , 2005 Polachini <i>et al.</i> , 2012 Thiel <i>et al.</i> , 2011
IPI00549248	NPM1	Isoforma 1 da Nucleofosmina	✓					Expressão aumentada em câncer de cólon	IHQ	O'Dwyer <i>et al.</i> , 2011
IPI00607645	SUDS3	Sin3 histona desacetilase corressora complexo componente SDS3	✓					-		

IPI00973733	IFT88	Isoforma 3 da proteína de transporte Intraflagellar 88 homóloga	✓					-		
IPI00071180	UBQLN1	Isoforma 2 da Ubiquilin-1	✓					-		
IPI00639931	CAP1	Isoforma 2 da adenilil ciclase associada à proteína 1	✓		✓			Expressão aumentada em CEC oral	-	Thiel <i>et al.</i> , 2011 Polachini <i>et al.</i> , 2012
IPI01010281	DNM1L	Proteína semelhante à Dinamin 1, isoforma CRA_c	✓					-		
IPI00395676	UGP2	Isoforma 2 da UTP glicose-1-fosfato uridililtransferase	✓					-		
IPI00024821	PSMD14	Proteossoma 26S não-ATPase regulatória subunidade 14	✓					-		
IPI00025491	EIF4A1	Fator eucariótico de iniciação 4A-I	✓					-		
IPI00031023	FLII	Homóloga da proteína <i>flightless</i> 1	✓					-		
IPI00021812	AHNAK	Neuroblasto de diferenciação associada à proteína AHNAK	✓					-		
IPI00021828	CSTB	Cistatina-B	✓					Expressão diminuída em CEC de esôfago		Zhang <i>et al.</i> , 2011
IPI00012069	NQO1	NADPH desidrogenase [quinona] 1	✓					-		
IPI00759663	PRDX5	Isoforma Citoplasmática	✓					Potencial biomarcador para CCE de cabeça e pescoço		Staab <i>et al.</i> , 2007 Wang <i>et al.</i> , 2008

		peroxissomal de Peroxiredoxin-5, mitocondrial								Ralhan <i>et al.</i> , 2008
IPI00399115	PTAR1	Proteína preniltransferase alfa subunidade 1	✓					-		
IPI00029510	LY6D	Antígeno de linfócito 6D	✓					-		
IPI00003798	ZNF282	Proteína zinc finger 282	✓					-		
IPI00010130	GLUL	Glutamina sintetase	✓					Potencial biomarcador sérico de diagnostic para o carcinoma hepatocellular	WB IHQ	Long <i>et al.</i> , 2010
IPI00304962	COL6A2	Colágeno cadeia alfa-2I	✓					Proteína com expressão diferenciada em CEC oral	-	Polachini <i>et al.</i> , 2012
IPI00082931	SPRR3	Pequena proteína rica em prolina 3	✓					-		
IPI00023711	EVPL	Envoplakin	✓					-		
IPI00477227	KRT78	Isoforma 1 de queratina, tipo II citoesquelal 78	✓					-		
IPI00479877	ALDH9A1	4-trimetilaminobutiraldeído desidrogenase	✓					-		
IPI00218573	IL1RN	Isoforma 3 da Interleucina-1 proteína antagonista do receptor	✓	✓				Expressão diferenciada em CEC oral		Koike <i>et al.</i> , 2005
IPI00022229	APOB	Apolipoproteína B-100	✓	✓				Potencial biomarcador para o cancer de ovário Potencial biomarcador sérico para o câncer de pancreas	WB	Li <i>et al.</i> , 2008 Yue <i>et al.</i> , 2011
IPI00329108	SCEL	Isoforma 1 da Sciellin	✓	✓				-		

6.2. A potencialidade do fator eucariótico de alongação delta 1 como biomarcador para o CEC oral

Evidências sugerem que a atividade dos fatores de tradução exerce um papel importante na regulação do crescimento celular e vários estudos têm demonstrado a relação entre a atividade dos fatores de tradução, senescência celular e a expressão de oncogenes (Sonenberg *et al.*, 1993; Anand *et al.*, 2003). Entre estes fatores, EEF1D é uma proteína citoplasmática considerada como um fator enzimático mediador do processo de alongação da tradução atuando na transferência de moléculas de aminoacil RNA transportador (tRNA) para o ribossomo 80S através da hidrólise de 5'-trifosfato de guanosina (GTP) (Proud, 1994; Shen *et al.*, 2013). Esta proteína pertence ao complexo fator eucariótico de alongação 1 (EEF1) composto por 4 subunidades: alfa, beta, gama e delta no qual EEF1D interage com EEF1 alfa e EEF1 beta/gama desempenhando sua função alongadora correta para síntese proteica. Entretanto, a expressão anormal de fatores de tradução do complexo EEF1 demonstrou ter efeitos dramáticos no crescimento celular, incluindo transformação e tumorigênese (Ogawa *et al.*, 2004) e a superexpressão de EEF1D em tumores sugere que a transformação maligna *in vivo* exige um aumento da expressão de mRNA dos fatores de tradução e da sua síntese proteica para entrada e transição através do ciclo celular (Shin *et al.*, 2005). Além disso, EEF1D pode funcionar como um protooncogene e, conseqüentemente, como um fator de risco para carcinogênese em tumores quando se apresentam superexpressos (Joseph *et al.*, 2002; Lei *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, entre as inúmeras proteínas com expressão diferenciada no CEC oral, o fator eucariótico de alongação delta 1 (EEF1D) apresentou alta significância estatística pelo teste *t* Student ($p=0,0011$) e razão de expressão entre CEC oral e mucosa normal de 2,3 (Tabela suplementar 1). Esta proteína também foi discriminada como marcadora de classe para o CEC oral na análise por PLS-DA (Tabela 9). Estes resultados somados ao potencial papel de associação com o câncer indicado por alguns estudos prévios de proteômica

baseada em MS para EEF1D (Keenan *et al.*, 2009; Gyenis *et al.*, 2011; Polachini *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2013) levaram a tentativa de explorar melhor a participação desta proteína no câncer bucal e através da validação por WB e IHQ observamos a expressão aumentada de EEF1D para o CEC oral. Por sua vez, na validação através de qRT-PCR nas linhagens celulares foi observada uma maior expressão de mRNA somente da linhagem tumoral SCC-9 em relação a linhagem de queratinócito normal HGK. Previamente, Shuda *et al.* (2000) descobriram que a expressão do mRNA do EEF1D estava aumentada em relação a gradação histológica (de bem diferenciado, moderadamente para pobremente diferenciado) sugerindo um papel associado a diferenciação tumoral no carcinoma hepatocelular. A expressão de mRNA de EEF1D também foi encontrada aumentada em amostras teciduais de pacientes com câncer esofágico e hepatocelular quando comparada ao tecido normal através de análises por RT-PCR e associada à presença de metástase linfonodal, estágio avançado da doença e pobre prognóstico sugerindo um possível papel dessa proteína como biomarcador de prognóstico para esta neoplasia (Shuda *et al.*, 2000; Ogawa *et al.*, 2004). Logo, a futura realização da análise da expressão de mRNA em amostras teciduais de CEC oral em comparação a mucosa oral normal pode agregar resultados adicionais mais precisos a tendência de maior expressão já observada em linhagem celular pelo nosso estudo. Paralelo a isso, cabe salientar, que Joseph *et al.* (2002) sugeriram que fatores etiológicos, tais como, a exposição a certos carcinógenos químicos e o estilo de vida (tabagismo e o etilismo) podem afetar a expressão de EEF1D em pacientes com CEC esofágico e mecanismos moleculares responsáveis pela carcinogênese podem atuar de maneira diferente em tumores que EEF1D está superexpresso em relação aqueles tumores que não se observa a sua superexpressão. Fatores etiológicos semelhantes estão associados aos pacientes com CEC oral podendo também existir alguma associação da expressão de EEF1D e o desenvolvimento dessa neoplasia.

Alguns estudos atuais *in vitro* e *in vivo* que utilizaram a MS como ferramenta na busca de biomarcadores tem citado a expressão de EEF1D e sua associação com o câncer, entretanto, pouco ainda se sabe sobre o seu papel na carcinogênese e seu potencial para utilização clínica de rotina como auxiliar em algum tipo específico de neoplasia. Entre estes estudos, Keenan *et al.* (2009) associaram a expressão de EEF1D com o processo de invasão em uma linhagem celular de CCE de pulmão através da utilização de gel 2D-MALDI-TOF/MS. Por sua vez, Polachini *et al.* (2012), através da utilização de gel 1D-MALDI-TOF-MS/MS, identificaram EEF1D como superexpressa em amostras teciduais de CEC oral. Shen *et al.* (2013) identificaram através de gel 2D-MALDI-TOF/MS a proteína EEF1D superexpressa em amostras teciduais de câncer de cólon e com a validação por qRT-PCR, WB e IHQ foi possível confirmar os resultados da MS e associar a expressão diferenciada de EEF1D aos diferentes perfis proteômicos entre o câncer de cólon do lado direito (maior expressão) e esquerdo (menor expressão) para essa amostra de pacientes.

Assim, é possível afirmar que os resultados do nosso estudo foram adicionais aos resultados presentes na literatura, pois sugere além da proteína EEF1D, um painel de potenciais biomarcadores juntamente com as proteínas que fazem parte da mesma rede de interações e processos biológicos. Entretanto, o papel funcional de EEF1D e dos demais potenciais marcadores deve ser explorado e validado em um maior número de amostras de pacientes. Essas perspectivas podem sugerir potenciais biomarcadores também como alvos terapêuticos. Para isso, a utilização de metodologia de MS para validação quantitativa de alvos de interesse (do inglês *Target Proteomics*) pode ser utilizada para avaliar estes candidatos a biomarcadores com o objetivo de implementação da pesquisa translacional de forma a permitir que o conhecimento previamente obtido em laboratório possa ser usado através de um marcador biológico auxiliar na prática clínica (Gillette & Carr, 2013).

6.3. Outros potenciais biomarcadores relacionados ao CEC oral e suas possíveis funções biológicas

Algumas proteínas integrinas podem ser consideradas também com potencial para biomarcadores no CEC oral, pois apresentaram resultados expressivos nas análises estatísticas e de bioinformática realizadas em nosso estudo. Além disso, evidências sobre a associação dessas moléculas com o câncer já foram observadas em estudos prévios (Missan & DiPersio, 2012; Hunt *et al.*, 2011; Delon *et al.*, 2007). A isoforma alfa-6X1X2A da integrina alfa-6 (ITGA6), a isoforma beta-1A da integrina beta-1 (ITGB1) e a isoforma beta-4C da integrina beta-4 (ITGB4) foram identificadas como superexpressas com razão $>1,5$ e $p < 0,05$ (Tabela suplementar 1) e associadas com alta significância estatística em todas as vias e processos biológicos segundo a ferramenta *DAVID* (Tabela 11). Logo, tais aspectos indicam uma possível participação dessas moléculas na carcinogênese oral.

As integrinas são os principais receptores de superfície celular e estão associadas à aderência à matriz extracelular (MEC), além de serem proteínas importantes para a ativação de vias de transdução de sinal intracelular em resposta a sinais extracelulares que controlam uma grande variedade de funções celulares no tecido normal e patológico (Giancotti *et al.*, 1999; Hynes *et al.*, 2002; Ridley *et al.*, 2003). Tais moléculas também interagem com uma ampla variedade de outras proteínas estruturais mediando a interação entre a MEC e o citoesqueleto e, dessa forma, controlando a forma, a polarização e a motilidade celular (Delon *et al.*, 2007). Além de seu papel fisiológico, as integrinas quando expressas nas células tumorais regulam muitas funções associadas com a transição epitélio-mesênquima que são importantes em todas as fases do desenvolvimento da doença, incluindo a formação inicial do tumor, o crescimento de tumores, a angiogênese, invasão e metástase (Salo *et al.*, 1991; Felding-Habermann B, 2003; Desgrosellier *et al.*, 2010). Logo, as integrinas podem influenciar o comportamento das células do tumor diretamente através da adesão

celular e das funções de sinalização, ou indiretamente, através dos seus efeitos sobre a remodelação da MEC (Missan & DiPersio, 2012). No CEC oral, as células neoplásicas tipicamente difundem-se por invadir através da MEC o interior do sistema linfático levando a metástase locorregional (Ziober *et al.*, 2001). Tal processo é associado com mudanças na expressão de moléculas que mantêm e modificam a MEC, tais como, as integrinas que associadas a outras moléculas sinalizam para o crescimento, diferenciação e capacidade de invasão das células do epitélio oral (Janes & Watt, 2006).

A ITGB1, encontrada superexpressa em CEC oral no nosso estudo, apresenta papel crucial na progressão e metástase do câncer pancreático em estudos com linhagens celulares, que em associação com a sua superexpressão possibilitou a indicação dessa proteína como potencial biomarcador para esta neoplasia (Arao *et al.*, 2000, Grzesiak *et al.*, 2011, Van den Broeck *et al.*, 2012). Zhao *et al.* (2011) também observaram a superexpressão da ITGB1 no sangue de pacientes com câncer gástrico e foi associada a metástase e recidiva da doença. A ITGB4 apresentou um papel crítico associado à adesão celular em células de câncer de cólon (Pouliot *et al.*, 2000) e superexpressão em câncer pancreático (Van den Broeck *et al.*, 2012) e a ITGA6 foi indicada como uma molécula com potencial para biomarcador e relacionada ao rompimento da camada basal e invasão em câncer de próstata (Khamis *et al.*, 2010), além da superexpressão também em câncer pancreático (Van den Broeck *et al.*, 2012). Portanto, um achado interessante do nosso estudo foi a descoberta de 3 proteínas da família das integrinas superexpressas no CEC oral, bem como a associação com inúmeros processos biológicos e vias citadas na literatura, tais como, adesão, motilidade, sinalização mediada por integrinas, ancoragem, migração, regulação do citoesqueleto de actina e interação do receptor da MEC. Tais aspectos confirmam o potencial dessas moléculas como biomarcadores também para o CEC oral.

As proteínas isoforma 1 da miosina 9 (MYH9) e a alfa-actinina-1 isoforma A (ACTN1) também foram encontradas superexpressas no CEC oral

($p < 0,05$ e razão $> 1,5$) e associadas com quase todas as vias e processos biológicos indicados pelo nosso estudo (Tabela 11) e ambas já foram previamente identificadas com expressão aumentada em amostras teciduais de CEC oral através da proteômica baseada em MS (Polachini *et al.*, 2012). A MYH9 também apresentou expressão diferenciada em câncer pancreático (Paulo *et al.*, 2012) e a ACTN1 foi indicada como potencial biomarcador para o diagnóstico e estratificação de grupos de risco em sarcomas de tecidos moles (Suehara *et al.*, 2006). Logo, tais moléculas podem interagir com os demais potenciais biomarcadores e participar, através dessas vias e processos, no desenvolvimento do CEC oral.

As redes geradas pelo *Ingenuity* foram complementares aos demais achados e sugeriram a ativação de 3 entre as 7 maiores vias relacionadas ao câncer: MAP quinase/Erk, NF κ B e PI3K/AKT (Dreesen & Brivanlou, 2007) (Figuras 15 e 16). Tais vias apresentaram-se correlacionadas e ativadas e podem estar envolvidas no desenvolvimento CEC oral como foi sugerido pelas análises do nosso estudo. No estudo de Zeng *et al.*, 2011, o software *Ingenuity* gerou uma rede biológica em que ERK1/2, p38 MAPK e NF κ B também foram as moléculas chave na rede para os resultados da análise de potenciais biomarcadores séricos para o câncer pulmonar através de LC-MS/MS. A via MAPK é desregulada em um amplo espectro de cânceres devido ao seu papel central na proliferação celular sendo que alterações em seus fatores de ativação RAS, RAF e ERK resultam na ativação dessa via e o surgimento de um estado celular hiperproliferativo (Dreesen & Brivanlou, 2007). Mutações em RAS são encontrados em ~45% dos cânceres de cólon e ~90% dos cânceres pancreáticos (Katz *et al.*, 2007). Mutações em RAF, por sua vez, encontram-se em cerca de dois terços de todos os melanomas (Sebolt-Leopold & Herrera, 2004). A superexpressão de ERK foi observada na linhagem de CEC oral HSC-3 e relacionada à mesma via (Hour *et al.*, 2012). A via de NF κ B regula genes envolvidos em processos celulares como proliferação, resposta ao estresse, imunidade inata e inflamação (Brivanlou *et al.*, 2002;

Courtois & Gilmore, 2006.). Mutações e desregulação na via sinalização de NFκB estão envolvidas numa variedade de malignidades de células B como, por exemplo, amplificação desta via em ~ 50% dos linfomas de Hodgkin, ~ 10-20% dos linfomas não Hodgkin e ~ 40% dos linfomas de células T natural killer (Dreesen & Brivanlou, 2007). Por sua vez, a via PI3K/AKT quando ativada tem uma variedade de efeitos no metabolismo celular, na proliferação celular e sobrevivência, existindo uma significativa relação entre essa via e a via NFκB na sinalização da proliferação celular (Dreesen & Brivanlou, 2007), como também foi observado em nossa rede para o CEC oral. A ativação da via PI3K/AKT tem sido observada em vários cânceres como foi observado em câncer de mama, ovário, tireóide (Vivanco & Sawyers, 2002). Além disso, a ativação do mecanismo de transição epitélio-mesênquima necessária para invasão tumoral é sinalizada por uma série de vias tais como a PI3K/AKT e MAPK demonstradas em nosso estudo e esta associação já foi evidenciada em estágios avançados do CEC oral (da Silva *et al.*, 2012). Logo, sugere-se a participação dessas vias quando ativadas no desenvolvimento do CEC oral, entretanto ensaios adicionais são necessários para validação e observação da funcionalidade biológica na carcinogênese oral.

7. CONCLUSÃO

7.1. O fluxo de trabalho utilizado neste estudo foi eficiente na identificação de potenciais biomarcadores e mecanismos biológicos associados ao CEC oral utilizando abordagens complementares de ML, proteômica e bioinformática.

7.2. Esse trabalho indicou um painel de potenciais biomarcadores em importantes processos e vias relacionadas à carcinogênese que pode auxiliar no avanço do conhecimento sobre o desenvolvimento e progressão do CEC oral.

7.3. Entre os candidatos a biomarcadores identificados por MS, a proteína EEF1D foi identificada com maior expressão em CEC oral, sendo essa expressão validada por WB e IHQ. Entretanto, o papel biológico dessa proteína em CEC oral ainda não está completamente estabelecido e uma amostra maior de pacientes deve ser utilizada para que essa proteína possa ser considerada um biomarcador auxiliar no âmbito clínico, seja para o diagnóstico, prognóstico ou como possível alvo terapêutico.

REFERÊNCIAS

-Abrahaao AC, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res.* 2011; 25(1): 34-41.

-Adler JT, Meyer-Rochow GY, Chen H, Benn DE, Robinson BG, Sippel RS *et al.* Pheochromocytoma: current approaches and future directions. *Oncologist.* 2008; 13(7): 779-93.

-Alam H, Bhate AV, Gangadaran P, Sawant SS, Salot S, Sehgal L *et al.* Fascin overexpression promotes neoplastic progression in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2012; 12: 32.

-Albrethsen J, Knol JC, Piersma SR, Pham TV, de Wit M, Mongera S *et al.* Subnuclear proteomics in colorectal cancer: identification of proteins enriched in the nuclear matrix fraction and regulation in adenoma to carcinoma progression. *Mol Cell Proteomics.* 2010; 9(5): 988-1005.

-Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivar biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *OMICS.* 2011; 15(6): 353-61.

-Alves P, Arnold RJ, Novotny MV, Radivojac P, Reilly JP, Tang H. Advancement in protein inference from shotgun proteomics using peptide detectability. *Pac Symp Biocomput.* 2007: 409-20.

-Anand M, Chakraborty K, Marton MJ, Hinnebusch AG, Kinzy TG. Functional interactions between yeast translation eukaryotic elongation factor (eEF) 1A and eEF3. *J Biol Chem.* 2003; 278(9): 6985-91.

* De acordo com a o Manual de Normatização das teses/dissertações da FOP/UNICAMP 2ª edição.

- Antwi K, Hostetter G, Demeure MJ, Katchman BA, Decker GA, Ruiz Y *et al.* Analysis of the plasma peptidome from pancreas cancer patients connects a peptide in plasma to overexpression of the parent protein in tumors. *J Proteome Res.* 2009; 8(10): 4722-31.
- Anumanthan G, Halder SK, Friedman DB, Datta PK. Oncogenic serine-threonine kinase receptor-associated protein modulates the function of Ewing sarcoma protein through a novel mechanism. *Cancer Res.* 2006; 66(22): 10824-32.
- Aragão AZ, Belloni M, Simabuco FM, Zanetti MR, Yokoo S, Domingues RR *et al.* Novel processed form of syndecan-1 shed from SCC-9 cells plays a role in cell migration. *PLoS One.* 2012; 7(8): e43521.
- Arao S, Masumoto A, Otsuki M. Beta1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Pancreas.* 2000; 20(2): 129-37.
- Baker H, Patel V, Molinolo AA, Shillitoe EJ, Ensley JF, Yoo GH *et al.* Proteome-wide analysis of head and neck squamous cell carcinomas using laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry. *Oral Oncol.* 2005; 41(2): 183-99.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2005.
- Beenken SW, Urist MM. Head and Neck Tumors. Current surgery diagnosis and treatment. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2003.
- Bello IO, Vered M, Dayan D, Dobriyan A, Yahalom R, Alanen K *et al.* Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. *Oral Oncol.* 2011; 47(1): 33-8.
- Bence-Jones H. Papers on Chemical Pathology. Lecture III. *Lancet.* 1847; 269-72.
- Bensimon A, Heck AJ, Aebersold R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annu Rev Biochem.* 2012; 81: 379-405.

- Bergman AC, Benjamin T, Alaiya A, Waltham M, Sakaguchi K, Franzén B *et al.* Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2000; 21(3): 679-86.
- Bertucci F, Goncalves A. Clinical proteomics and breast cancer: strategies for diagnostic and therapeutic biomarker discovery. *Future Oncol*. 2008; 4(2): 271-87.
- Bindukumar B, Schwartz S, Aalinkeel R, Mahajan S, Lieberman A, Chadha K. Proteomic profiling of the effect of prostate-specific antigen on prostate cancer cells. *Prostate*. 2008; 68(14): 1531-45.
- Bitu CC, Destro MF, Carrera M, da Silva SD, Graner E, Kowalski LP *et al.* HOXA1 is overexpressed in oral squamous cell carcinomas and its expression is correlated with poor prognosis. *BMC Cancer*. 2012; 12: 146.
- Boraldi F, Annovi G, Carraro F, Naldini A, Tiozzo R, Sommer P *et al.* Hypoxia influences the cellular cross-talk of human dermal fibroblasts. A proteomic approach. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1774(11): 1402-13.
- Borrebaeck CA. Viewpoints in clinical proteomics: when will proteomics deliver clinically useful information? *Proteomics Clin Appl*. 2012; 6(7-8): 343-5.
- Bradley KT, Budnick SD, Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol*. 2006; 19(10): 1310-6.
- Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ *et al.* Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29(2): 167-78.
- Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM *et al.* Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 1995; 332(7): 429-35.
- Brinkman BM, Wong DT. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2006; 18(3): 228-33.

- Brivanlou AH, Darnell JE Jr. Signal transduction and the control of gene expression. *Science*. 2002; 295(5556): 813-8.
- Brown LM, Check DP, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence trends by subsite in the United States: changing gender patterns. *J Oncol*. 2012; 2012: 649498.
- Burande CF, Heuzé ML, Lamsoul I, Monsarrat B, Uttenweiler-Joseph S, Lutz PG. A label-free quantitative proteomics strategy to identify E3 ubiquitin ligase substrates targeted to proteasome degradation. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8(7): 1719-27.
- Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981; 112(2): 195-203.
- Campa MJ, Wang MZ, Howard B, Fitzgerald MC, Patz EF Jr. Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin A as potential molecular targets in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2003; 63(7): 1652-6.
- Cardesa A, Gale N, Nadal A, Zidal N. Squamous cell carcinoma. WHO classification: head and neck tumours. Lyon: IARC, 2005; 118.
- Cardesa A, Nadal A. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 2011; 20(3): 161-73.
- Carnelio S, Rodrigues GS, Shenoy R, Fernandes D. A brief review of common oral premalignant lesions with emphasis on their management and cancer prevention. *Indian J Surg*. 2011; 73(4): 256-61.
- Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck*. 2004; 26(1): 31-8.

- Chang KP, Yu JS, Chien KY, Lee CW, Liang Y, Liao CT *et al.* Identification of PRDX4 and P4HA2 as metastasis-associated proteins in oral cavity squamous cell carcinoma by comparative tissue proteomics of microdissected specimens using iTRAQ technology. *J Proteome Res.* 2011; 10(11): 4935-47.
- Chaerkady R, Pandey A. Quantitative proteomics for identification of cancer biomarkers. *Proteomics Clin Appl.* 2007; 1(9): 1080-9.
- Chen EY, Xu H, Gordonov S, Lim MP, Perkins MH, Ma'ayan A. Expression2Kinases: mRNA profiling linked to multiple upstream regulatory layers. *Bioinformatics.* 2012; 28(1): 105-11.
- Chen G, Gharib TG, Huang CC, Thomas DG, Shedden KA, Taylor JM *et al.* Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(7): 2298-305.
- Chen G, Gharib TG, Wang H, Huang CC, Kuick R, Thomas DG *et al.* Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(23): 13537-42.
- Chen G, Luo Y, Wang X, Zhao Z, Liu H, Zhang H *et al.* A relatively simple and economical protocol for proteomic analyses of human 20S proteasome: Compatible with both scaled-up and scaled-down purifications. *Electrophoresis.* 2009; 30(14): 2422-30.
- Chen J, He QY, Yuen AP, Chiu JF. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. *Proteomics.* 2004; 4(8): 2465-75.
- Chen R, Tan Y, Wang M, Wang F, Yao Z, Dong L *et al.* Development of glycoprotein capture-based label-free method for the high-throughput screening of differential glycoproteins in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Proteomics.* 2011; 10(7): M110. 006445.

- Chi LM, Lee CW, Chang KP, Hao SP, Lee HM, Liang Y *et al.* Enhanced interferon signaling pathway in oral cancer revealed by quantitative proteome analysis of microdissected specimens using ¹⁶O/¹⁸O labeling and integrated two-dimensional LC-ESI-MALDI tandem MS. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8(7): 1453-74.
- Chua DT, Tian Y, Wei WI. Late oral complications following radiotherapy for head and neck cancers. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2007; 7(9): 1215-24.
- Ciambellotti E, Coda C, Lanza E. [Determination++ of CA 15-3 in the control of primary and metastatic breast carcinoma]. *Minerva Med*. 1993; 84(3): 107-12.
- Colemann JJ, Sultan MR. Tumors of the Head and Neck. Principles of surgery. New York: McGraw-Hill; 1999.
- Cook GB, Neaman IE, Goldblatt JL, Cambetas DR, Hussain M, Lüftner D *et al.* Clinical utility of serum HER-2/neu testing on the Bayer Immuno 1 automated system in breast cancer. *Anticancer Res*. 2001; 21(2B): 1465-70.
- Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*. 2006; 25(51): 6831-43.
- Craven RA, Stanley AJ, Hanrahan S, Dods J, Unwin R, Totty N *et al.* Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma. *Proteomics*. 2006; 6(9): 2853-64.
- Dabrowska M, Grubek-Jaworska H, Domagała-Kulawik J, Bartoszewicz Z, Kondracka A, Krenke R *et al.* Diagnostic usefulness of selected tumor markers (CA125, CEA, CYFRA 21-1) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with non-small cell lung cancer. *Pol Arch Med Wewn*. 2004; 111(6): 659-65.
- Darby IA, Vuillier-Devillers K, Pinault E, Sarrazy V, Lepreux S, Balabaud C *et al.* Proteomic analysis of differentially expressed proteins in peripheral cholangiocarcinoma. *Cancer Microenviron*. 2010; 4(1): 73-91.
- Das BR, Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit*. 2002; 8(11): 258-67.

- da Silva SD, Hier M, Mlynarek A, Kowalski LP, Alaoui-Jamali MA. Recurrent oral cancer: current and emerging therapeutic approaches. *Front Pharmacol.* 2012; 3: 149.
- Davalieva K, Kiprijanovska S, Broussard C, Petrussevska G, Efremov GD. Proteomic analysis of infiltrating ductal carcinoma tissues by coupled 2-D DIGE/MS/MS analysis. *Mol Biol (Mosk).* 2012; 46(3): 469-80.
- De Masi S, Tosti ME, Mele A. Screening for hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis.* 2005; 37(4): 260-8.
- De Petris L, Orre LM, Kanter L, Pernemalm M, Koyi H, Lewensohn R *et al.* Tumor expression of S100A6 correlates with survival of patients with stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2009; 63(3): 410-7.
- De Souza Setubal Destro MF, Bitu CC, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP *et al.* Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. *Int J Oncol.* 2010; 36(1): 141-9.
- Deboni AL, Giordani AJ, Lopes NN, Dias RS, Segreto RA, Jensen SB, Segreto HR. Long-term oral effects in patients treated with radiochemotherapy for head and neck cancer. *Support Care Cancer.* 2012; 20(11): 2903-11.
- Delon I, Brown NH. Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; 19(1): 43-50.
- Deng S, Wang J, Hou L, Li J, Chen G, Jing B *et al.* Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal carcinoma, alone and/or synergistically. *Oncol Lett.* 2013; 5(1): 107-112.
- Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(1): 9-22.
- Deshpande AM, Wong DT. Molecular mechanisms of head and neck cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008; 8(5): 799-809.

- Didangelos A, Yin X, Mandal K, Saje A, Smith A, Xu Q *et al.* Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics*. 2011; 10(8): M111. 008128.
- Dios PD, Lestón JS. Oral cancer pain. *Oral Oncol*. 2010; 46(6): 448-51.
- Dirix P, Abbeel S, Vanstraelen B, Hermans R, Nuyts S. Dysphagia after chemoradiotherapy for head-and-neck squamous cell carcinoma: dose-effect relationships for the swallowing structures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009; 75(2): 385-92.
- Dowling P, Wormald R, Meleady P, Henry M, Curran A, Clynes M. Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. *J Proteomics*. 2008; 71(2): 168-75.
- Dragomir LP, Simionescu C, Mărgăritescu C, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2012; 53(1): 89-93.
- Dreesen O, Brivanlou AH. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*. 2007; 3(1): 7-17.
- Espina V, Heiby M, Pierobon M, Liotta LA. Laser capture microdissection technology. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007; 7(5): 647-57.
- Eversole LR. Dysplasia of the upper aerodigestive tract squamous epithelium. *Head Neck Pathol*. 2009; 3(1): 63-8.
- Fan NJ, Gao CF, Wang CS, Lv JJ, Zhao G, Sheng XH *et al.* Discovery and verification of gelsolin as a potential biomarker of colorectal adenocarcinoma in the Chinese population: Examining differential protein expression using an iTRAQ labelling-based proteomics approach. *Can J Gastroenterol*. 2012; 26(1): 41-7.
- Fan Y, Shi L, Liu Q, Dong R, Zhang Q, Yang S *et al.* Discovery and identification of potential biomarkers of papillary thyroid carcinoma. *Mol Cancer*. 2009; 8: 79.

- Farshidfar F, Weljie AM, Kopciuk K, Buie WD, Maclean A, Dixon E *et al.* Serum metabolomic profile as a means to distinguish stage of colorectal cancer. *Genome Med.* 2012; 4(5): 42.
- Felding-Habermann B. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2003; 20(3): 203-13.
- Feller L, Bouckaert M, Chikte UM, Wood NH, Khammissa RA, Meyerov R *et al.* A short account of cancer--specifically in relation to squamous cell carcinoma. *SADJ.* 2010; 65(7): 322-4.
- Fortuna G, Mignogna MD. Oral field cancerization. *CMAJ.* 2011; 183(14): 1622.
- Froidevaux-Klipfel L, Poirier F, Boursier C, Crépin R, Poüs C, Baudin B *et al.* Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Taxol-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Proteomics.* 2011; 11(19): 3877-86.
- Gann PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *JAMA.* 1995; 273(4): 289-94.
- Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suárez C, Owen RP *et al.* Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010; 267(7): 1001-17.
- Gharib TG, Chen G, Wang H, Huang CC, Prescott MS, Shedden K *et al.* Proteomic analysis of cytokeratin isoforms uncovers association with survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia.* 2002; 4(5): 440-8.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999; 285(5430): 1028-32.
- Gillette MA, Carr SA. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nat Methods.* 2013; 10(1): 28-34.

- Giusti L, Iacconi P, Da Valle Y, Ciregia F, Ventroni T, Donadio E *et al.* A proteomic profile of washing fluid from the colorectal tract to search for potential biomarkers of colon cancer. *Mol Biosyst.* 2012; 8(4): 1088-99.
- Gogilashvili K, Shonia N, Burkadze G. The role of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma (review). *Georgian Med News.* 2012; (213): 32-6.
- Grzesiak JJ, Tran Cao HS, Burton DW, Kaushal S, Vargas F, Clopton P *et al.* Knockdown of the $\beta(1)$ integrin subunit reduces primary tumor growth and inhibits pancreatic cancer metastasis. *Int J Cancer.* 2011; 129(12): 2905-15.
- Gyenis L, Duncan JS, Turowec JP, Bretner M, Litchfield DW. Unbiased functional proteomics strategy for protein kinase inhibitor validation and identification of bona fide protein kinase substrates: application to identification of EEF1D as a substrate for CK2. *J Proteome Res.* 2011; 10(11): 4887-901.
- Hamelin C, Cornut E, Poirier F, Pons S, Beaulieu C, Charrier JP *et al.* Identification and verification of heat shock protein 60 as a potential serum marker for colorectal cancer. *FEBS J.* 2011; 278(24): 4845-59.
- Han M, Dai J, Zhang Y, Lin Q, Jiang M, Xu X *et al.* Support vector machines coupled with proteomics approaches for detecting biomarkers predicting chemotherapy resistance in small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2012; 28(6): 2233-8.
- Harigopal M, Heymann J, Ghosh S, Anagnostou V, Camp RL, Rimm DL. Estrogen receptor co-activator (AIB1) protein expression by automated quantitative analysis (AQUA) in a breast cancer tissue microarray and association with patient outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 115(1): 77-85.
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S *et al.* American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25(33): 5287-312.

- Hastie C, Masters JR, Moss SE, Naaby-Hansen S. Interferon-gamma reduces cell surface expression of annexin 2 and suppresses the invasive capacity of prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2008; 283(18): 12595-603.
- Hatakeyama H, Kondo T, Fujii K, Nakanishi Y, Kato H, Fukuda S *et al.* Protein clusters associated with carcinogenesis, histological differentiation and nodal metastasis in esophageal cancer. *Proteomics.* 2006; 6(23): 6300-16.
- He QY, Chen J, Kung HF, Yuen AP, Chiu JF. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics.* 2004; 4(1): 271-8.
- Henriksson E, Baldetorp B, Borg A, Kjellen E, Akervall J, Wennerberg J *et al.* p53 mutation and cyclin D1 amplification correlate with cisplatin sensitivity in xenografted human squamous cell carcinomas from head and neck. *Acta Oncol.* 2006; 45(3): 300-5.
- Heo SH, Lee SJ, Ryoo HM, Park JY, Cho JY. Identification of putative serum glycoprotein biomarkers for human lung adenocarcinoma by multilectin affinity chromatography and LC-MS/MS. *Proteomics.* 2007; 7(23): 4292-302.
- Hill JJ, Tremblay TL, Pen A, Li J, Robotham AC, Lenferink AE *et al.* Identification of vascular breast tumor markers by laser capture microdissection and label-free LC-MS. *J Proteome Res.* 2011; 10(5): 2479-93.
- Hino S, Hamakawa H, Miyamoto Y, Ryoke K, Sekine J, Sasaki A *et al.* Effects of a concurrent Chemoradiotherapy with S-1 for locally advanced oral cancer. *Oncol Lett.* 2011; 2(5): 839-843.
- Hoffmannová J, Foltán R, Vlk M, Sipos M, Horká E, Pavlíková G *et al.* Hemimandibulectomy and therapeutic neck dissection with radiotherapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma involving mandible: a critical review of treatment protocol in the years 1994-2004. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 39(6): 561-7.

- Hour MJ, Lee KT, Wu YC, Wu CY, You BJ, Chen TL *et al.* A novel antitubulin agent, DPQZ, induces cell apoptosis in human oral cancer cells through Ras/Raf inhibition and MAP kinases activation. *Arch Toxicol.* 2012.
- Howard BA, Wang MZ, Campa MJ, Corro C, Fitzgerald MC, Patz EF Jr. Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis. *Proteomics.* 2003; 3(9): 1720-4.
- Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics.* 2007; 4(4): 531-8.
- Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J *et al.* Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(19): 6246-52.
- Huang da W, Sherman BT, Tan Q, Collins JR, Alvord WG, Roayaei J *et al.* The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol.* 2007; 8(9): R183.
- Huang SH, Hwang D, Lockwood G, Goldstein DP, O'Sullivan B. Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a meta-analysis of reported studies. *Cancer.* 2009; 115(7): 1489-97.
- Huber MA. A review of premalignant oral conditions. *Tex Dent J.* 2006; 123(6): 502-9.
- Hunt S, Jones AV, Hinsley EE, Whawell SA, Lambert DW. MicroRNA-124 suppresses oral squamous cell carcinoma motility by targeting ITGB1. *FEBS Lett.* 2011; 585(1): 187-92.
- Hwa JS, Park HJ, Jung JH, Kam SC, Park HC, Kim CW. Identification of proteins differentially expressed in the conventional renal cell carcinoma by proteomic analysis. *J Korean Med Sci.* 2005; 20(3): 450-5.

- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002; 110(6): 673-87.
- Indovina P, Marcelli E, Pentimalli F, Tanganelli P, Tarro G, Giordano A. Mass spectrometry-based proteomics: The road to lung cancer biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev*. 2012.
- Ingenuity Systems. Interactive pathway analysis of complex 'omics data. Redwood City 2012 [acesso 2012 Dec 20]. Disponível em: <http://www.ingenuity.com/>.
- Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Estimativa 2012 Incidência de câncer no Brasil. Brasil: 2012.
- Janes SM, Watt FM. New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Ver Cancer*. 2006; 6(3): 175-83.
- Jayapalan JJ, Ng KL, Razack AH, Hashim OH. Identification of potential complementary serum biomarkers to differentiate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia using gel- and lectin-based proteomics analyses. *Electrophoresis*. 2012; 33(12): 1855-62.
- Jefferies S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. 2001; 37(2): 115-26.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60(5): 277-300.
- Jia M, Souchelnytskyi S. Proteome profiling of heat shock of human primary breast epithelial cells, a dataset report. *Cell Stress Chaperones*. 2011; 16(4): 459-67.
- Johann DJ, Rodriguez-Canales J, Mukherjee S, Prieto DA, Hanson JC, Emmert-Buck M *et al*. Approaching solid tumor heterogeneity on a cellular basis by tissue proteomics using laser capture microdissection and biological mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2009; 8(5): 2310-8.

- Johansson B, Pourian MR, Chuan YC, Byman I, Bergh A, Pang ST *et al.* Proteomic comparison of prostate cancer cell lines LNCaP-FGC and LNCaP-r reveals heatshock protein 60 as a marker for prostate malignancy. *Prostate*. 2006; 66(12): 1235-44.
- Joseph P, Lei YX, Whong WZ, Ong TM. Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 delta, a novel cadmium-responsive proto-oncogene. *J Biol Chem*. 2002; 277: 6131–6136.
- Kabbage M, Chahed K, Hamrita B, Guillier CL, Trimeche M, Remadi S *et al.* Protein alterations in infiltrating ductal carcinomas of the breast as detected by nonequilibrium pH gradient electrophoresis and mass spectrometry. *J Biomed Biotechnol*. 2008; 2008: 564127.
- Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B *et al.* Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63(11): 1599-605.
- Kadowaki M, Sangai T, Nagashima T, Sakakibara M, Yoshitomi H, Takano S *et al.* Identification of vitronectin as a novel serum marker for early breast cancer detection using a new proteomic approach. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011; 137(7): 1105-15.
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 277-80.
- Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S *et al.* From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34: 354-7.
- Kang SM, Sung HJ, Ahn JM, Park JY, Lee SY, Park CS *et al.* The Haptoglobin β chain as a supportive biomarker for human lung cancers. *Mol Biosyst*. 2011; 7(4): 1167-75.

- Kashat L, So AK, Masui O, Wang XS, Cao J, Meng X *et al.* Secretome-based identification and characterization of potential biomarkers in thyroid cancer. *J Proteome Res.* 2010; 9(11): 5757-69.
- Katada K, Tomonaga T, Satoh M, Matsushita K, Tonoike Y, Kodera Y *et al.* Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. *J Proteomics.* 2012; 75(6): 1803-15.
- Kato H, Uzawa K, Onda T, Kato Y, Saito K, Nakashima D *et al.* Down-regulation of 1D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A protein expression in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2006; 28(4): 873-81.
- Kato K, Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Nakaya H, Hase T *et al.* Predictive value of measuring p53 labeling index at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2008; 14(1): 57-61.
- Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773(8): 1161-76.
- Keenan J, Murphy L, Henry M, Meleady P, Clynes M. Proteomic analysis of multidrug-resistance mechanisms in adriamycin-resistant variants of DLKP, a squamous lung cancer cell line. *Proteomics.* 2009; 9(6): 1556-66.
- Khamis ZI, Iczkowski KA, Sahab ZJ, Sang QX. Protein profiling of isolated leukocytes, myofibroblasts, epithelial, Basal, and endothelial cells from normal, hyperplastic, cancerous, and inflammatory human prostate tissues. *J Cancer.* 2010; 1: 70-9.
- Kočevar N, Odreman F, Vindigni A, Grazio SF, Komel R. Proteomic analysis of gastric cancer and immunoblot validation of potential biomarkers. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(11): 1216-28.
- Koehn J, Krapfenbauer K, Huber S, Stein E, Sutter W, Watzinger F *et al.* Potential involvement of MYC-and p53-related pathways in tumorigenesis in human oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis. *J Proteome Res.* 2008; 7(9): 3818-29.

- Koike H, Uzawa K, Nakashima D, Shimada K, Kato Y, Higo M *et al.* Identification of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma using a global proteomic approach. *Int J Oncol.* 2005; 27(1): 59-67.
- Kovalyov LI, Shishkin SS, Hasigov PZ, Dzeranov NK, Kazachenko AV, Kovalyova MA. *Prikladnaya biokhimiya i microbiologia.* 2006.
- Kreunin P, Yoo C, Urquidi V, Lubman DM, Goodison S. Proteomic profiling identifies breast tumor metastasis-associated factors in an isogenic model. *Proteomics.* 2007; 7(2): 299-312.
- Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006; 42(10): 987-93.
- Kulasingam V, Diamandis EP. Tissue culture-based breast cancer biomarker discovery platform. *Int J Cancer.* 2008; 123(9): 2007-12.
- Kyle RA. Multiple myeloma: how did it begin? *Mayo Clin Proc.* 1994; 69(7): 680-3.
- Larriba MJ, Casado-Vela J, Pendás-Franco N, Peña R, García de Herreros A, Berciano MT *et al.* Novel snail1 target proteins in human colon cancer identified by proteomic analysis. *PLoS One.* 2010; 5(4): e10221.
- Lei YX, Chen JK, Wu ZL. Blocking the translation elongation factor-1 delta with its antisense mRNA results in a significant reversal of its oncogenic potential. *Teratogen Carcinogen Mutagen.* 2002; 22: 377–383.
- Li B, An HJ, Kirmiz C, Lebrilla CB, Lam KS, Miyamoto S. Glycoproteomic analyses of ovarian cancer cell lines and sera from ovarian cancer patients show distinct glycosylation changes in individual proteins. *J Proteome Res.* 2008; 7(9): 3776-88.
- Li C, Hu Z, Lu J, Liu Z, Wang LE, El-Naggar AK *et al.* Genetic polymorphisms in DNA base-excision repair genes ADPRT, XRCC1, and APE1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2007; 110(4): 867-75.

- Li M, Lin YM, Hasegawa S, Shimokawa T, Murata K, Kameyama M *et al.* Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol.* 2004; 24(2): 305-12.
- Li YP, Hu CP, Yang HZ. Clinical value of tumor supplied group of factor combined with CEA in diagnosing tuberculosis pleural effusion and malignant pleural effusion. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2003; 28(6): 608-10.
- Liang S, Xu Y, Shen G, Liu Q, Zhao X, Xu Z *et al.* Quantitative protein expression profiling of 14-3-3 isoforms in human renal carcinoma shows 14-3-3 epsilon is involved in limitedly increasing renal cell proliferation. *Electrophoresis.* 2009; 30(23): 4152-62.
- Liang S, Xu Z, Xu X, Zhao X, Huang C, Wei Y. Quantitative proteomics for cancer biomarker discovery. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2012; 15(3): 221-31.
- Lima N, Cavaliere H, Tomimori E, Knobel M, Medeiros-Neto G. Prognostic value of serial serum thyroglobulin determinations after total thyroidectomy for differentiated thyroid cancer. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25(2): 110-5.
- Lin JF, Xu J, Tian HY, Gao X, Chen QX, Gu Q *et al.* Identification of candidate prostate cancer biomarkers in prostate needle biopsy specimens using proteomic analysis. *Int J Cancer.* 2007; 121(12): 2596-605.
- Liu NQ, Braakman RB, Stingl C, Luider TM, Martens JW, Foekens JA *et al.* Proteomics pipeline for biomarker discovery of laser capture microdissected breast cancer tissue. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2012; 17(2): 155-64.
- Liu Q, Peng YB, Qi LW, Cheng XL, Xu XJ, Liu LL *et al.* The Cytotoxicity Mechanism of 6-Shogaol-Treated HeLa Human Cervical Cancer Cells Revealed by Label-Free Shotgun Proteomics and Bioinformatics Analysis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 278652.
- Liu YF, Xiao ZQ, Li MX, Li MY, Zhang PF, Li C *et al.* Quantitative proteome analysis reveals annexin A3 as a novel biomarker in lung adenocarcinoma. *J Pathol.* 2009; 217(1): 54-64.

- Lo WY, Lai CC, Hua CH, Tsai MH, Huang SY, Tsai CH *et al.* S100A8 is identified as a biomarker of HPV18-infected oral squamous cell carcinomas by suppression subtraction hybridization, clinical proteomics analysis, and immunohistochemistry staining. *J Proteome Res.* 2007; 6(6): 2143-51.
- Lohavanichbutr P, Houck J, Doody DR, Wang P, Mendez E, Futran N *et al.* Gene expression in uninvolved oral mucosa of OSCC patients facilitates identification of markers predictive of OSCC outcomes. *PLoS One.* 2012; 7(9): e46575.
- Long J, Lang ZW, Wang HG, Wang TL, Wang BE, Liu SQ. Glutamine synthetase as an early marker for hepatocellular carcinoma based on proteomic analysis of resected small hepatocellular carcinomas. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2010; 9(3): 296-305.
- Lu Y, Liu P, Wen W, Grubbs CJ, Townsend RR, Malone JP *et al.* Cross-species comparison of orthologous gene expression in human bladder cancer and carcinogen-induced rodent models. *Am J Transl Res.* 2010; 3(1): 8-27.
- Lu Z, Hu L, Evers S, Chen J, Shen Y. Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue. *Proteomics.* 2004; 4(12): 3975-88.
- Maeda J, Hirano T, Ogiwara A, Akimoto S, Kawakami T, Fukui Y *et al.* Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualisation of postoperative therapy. *Br J Cancer.* 2008; 98(3): 596-603.
- Makawita S, Diamandis EP. The bottleneck in the cancer biomarker pipeline and protein quantification through mass spectrometry-based approaches: current strategies for candidate verification. *Clin Chem.* 2010; 56(2): 212-22.
- Mäkelä M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res.* 1994; 73(8): 1397-406.

- Mäkelä M, Larjava H, Pirilä E, Maisi P, Salo T, Sorsa T *et al.* Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratinocytes. *Exp Cell Res.* 1999; 251(1): 67-78.
- Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(12): 952-8.
- Marcilla M, Albar JP. Quantitative proteomics: A strategic ally to map protein interaction networks. *IUBMB Life.* 2013; 65(1): 9-16.
- Marrington R, Johnston J, Knowles S, Webster C. Measurement of urinary metadrenaline and normetadrenaline by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the diagnosis of pheochromocytoma. *Ann Clin Biochem.* 2010; 47(5): 467-75.
- Marsit CJ, Black CC, Posner MR, Kelsey KT. A genotype-phenotype examination of cyclin D1 on risk and outcome of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(8): 2371-7.
- Martinkova J, Gadher SJ, Hajduch M, Kovarova H. Challenges in cancer research and multifaceted approaches for cancer biomarker quest. *FEBS Lett.* 2009; 583(11): 1772-84.
- Matta A, DeSouza LV, Shukla NK, Gupta SD, Ralhan R, Siu KW. Prognostic significance of head-and-neck cancer biomarkers previously discovered and identified using iTRAQ-labeling and multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2008; 7(5): 2078-87.
- McDowell JD. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006; 39(2): 277-94.
- Messadi DV, Wilder-Smith P, Wolinsky L. Improving oral cancer survival: the role of dental providers. *J Calif Dent Assoc.* 2009; 37(11): 789-98.

- Mian C, Lodde M, Haitel A, Egarter Vigl E, Marberger M, Pycha A. Comparison of two qualitative assays, the UBC rapid test and the BTA stat test, in the diagnosis of urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2000; 56(2): 228-31.
- Missan DS, Dipersio M. Integrin control of tumor invasion. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2012; 22(4): 309-24.
- Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2009; 45(4-5): 324-34.
- Mor G, Visintin I, Lai Y, Zhao H, Schwartz P, Rutherford T *et al*. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(21): 7677-82.
- Morgan EA, Forootan SS, Adamson J, Foster CS, Fujii H, Igarashi M *et al*. Expression of cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP) in prostate cancer: potential prognostic marker and target for tumourigenicity-suppression. *Int J Oncol*. 2008; 32(4): 767-75.
- Mosel DD, Bauer RL, Lynch DP, Hwang ST. Oral complications in the treatment of cancer patients. *Oral Dis*. 2011; 17(6): 550-9.
- Myung JK, Afjehi-Sadat L, Felizardo-Cabatic M, Slavic I, Lubec G. Expressional patterns of chaperones in ten human tumor cell lines. *Proteome Sci*. 2004; 2(1): 8.
- Nadal A, Campo E, Pinto J, Mallofré C, Palacín A, Arias C *et al*. p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors. *J Pathol*. 1995; 175(2): 181-8.
- Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2003; 442(1): 1-7.
- Nan Y, Jin F, Yang S, Tian Y, Xie Y, Fu E *et al*. Discovery of a set of biomarkers of human lung adenocarcinoma through cell-map proteomics and bioinformatics. *Med Oncol*. 2010; 27(4): 1398-406.

- Narayanasamy A, Ahn JM, Sung HJ, Kong DH, Ha KS, Lee SY *et al.* Fucosylated glycoproteomic approach to identify a complement component 9 associated with squamous cell lung cancer (SQLC). *J Proteomics*. 2011; 74(12): 2948-58.
- Negishi A, Masuda M, Ono M, Honda K, Shitashige M, Satow R *et al.* Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2009; 100(9): 1605-11.
- Nesvizhskii AI. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol Biol*. 2007; 367: 87-119.
- Nilsson K, Svensson S, Landberg G. Retinoblastoma protein function and p16INK4a expression in actinic keratosis, squamous cell carcinoma in situ and invasive squamous cell carcinoma of the skin and links between p16INK4a expression and infiltrative behavior. *Mod Pathol*. 2004; 17(12): 1464-74.
- Nipp M, Elsner M, Balluff B, Meding S, Sarioglu H, Ueffing M *et al.* S100-A10, thioredoxin, and S100-A6 as biomarkers of papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis identified by MALDI imaging. *J Mol Med (Berl)*. 2012; 90(2): 163-74.
- O'Dwyer D, Ralton LD, O'Shea A, Murray GI. The proteomics of colorectal cancer: identification of a protein signature associated with prognosis. *PLoS One*. 2011; 6(11): e27718.
- Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka Y, Tanaka F, Inoue H *et al.* Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma. *Br J Cancer*. 2004; 91(2): 282-6.
- Ong SE, Blagojev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002; 1(5): 376-86.
- Onda M, Li D, Suzuki S, Nakamura I, Takenoshita S, Brogren CH *et al.* Expansion of microsatellite in the thyroid hormone receptor-alpha1 gene linked to increased

receptor expression and less aggressive thyroid cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(9): 2870-4.

-Onda T, Uzawa K, Endo Y, Bukawa H, Yokoe H, Shibahara T, Tanzawa H. Ubiquitous mitochondrial creatine kinase downregulated in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2006; 94(5): 698-709.

-Onda T, Uzawa K, Nakashima D, Saito K, Iwadate Y, Seki N *et al.* Lin-7C/VELI3/MALS-3: an essential component in metastasis of human squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2007; 67(20): 9643-8.

-Opstal-van Winden AW, Krop EJ, Kåredal MH, Gast MC, Lindh CH, Jeppsson MC *et al.* Searching for early breast cancer biomarkers by serum protein profiling of pre-diagnostic serum; a nested case-control study. *BMC Cancer.* 2011; 11: 381.

-Ohshiro K, Rosenthal DI, Koomen JM, Streckfus CF, Chambers M, Kobayashi R *et al.* Pre-analytic saliva processing affect proteomic results and biomarker screening of head and neck squamous carcinoma. *Int J Oncol.* 2007; 30(3): 743-9.

-Paes Leme AF, Sherman NE, Smalley DM, Sizukusa LO, Oliveira AK, Menezes MC *et al.* Hemorrhagic activity of HF3, a snake venom metalloproteinase: insights from the proteomic analysis of mouse skin and blood plasma. *J Proteome Res.* 2012; 11(1): 279-91.

-Park JY, Kim SA, Chung JW, Bang S, Park SW, Paik YK *et al.* Proteomic analysis of pancreatic juice for the identification of biomarkers of pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137(8): 1229-38.

-Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(2): 74-108.

-Patel V, Hood BL, Molinolo AA, Lee NH, Conrads TP, Braisted JC *et al.* Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(4): 1002-14.

- Paulo JA, Lee LS, Banks PA, Steen H, Conwell DL. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded pancreatic tissue using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Pancreas*. 2012; 41(2): 175-85.
- Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Reboiras-López MD, Gándara Rey JM, García-García A. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). *Oncol Rep*. 2009; 22(6): 1277-82.
- Pernemalm M, De Petris L, Eriksson H, Brandén E, Koyi H, Kanter L *et al*. Use of narrow-range peptide IEF to improve detection of lung adenocarcinoma markers in plasma and pleural effusion. *Proteomics*. 2009; 9(13): 3414-24.
- Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol*. 2009; 45(4-5): 340-50.
- Pietrowska M, Polanska J, Marczak L, Behrendt K, Nowicka E, Stobiecki M *et al*. Mass spectrometry-based analysis of therapy-related changes in serum proteome patterns of patients with early-stage breast cancer. *J Transl Med*. 2010; 8:66.
- Polachini GM, Sobral LM, Mercante AM, Paes-Leme AF, Xavier FC, Henrique T *et al*. Proteomic approaches identify members of cofilin pathway involved in oral tumorigenesis. *PLoS One*. 2012; 7(12): e50517.
- Polanski M, Anderson NL. A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. *Biomark Insights*. 2007; 1: 1-48.
- Pontes HA, Paiva HB, de Freitas Silva BS, Fonseca FP, da Silva FB, Pontes FS *et al*. Oral candidiasis mimicking an oral squamous cell carcinoma: report of a case. *Gerodontology*. 2012; 29(1): 70-4.
- Poschmann G, Sitek B, Sipos B, Ulrich A, Wiese S, Stephan C *et al*. Identification of proteomic differences between squamous cell carcinoma of the lung and bronchial epithelium. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8(5): 1105-16.
- Poschmann G, Sitek B, Sipos B, Ulrich A, Wiese S, Stephan C *et al*. Identification of proteomic differences between squamous cell carcinoma of the lung and bronchial epithelium. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8(5): 1105-16.

- Pouliot N, Connolly LM, Moritz RL, Simpson RJ, Burgess AW. Colon cancer cells adhesion and spreading on autocrine laminin-10 is mediated by multiple integrin receptors and modulated by EGF receptor stimulation. *Exp Cell Res*. 2000.
- Proud CG. Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Mol Biol Rep*. 1994; 19(3): 161-70.
- Qi J, Liu N, Zhou Y, Tan Y, Cheng Y, Yang C *et al*. Overexpression of sorcin in multidrug resistant human leukemia cells and its role in regulating cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 349(1): 303-9.
- Qin XJ, Ling BX. Proteomic studies in breast cancer (Review). *Oncol Lett*. 2012; 3(4): 735-743.
- Rakheja D, Boriack RL, Mitui M, Khokhar S, Holt SA, Kapur P. Papillary thyroid carcinoma shows elevated levels of 2-hydroxyglutarate. *Tumour Biol*. 2011; 32(2): 325-33.
- Ralhan R, Desouza LV, Matta A, Chandra Tripathi S, Ghanny S, Datta Gupta S *et al*. Discovery and verification of head-and-neck cancer biomarkers by differential protein expression analysis using iTRAQ labeling, multidimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7(6): 1162-73.
- Ralhan R, Desouza LV, Matta A, Chandra Tripathi S, Ghanny S, Dattagupta S *et al*. iTRAQ-multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry-based identification of potential biomarkers of oral epithelial dysplasia and novel networks between inflammation and premalignancy. *J Proteome Res*. 2009; 8(1): 300-9.
- Raso C, Cosentino C, Gaspari M, Malara N, Han X, McClatchy D *et al*. Characterization of Breast Cancer Interstitial Fluids by TmT Labeling, LTQ-Orbitrap Velos Mass Spectrometry, and Pathway Analysis. *J Proteome Res*. 2012.

- Rehman I, Azzouzi AR, Cross SS, Deloulme JC, Catto JW, Wylde N *et al.* Dysregulated expression of S100A11 (calgizzarin) in prostate cancer and precursor lesions. *Hum Pathol.* 2004; 35(11): 1385-91.
- Reid BC, Winn DM, Morse DE, Pendrys DG. Head and neck in situ carcinoma: incidence, trends, and survival. *Oral Oncol.* 2000; 36(5): 414-20.
- Rezaul K, Thumar JK, Lundgren DH, Eng JK, Claffey KP, Wilson L *et al.* Differential protein expression profiles in estrogen receptor-positive and-negative breast cancer tissues using label-free quantitative proteomics. *Genes Cancer.* 2010; 1(3): 251-71.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003; 302(5651): 1704-9.
- Roesch-Ely M, Nees M, Karsai S, Ruess A, Bogumil R, Warnken U *et al.* Proteomic analysis reveals successive aberrations in protein expression from healthy mucosa to invasive head and neck cancer. *Oncogene.* 2007; 26(1): 54-64.
- Rong Y, Jin D, Hou C, Hu J, Wu W, Ni X *et al.* Proteomics analysis of serum protein profiling in pancreatic cancer patients by DIGE: up-regulation of mannose-binding lectin 2 and myosin light chain kinase 2. *BMC Gastroenterol.* 2010; 10: 68.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* 2004; 3(12): 1154-69.
- Saawarn S, Astekar M, Saawarn N, Dhakar N, Gomateshwar Sagari S. Cyclin d1 expression and its correlation with histopathological differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Scientific World Journal.* 2012; 2012: 978327.
- Salo T, Lyons JG, Rahemtulla F, Birkedal-Hansen H, Larjava H. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1991; 266(18): 11436-41.

- Sanders ME, Dias EC, Xu BJ, Mobley JA, Billheimer D, Roder H *et al.* Differentiating proteomic biomarkers in breast cancer by laser capture microdissection and MALDI MS. *J Proteome Res.* 2008; 7(4): 1500-7.
- Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Soubhia AM, Miyahara GI, Carlos R, Speight PM *et al.* High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. *Histopathology.* 2011; 58(7): 1127-35.
- Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T, Kannan S. CCND1 polymorphisms (A870G and C1722G) modulate its protein expression and survival in oral carcinoma. *Oral Oncol.* 2008; 44(7): 689-97.
- Saydam O, Senol O, Schaaïj-Visser TB, Pham TV, Piersma SR, Stemmer-Rachamimov AO *et al.* Comparative protein profiling reveals minichromosome maintenance (MCM) proteins as novel potential tumor markers for meningiomas. *J Proteome Res.* 2010; 9(1): 485-94.
- Schaaïj-Visser TB, Brakenhoff RH, Leemans CR, Heck AJ, Slijper M. Protein biomarker discovery for head and neck cancer. *J Proteomics.* 2010; 73(10): 1790-803.
- Schaefer KL, Brachwitz K, Wai DH, Braun Y, Diallo R, Korsching E *et al.* Expression profiling of t(12;22) positive clear cell sarcoma of soft tissue cell lines reveals characteristic up-regulation of potential new marker genes including ERBB3. *Cancer Res.* 2004; 64(10): 3395-405.
- Schulz DM, Böllner C, Thomas G, Atkinson M, Esposito I, Höfler H *et al.* Identification of differentially expressed proteins in triple-negative breast carcinomas using DIGE and mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2009; 8(7): 3430-8.
- Scully C, Porter S. ABC of oral health. Oral cancer. *BMJ.* 2000; 321(7253): 97-100.

- Scully C, Bagan J: Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 2009; 15(6): 388-399.
- Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(12): 937-47.
- Sepiashvili L, Hui A, Ignatchenko V, Shi W, Su S, Xu W *et al*. Potentially novel candidate biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma identified using an integrated cell line-based discovery strategy. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11(11): 1404-15.
- Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN *et al*. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian J Clin Biochem*. 2011; 26(4): 326-34.
- Shapiro JP, Biswas S, Merchant AS, Satoskar A, Taslim C, Lin S *et al*. A quantitative proteomic workflow for characterization of frozen clinical biopsies: laser capture microdissection coupled with label-free mass spectrometry. *J Proteomics*. 2012; 77: 433-40.
- Sharma N, Martin A, McCabe CJ. Mining the proteome: the application of tandem mass spectrometry to endocrine cancer research. *Endocr Relat Cancer*. 2012; 19(4): R149-61.
- Shen H, Huang J, Pei H, Zeng S, Tao Y, Shen L *et al*. Comparative proteomic study for profiling differentially expressed proteins between Chinese left- and right-sided colon cancers. *Cancer Sci*. 2013; 104(1): 135-41.
- Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, Jeon E, Hong SH, Jung MS *et al*. Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res*. 2005; 65(8): 3162-70.
- Shiozawa Y, Havens AM, Jung Y, Ziegler AM, Pedersen EA, Wang J *et al*. Annexin II/annexin II receptor axis regulates adhesion, migration, homing, and growth of prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2008 Oct 1;105(2):370-80.

- Shishkin SS, Kovalyov LI, Kovalyova MA, Krakhmaleva IN, Eremina LS, Makarov AA. The Problems of Early Diagnostics of Prostate Cancer and Possibilities of Using of New Potential Biomarkers. M: OOO "Originalnaya compania." 2009.
- Shishkin SS, Kovalyov LI, Kovalyova MA, Lisitskaya KV, Eremina LS, Ivanov AV *et al.* "Prostate cancer proteomics" database. *Acta Naturae*. 2010; 2(4): 95-104.
- Shuda M, Kondoh N, Tanaka K, Ryo A, Wakatsuki T, Hada A *et al.* Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2000; 20(4): 2489-94.
- Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(3): 210-9.
- Simionescu C, Mărgăritescu C, Surpățeanu M, Mogoantă L, Zăvoi R, Ciurea R *et al.* The study of E-cadherine and CD44 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2008; 49(2): 189-93.
- Smith B, Ashburner M, Rosse C, Bard J, Bug W, Ceusters W *et al.* The OBO Foundry: coordinated evolution of ontologies to support biomedical data integration. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(11): 1251-5.
- Sofiadis A, Dinets A, Orre LM, Branca RM, Juhlin CC, Foukakis T *et al.* Proteomic study of thyroid tumors reveals frequent up-regulation of the Ca²⁺-binding protein S100A6 in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2010; 20(10): 1067-76.
- Sonenberg N. Translation factors as effectors of cell growth and tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 1993; 5(6): 955-60.
- Sparkman OD. Review of the 48th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics held in Long Beach, California June 11-15, 2000. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2000; 11(10): 921.
- Specenier P, Vermorken JB. Advances in the systemic treatment of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol*. 2010; 22(3): 200-5.

- Spellman DS, Deinhardt K, Darie CC, Chao MV, Neubert TA. Stable isotopic labeling by amino acids in cultured primary neurons: application to brain-derived neurotrophic factor-dependent phosphotyrosine-associated signaling. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7(6): 1067-76.
- Srisomsap C, Subhasitanont P, Otto A, Mueller EC, Punyarit P, Wittmann-Liebold B, Svasti J. Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis. *Proteomics*. 2002; 2(6): 706-12.
- Staab CA, Ceder R, Jägerbrink T, Nilsson JA, Roberg K, Jörnvall H *et al*. Bioinformatics processing of protein and transcript profiles of normal and transformed cell lines indicates functional impairment of transcriptional regulators in buccal carcinoma. *J Proteome Res*. 2007; 6(9): 3705-17.
- Stroncek DF, Burns C, Martin BM, Rossi L, Marincola FM, Panelli MC. Advancing cancer biotherapy with proteomics. *J Immunother*. 2005; 28(3): 183-92.
- Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007; 110(7): 1429-35.
- Suehara Y, Kondo T, Fujii K, Hasegawa T, Kawai A, Seki K *et al*. Proteomic signatures corresponding to histological classification and grading of soft-tissue sarcomas. *Proteomics*. 2006; 6(15): 4402-9.
- Sun X, Salih E, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ. Activity-based mass spectrometric characterization of proteases and inhibitors in human saliva. *Proteomics Clin Appl*. 2009; 3(7): 810-820.
- Sung HJ, Cho JY. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMB Rep*. 2008; 41(9): 615-25.
- Sung HJ, Ahn JM, Yoon YH, Rhim TY, Park CS, Park JY *et al*. Identification and validation of SAA as a potential lung cancer biomarker and its involvement in metastatic pathogenesis of lung cancer. *J Proteome Res*. 2011; 10(3): 1383-95.

- Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ *et al.* Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(6): 1523-32.
- Terp MG, Lund RR, Jensen ON, Leth-Larsen R, Ditzel HJ. Identification of markers associated with highly aggressive metastatic phenotypes using quantitative comparative proteomics. *Cancer Genomics Proteomics.* 2012; 9(5): 265-73.
- Thiel UJ, Feltens R, Adryan B, Gieringer R, Brochhausen C, Schuon R *et al.* Analysis of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma by MALDI-TOF MS. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40(5): 369-79.
- Tian M, Cui YZ, Song GH, Zong MJ, Zhou XY, Chen Y *et al.* Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer.* 2008; 8: 241.
- Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(1): 51-61.
- Traub F, Jost M, Hess R, Schorn K, Menzel C, Budde P *et al.* Peptidomic analysis of breast cancer reveals a putative surrogate marker for estrogen receptor-negative carcinomas. *Lab Invest.* 2006; 86(3): 246-53.
- Tsai HY, Boonyapranai K, Sriyam S, Yu CJ, Wu SW, Khoo KH *et al.* Glycoproteomics analysis to identify a glycoform on haptoglobin associated with lung cancer. *Proteomics.* 2011; 11(11): 2162-70.
- Turhani D, Krapfenbauer K, Thurnher D, Langen H, Fountoulakis M. Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *Electrophoresis.* 2006; 27(7): 1417-23.
- Ueda K, Fukase Y, Katagiri T, Ishikawa N, Irie S, Sato TA *et al.* Targeted serum glycoproteomics for the discovery of lung cancer-associated glycosylation disorders using lectin-coupled ProteinChip arrays. *Proteomics.* 2009; 9(8): 2182-92.

- Van den Broeck A, Vankelecom H, Van Eijsden R, Govaere O, Topal B. Molecular markers associated with outcome and metastasis in human pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012; 31: 68.
- Van Houdt WJ, Emmink BL, Pham TV, Piersma SR, Verheem A, Vries RG *et al.* Comparative proteomics of colon cancer stem cells and differentiated tumor cells identifies BIRC6 as a potential therapeutic target. *Mol Cell Proteomics.* 2011; 10(12): M111.011353.
- van Winden AW, van den Broek I, Gast MC, Engwegen JY, Sparidans RW, van Dulken EJ *et al.* Serum degradome markers for the detection of breast cancer. *J Proteome Res.* 2010; 9(8): 3781-8.
- Vargas-Ferreira F, Nedel F, Etges A, Gomes AP, Furuse C, Tarquinio SB. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Braz Dent J.* 2012; 23(5): 586-90.
- Veenstra TD. Global and targeted quantitative proteomics for biomarker discovery. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 847(1): 3-11.
- Vieira RA, Minicucci EM, Marques ME, Marques SA. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. *An Bras Dermatol.* 2012; 87(1): 105-14.
- Villén J, Gygi SP. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2008; 3(10): 1630-8.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(7): 489-501.
- Wang Z, Jiang L, Huang C, Li Z, Chen L, Gou L *et al.* Comparative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for oral squamous cell carcinoma. *Mol Cell Proteomics.* 2008; 7(9): 1639-50.

- Wang Z, Feng X, Liu X, Jiang L, Zeng X, Ji N *et al.* Involvement of potential pathways in malignant transformation from oral leukoplakia to oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis. *BMC Genomics*. 2009; 10: 383.
- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009; 45(4-5): 309-16.
- Westra WH. The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head Neck Pathol*. 2009; 3(1): 78-81.
- Wolff KD, Follmann M, Nast A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Dtsch Arztebl Int*. 2012; 109(48): 829-35.
- Woods Ignatoski KM, Grewal NK, Markwart SM, Vellaichamy A, Chinnaiyan AM, Yeung K *et al.* Loss of Raf kinase inhibitory protein induces radioresistance in prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008; 72(1): 153-60.
- Woolgar JA, Hall GL. Determinants of outcome following surgery for oral squamous cell carcinoma. *Future Oncol*. 2009; 5(1): 51-61.
- Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther*. 2002; 4(3): 242-50.
- Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: W652-60.
- Xia J, Wishart DS. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nat Protoc*. 2011; 6(6): 743-60.
- Xiao H, Zhang L, Zhou H, Lee JM, Garon EB, Wong DT. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11(2): M111.012112.

- Xiao T, Ying W, Li L, Hu Z, Ma Y, Jiao L *et al.* An approach to studying lung cancer-related proteins in human blood. *Mol Cell Proteomics*. 2005; 4(10): 1480-6.
- Xu BJ, Gonzalez AL, Kikuchi T, Yanagisawa K, Massion PP, Wu H *et al.* MALDI-MS derived prognostic protein markers for resected non-small cell lung cancer. *Proteomics Clin Appl*. 2008; 2(10-11): 1508-17.
- Yamaguchi K, Nagano M, Torada N, Hamasaki N, Kawakita M, Tanaka M. Urine diacetylspermine as a novel tumor marker for pancreatobiliary carcinomas. *Rinsho Byori*. 2004; 52(4): 336-9.
- Yamamoto M, Baba H, Kakeji Y, Endo K, Ikeda Y, Toh Y *et al.* Prognostic significance of tumor markers in peritoneal lavage in advanced gastric cancer. *Oncology*. 2004; 67(1): 19-26.
- 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): 116-134.
- Yang HY, Kwon J, Park HR, Kwon SO, Park YK, Kim HS *et al.* Comparative proteomic analysis for the insoluble fractions of colorectal cancer patients. *J Proteomics*. 2012; 75(12): 3639-53.
- Yao H, Zhang Z, Xiao Z, Chen Y, Li C, Zhang P *et al.* Identification of metastasis associated proteins in human lung squamous carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis and laser capture microdissection. *Lung Cancer*. 2009; 65(1): 41-8.
- Yao Z, Yin P, Su D, Peng Z, Zhou L, Ma L *et al.* Serum metabolic profiling and features of papillary thyroid carcinoma and nodular goiter. *Mol Biosyst*. 2011; 7(9): 2608-14.
- Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2009; 11: 49-79.

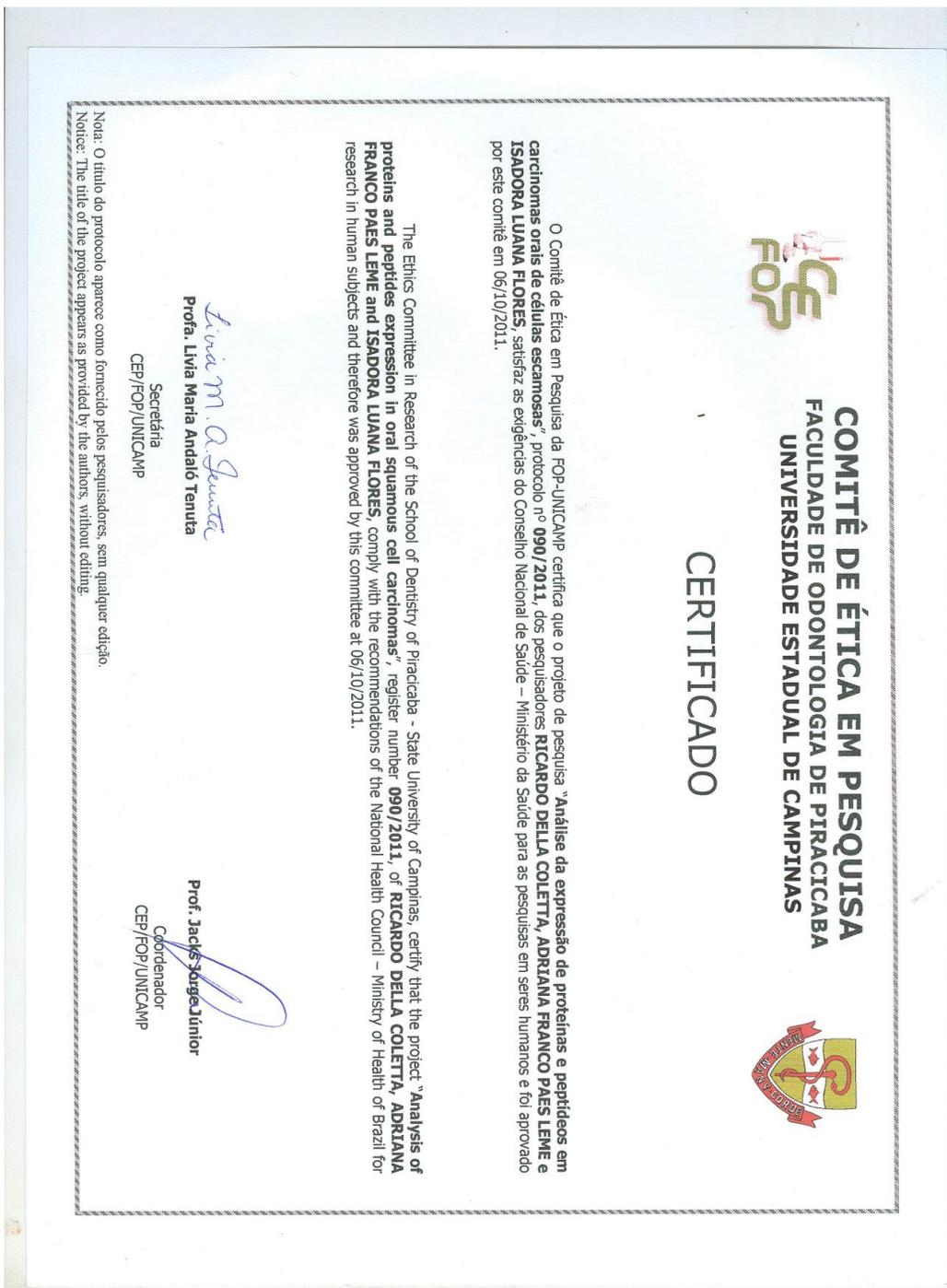
- Ye H, Wang A, Lee BS, Yu T, Sheng S, Peng T *et al.* Proteomic based identification of manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) as a metastasis marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics*. 2008; 5(2): 85-94.
- You BC, Park SP, Lee YD *et al.* The expression of heat shock protein 60 kDa in tissues and cell lines of breast cancer. *Breast Cancer*. 2008; 11: 161-171.
- Yu KH, Barry CG, Austin D, Busch CM, Sangar V, Rustgi AK *et al.* Stable isotope dilution multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pancreatic cancer serum biomarker discovery. *J Proteome Res*. 2009; 8(3): 1565-76.
- Yue T, Partyka K, Maupin KA, Hurley M, Andrews P, Kaul K *et al.* Identification of blood-protein carriers of the CA 19-9 antigen and characterization of prevalence in pancreatic diseases. *Proteomics*. 2011; 11(18): 3665-74.
- Zackrisson B, Mercke C, Strander H, Wennerberg J, Cavallin-Ståhl E. A systematic overview of radiation therapy effects in head and neck cancer. *Acta Oncol*. 2003; 42(5-6): 443-61.
- Zagouri F, Sergentanis TN, Nonni A, Papadimitriou CA, Michalopoulos NV, Domeyer P *et al.* Hsp90 in the continuum of breast ductal carcinogenesis: Evaluation in precursors, preinvasive and ductal carcinoma lesions. *BMC Cancer*. 2010; 10: 353.
- Zeng X, Hood BL, Sun M, Conrads TP, Day RS, Weissfeld JL *et al.* Lung cancer serum biomarker discovery using glycoprotein capture and liquid chromatography mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2010; 9(12): 6440-9.
- Zeng X, Hood BL, Zhao T, Conrads TP, Sun M, Gopalakrishnan V *et al.* Lung cancer serum biomarker discovery using label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Thorac Oncol*. 2011; 6(4): 725-34.

- Zhai XH, Yu JK, Lin C, Wang LD, Zheng S. Combining proteomics, sérum biomarkers and bioinformatics to discriminate between esophageal squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesion. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2012; 13(12): 964-71.
- Zhang J, Wang K, Zhang J, Liu SS, Dai L, Zhang JY. Using proteomic approach to identify tumor-associated proteins as biomarkers in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Proteome Res*. 2011; 10(6): 2863-72.
- Zhang J, Bowers J, Liu L, Wei S, Gowda GA, Hammoud Z *et al*. Esophageal cancer metabolite biomarkers detected by LC-MS and NMR methods. *PLoS One*. 2012; 7(1): e30181.
- Zhang JS, Gong A, Cheville JC, Smith DI, Young CY. AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005; 43(3): 249-59.
- Zhao ZS, Li L, Wang HJ, Wang YY. Expression and prognostic significance of CEACAM6, ITGB1, and CYR61 in peripheral blood of patients with gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2011; 104(5): 525-9.
- Zhong LP, Zhou XJ, Wei KJ, Yang X, Ma CY, Zhang CP *et al*. Application of serum tumor markers and support vector machine in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2008; 17(5): 457-60.
- Zhou J, Xu B, Huang J, Jia X, Xue J, Shi X *et al*. ¹H NMR-based metabonomic and pattern recognition analysis for detection of oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2009; 401(1-2): 8-13.
- Zhou S, Yi T, Liu R, Bian C, Qi X, He X *et al*. Proteomics identification of annexin A2 as a key mediator in the metastasis and proangiogenesis of endometrial cells in human adenomyosis. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11(7): M112. 017988.
- Ziober BL, Silverman SS Jr, Kramer RH. Adhesive mechanisms regulating invasion and metastasis in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001; 12(6): 499-510.

-Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 840518.

-Zweitzig DR, Smirnov DA, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM, Moran E. Physiological stress induces the metastasis marker AGR2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 2007; 306(1-2): 255-60.

Anexo 1



Anexo 2



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

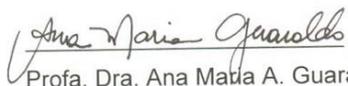
CERTIFICADO

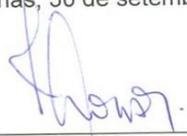
Certificamos que o Protocolo nº 2291-1, sobre "Análise de proteínas e peptídeos em carcinoma oral de células escamosas utilizando modelo experimental para o desenvolvimento de tumores em animais", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edgard Graner / Michelle Agostini, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 30 de setembro de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2291-1, entitled "Analysis of the proteins and peptides in oral squamous cell carcinoma in a experimental model of tumor in animals", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 30, 2010.

Campinas, 30 de setembro de 2010.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Anexo 3

Tabela Suplementar 1 - Proteínas identificadas por espectrometria de massas e diferencialmente expressas no CEC oral segundo teste *t* Student ($p < 0,05$) e razão $> 1,5$.

Proteínas Identificadas (2529)	Número de Acesso	Mucosa Oral Normal																			CEC Oral																			razão	Valor p
		PG57 10_11	PG87 10_11	PG28 12_11	PG88 10_11	PG16 04_91	PG34 12_05	PG41 06_04	PG53 06_08	PG06 04_11	PG34 04_11	PG57 10_11	PG87 10_11	PG28 12_11	PG88 10_11	PG16 04_91	PG34 12_05	PG41 06_04	PG53 06_08	PG06 04_11	PG34 04_11																				
Proteína não caracterizada	IPI00925547	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	1	4	4	0	6	0	18	5,1	3,90E-02																		
Isoforma Alfa-6X1X2A da Integrina alfa-6	IPI00216225	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	13	7	4	1	2	2	7	4,2	1,20E-02																		
Isoforma Beta-4C da Integrina beta-4	IPI00027422	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	2	3	0	8	11	1	0	4	3	6	3,7	5,30E-03																		
Isoforma 1 da Miosina-lb	IPI00376344	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	7	4	0	0	1	9	3,4	3,00E-02																		
Fascin	IPI00163187	7	1	1	3	3	5	0	1	2	2	3	3	4	29	19	19	2	10	11	10	3,4	9,40E-03																		
Filamina B isoforma 1	IPI00900293	17	11	4	13	11	7	8	7	4	16	23	16	4	24	81	51	10	56	43	16	3,1	1,00E-02																		
Isoforma H17 da Mieloperoxidase	IPI00007244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	2	1	0	3	1	10	3,1	3,80E-02																		
Isoforma 1 do Microtúbulo-actina ligação cruzada fator 1, isoformas 1/2/3/5	IPI00550385	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	1	0	2	4	2	1	6	6	0	3,1	3,60E-03																		
Serpina H1	IPI00032140	1	1	1	1	0	1	0	3	1	1	2	1	0	8	10	6	1	3	3	17	3,0	2,80E-02																		
Família transportadora de soluto 2, transportador de glicose, membro 1	IPI00220194	2	1	2	1	0	5	0	1	0	1	2	3	3	4	7	2	2	6	6	18	2,8	2,40E-02																		
Queratina, tipo I citoesqueleto 17	IPI00450768	0	369	244	258	0	57	79	0	87	112	346	538	238	154	406	279	55	525	551	116	2,6	1,10E-02																		
Isoforma 2 da Filamina A	IPI00302592	26	19	18	16	11	35	14	19	7	15	22	32	19	66	54	66	19	69	60	84	2,6	1,00E-03																		
Isoforma 1 da Tenascina	IPI00031008	3	11	1	1	0	4	0	0	0	0	2	5	0	1	12	14	0	10	8	16	2,6	3,80E-02																		
Fibrinogênio cadeia beta	IPI00298497	5	25	5	3	16	31	45	23	5	19	30	141	19	29	67	21	3	79	18	62	2,6	4,70E-02																		
Rab GDP dissociação inibidor alfa	IPI00010154	0	1	4	0	0	0	0	3	0	7	4	0	0	0	7	9	7	3	7	16	2,5	4,10E-02																		
cDNA FLJ25678 fis, clone TST04067, altamente similar a PURINA NUCLEOSÍDEO FOSFORILASE	IPI00017672	0	0	0	0	3	2	4	1	2	2	3	1	0	0	8	8	5	10	7	9	2,4	1,40E-02																		
Isoforma 2 de Basigin	IPI00019906	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	4	2	4	1	2	1	4	2,3	3,40E-03																		
EEF1D	IPI01009986	3	1	2	1	1	2	1	2	1	3	2	1	4	7	5	7	6	4	7	11	2,3	1,10E-03																		
Proteína de repetição rica em Leucina contendo 59	IPI00396321	2	1	2	1	1	1	0	0	1	0	0	1	3	9	4	5	1	4	2	6	2,3	1,40E-02																		
Isoforma Gama-B da cadeia gama do Fibrinogênio	IPI00021891	7	22	2	1	16	30	31	16	7	12	23	68	23	26	43	22	3	52	20	40	2,1	1,70E-02																		

Laminina subunidade beta-1	IPI00013976	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	5	0	2	0	3	2,1	3,80E-02
Isoforma Del-701 transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3	IPI00306436	3	0	2	1	3	1	0	1	0	0	3	1	1	1	6	7	5	4	2	6	2,1	7,80E-03	
cDNA FLJ55990, altamente similar ao domínio LIM e proteína de ligação a actina 1	IPI00796705	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	4	0	0	1	3	2,1	2,30E-02	
Alfa-actinina-1 isoforma A	IPI00759776	22	10	0	18	20	22	22	22	13	13	21	24	0	93	39	39	16	39	26	44	2,1	4,00E-02	
Isoforma 4 of Plectina	IPI00398779	29	28	45	28	23	36	32	25	25	44	48	28	29	116	71	76	37	45	74	106	2,0	6,00E-03	
cDNA FLJ56016, altamente similar a C-1-tetrahydrofolato sintase, citoplasmática	IPI00794900	2	1	1	1	0	0	0	2	1	1	1	1	0	4	5	6	2	1	1	7	2,0	3,30E-02	
Glicil-tRNA sintetase	IPI00783097	3	1	1	1	1	0	1	2	3	2	2	5	4	1	2	11	1	3	6	6	2,0	2,00E-02	
Pré-mRNA do processamento do splicing fator 8	IPI00007928	3	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	1	0	1	2	5	2	4	1	6	1,9	4,50E-02	
Proteossoma 26S não-ATPase reguladora subunidade 2	IPI00012268	3	1	0	1	1	4	1	1	1	0	2	1	0	1	6	7	5	2	4	4	1,9	2,10E-02	
Proteína não caracterizada	IPI00646839	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	2	0	4	1	4	3	1	2	4	1,9	6,70E-03	
cDNA FLJ56074, altamente similar a proteína reguladora do oxigênio 150 kDa	IPI00922838	3	1	1	0	2	0	3	0	1	0	2	3	1	1	4	4	7	1	3	4	1,9	9,50E-03	
tRNA-splicing ligase homóloga RtcB	IPI00550689	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	2	2	0	1	3	1,9	1,00E-02	
Proteína não caracterizada	IPI00789324	103	322	229	233	55	69	96	61	103	126	294	422	227	139	313	238	67	395	419	115	1,9	2,30E-02	
Fator eucariótico de iniciação da tradução 2 subunidade 1	IPI00219678	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	1	2	2	0	1	2	3	1,9	9,40E-03	
Isoforma 2 do fator eucariótico de iniciação da tradução 3 subunidade B	IPI00719752	3	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2	1	5	2	2	1	4	5	6	1,9	6,70E-03	
Isoforma Beta-1A da integrina beta-1	IPI00217563	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	0	3	1,8	1,80E-02	
Quinesina-1 cadeia pesada	IPI00012837	3	3	0	2	0	1	3	1	3	0	4	1	0	1	5	7	6	3	7	3	1,8	3,60E-02	
Microtúbulo associado à proteína	IPI00880007	3	1	1	1	1	0	0	2	3	3	4	2	1	1	6	4	5	4	6	4	1,8	8,60E-03	
Anexina A5	IPI00329801	7	3	13	11	6	15	9	10	4	3	17	9	12	33	15	19	9	9	6	20	1,7	2,80E-02	
Proteína nucleolar 58	IPI00006379	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	3	1	2	1	1	1	4	1,7	3,40E-02	
Isoforma 1 da Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 5-fosfatase 1	IPI00329213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	2	0	1	1,7	4,40E-02	
Proteína 44 kDa	IPI00183508	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	2	4	4	1	2	3	3	1,7	1,10E-02	
Miosina regulatória cadeia leve 12A	IPI00220573	9	2	9	5	8	9	6	5	6	8	6	7	10	17	19	11	10	12	11	18	1,7	4,00E-03	
Complexo T proteína 1 subunidade zeta	IPI00027626	1	0	0	1	1	4	1	1	2	1	2	3	1	1	1	6	6	2	3	3	1,7	2,30E-02	
Prefoldin subunidade 2	IPI00006052	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	1	0	1	1,7	1,10E-02	
L-lactato desidrogenase A isoforma 3	IPI00947127	15	16	21	28	11	20	24	9	13	27	17	27	20	46	30	40	21	40	42	28	1,7	3,90E-03	

Isoforma 1 da Tropomiosina alfa-4	IPI00010779	4	3	5	4	2	7	8	7	9	8	5	4	4	16	7	16	10	15	9	16	1,7	2,30E-02
Isoforma 1 da Nucleofosmina	IPI00549248	6	2	8	5	4	9	4	7	3	5	6	3	5	15	13	15	5	9	7	14	1,7	2,10E-02
RNA ligado à proteína EWS isoforma 1	IPI00009841	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	1	2	1	2	1	3	1,7	1,20E-02
Isoforma 1 da Miosina 9	IPI00019502	61	43	70	48	68	81	56	58	41	57	52	82	38	163	117	122	80	110	90	112	1,6	5,40E-03
Sin3 histona desacetilase corressora complexo componente SDS3	IPI00607645	0	1	2	2	0	1	0	3	1	1	1	1	4	2	2	4	5	3	0	4	1,6	3,20E-02
Moesina	IPI00219365	11	9	12	13	9	21	10	13	13	12	15	16	8	45	27	33	11	17	18	16	1,6	3,80E-02
Isoforma 3 da proteína de transporte Intraflagellar 88 homóloga	IPI00973733	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	2	1	1	1	2	2	0	1	0	1	1,6	2,20E-02
Isoforma 1 do provável fosfolipídio de transporte ATPase VD	IPI00001723	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	3	0	0	1	1	1	1	1	1,6	1,70E-02
Isoforma 2 da Ubiquilin-1	IPI00071180	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0	1	2	1	1	1	1,6	2,30E-02
Isoforma 2 da adenilil ciclase associada à proteína 1	IPI00639931	7	5	6	4	8	11	12	9	9	8	8	11	4	16	21	22	13	9	11	11	1,5	2,70E-02
Proteína semelhante à Dinamin 1, isoforma CRA_c	IPI01010281	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	1	1	1	1	1	3	1,5	3,20E-02
Isoforma 2 da UTP glicose-1-fosfato uridililtransferase	IPI00395676	2	1	0	1	1	0	1	0	1	2	1	0	2	4	1	1	1	1	3	1	1,5	3,10E-02
Proteossoma 26S não-ATPase regulatória subunidade 14	IPI00024821	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	2	0	1	2	1	1,5	2,70E-02
Isoforma 1 de MAP7 contendo domínio proteína 1	IPI00654605	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1,5	8,70E-03
Fator eucariótico de iniciação 4A-I	IPI00025491	12	11	26	16	11	14	13	24	18	13	6	14	27	40	25	31	30	16	23	30	1,5	2,80E-02
Homóloga da proteína flightless 1	IPI00031023	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	3	2	1	2	1	0	2	0	1,5	4,10E-02
Proteína não caracterizada	IPI01012107	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1,5	1,50E-02
Proteína quinase, cAMP-dependente, regulatória, tipo II, alfa, isoforma CRA_b	IPI00063234	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1,5	9,80E-03
Neuroblasto de diferenciação associada à proteína AHNAK	IPI00021812	124	61	107	42	158	138	134	198	135	145	50	78	91	78	57	47	170	79	100	71	-1,5	3,10E-02
Cistatina-B	IPI00021828	11	3	21	7	25	15	18	16	20	19	6	9	15	1	8	11	14	12	15	7	-1,5	3,40E-02
Transaldolase	IPI00744692	7	2	7	6	8	5	5	10	6	9	2	3	3	3	5	2	5	2	4	10	-1,6	1,60E-02
Isoforma 1 da Miosina 14	IPI00337335	14	12	11	10	14	6	18	11	15	23	2	6	5	15	10	8	14	10	4	9	-1,6	1,70E-02
NADPH desidrogenase [quinona] 1	IPI00012069	2	1	0	1	2	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-1,6	2,70E-02
Isoforma Citoplasmática peroxissomal de Peroxiredoxin-5, mitocondrial	IPI00759663	13	2	13	4	10	2	14	10	11	10	5	3	5	3	8	1	9	4	7	6	-1,6	3,30E-02
Isoforma 3 da espectrina cadeia alfa, cérebro	IPI00843765	13	10	11	8	12	11	13	8	9	14	1	11	5	6	5	5	11	9	4	7	-1,6	1,20E-03
Complexo citocromo b-c1 subunidade 2, mitocondrial	IPI00305383	4	2	7	2	4	4	5	5	2	3	2	1	1	2	2	2	2	0	1	6	-1,7	1,30E-02
NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 subcomplexo alfa subunidade 9,	IPI00003968	3	1	0	1	0	1	1	1	2	2	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	-1,7	1,40E-02

mitocondrial																							
Proteína prenilttransferase alfa subunidade 1	IPI00399115	0	0	0	0	1	0	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1,7	4,00E-02	
Antígeno de linfócito 6D	IPI00029510	0	1	0	0	2	1	3	2	3	2	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	-1,7	4,40E-02
Ly6/PLAUR domínio contend proteína 3	IPI00004310	6	2	7	6	9	7	9	8	5	5	2	3	4	0	4	5	7	4	6	0	-1,7	4,00E-03
Proteína zinc finger 282	IPI00003798	0	0	0	0	1	0	3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1,8	1,60E-02
Glutamina sintetase	IPI00010130	2	1	0	1	2	1	0	0	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	-1,9	4,70E-02
cDNA FLJ50378, altamente similar a fenilalanil-tRNA sintetase cadeia alfa	IPI00909657	0	0	0	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1,9	8,90E-04
Colágeno cadeia alfa-2I	IPI00304962	3	3	5	4	0	9	1	8	1	6	0	1	5	4	1	1	0	1	1	1	-1,9	4,90E-02
Proteína S100-A14	IPI00010214	9	5	13	4	11	10	10	16	18	8	2	4	5	1	4	7	9	9	6	3	-1,9	3,80E-03
Isoforma 2 de hidroxiaçil-coenzima A desidrogenase, mitocondrial	IPI00298406	3	1	1	1	1	4	3	3	0	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	1	-1,9	1,20E-02
Fator de coagulação XIII cadeia A	IPI00297550	1	2	2	3	1	2	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-2,0	4,70E-03
Fosfoglucomutase 2	IPI00550364	2	2	1	2	1	1	1	3	2	5	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	-2,0	2,30E-03
Isoforma 1 da 3-hidroxiaçil-CoA desidrogenase tipo-2	IPI00017726	3	1	2	2	4	5	6	3	6	2	2	1	0	2	1	0	3	1	1	1	-2,0	1,60E-03
D-3-fosfoglicerato desidrogenase	IPI00011200	2	4	2	3	1	1	0	3	3	3	0	0	0	2	0	0	1	0	0	3	-2,1	4,00E-03
Pequena proteína rica em prolina 3	IPI00082931	8	6	19	8	33	14	29	34	44	21	9	11	19	0	1	0	27	12	16	4	-2,1	3,20E-02
Proteína não caracterizada	IPI01012729	2	0	0	0	4	1	4	7	3	1	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	-2,1	3,90E-02
Isoforma 1 de queratina, tipo I citoesquelal 13	IPI00009866	1318	238	624	258	1269	810	1091	1235	1464	589	465	272	648	234	241	203	1385	274	242	197	-2,1	1,90E-02
Envoplakin	IPI00023711	40	9	15	11	52	25	60	45	47	42	7	9	12	1	12	13	55	26	20	0	-2,2	2,10E-02
Enoil-CoA hidratase, mitocondrial	IPI00024993	3	1	2	3	0	5	4	6	9	2	1	0	0	1	1	1	6	0	1	0	-2,2	2,50E-02
Isoforma 1 de queratina, tipo II citoesquelal 78	IPI00477227	9	11	8	6	15	12	22	26	45	19	8	5	3	2	6	5	30	7	7	0	-2,2	4,20E-02
4-trimetilaminobutiraldeído desidrogenase	IPI00479877	2	1	1	1	4	0	1	5	5	6	1	0	1	0	0	0	2	1	1	0	-2,2	1,30E-02
Isoforma 3 da Interleucina-1 proteína antagonista do receptor	IPI00218573	0	0	1	0	4	0	1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2,2	1,20E-02
Queratina, tipo I citoesquelal 19	IPI00479145	263	75	172	62	220	157	213	242	282	97	131	44	114	49	0	0	267	36	39	82	-2,3	1,00E-02
Isoforma 2 da desidrogenase aldeído graxo	IPI00394758	3	2	8	1	3	2	0	3	7	5	0	1	1	2	0	0	5	0	0	0	-2,4	1,20E-02
Prolargin	IPI00020987	1	4	1	5	0	4	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-2,4	1,20E-02
Apolipoproteína B-100	IPI00022229	16	8	1	2	4	30	28	25	6	6	4	13	0	1	1	1	13	7	1	1	-2,6	4,30E-02

Isoforma 1 da Sciellin	IPI00329108	6	1	5	1	9	5	15	13	19	3	2	1	0	0	0	0	16	1	3	0	-2,6	4,40E-02
Alfa-cristalina cadeia B	IPI00021369	0	2	0	0	0	0	4	0	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2,7	4,20E-02
cDNA FLJ53421, altamente similar à Homo sapiens família de ligação guanilato, membro 6 GBP6, mRNA	IPI01009416	29	14	14	11	50	30	31	40	34	38	6	8	7	0	5	9	39	2	14	7	-2,8	1,70E-03
Periplakin	IPI00298057	36	14	34	18	77	35	64	62	78	46	8	14	19	0	7	7	58	18	23	3	-2,8	3,00E-03
Isoforma 1 da Proteína POF1B	IPI00103242	3	9	4	1	3	0	0	1	5	10	0	1	0	0	0	0	0	3	1	0	-3,2	1,20E-02
Alfa-2-macroglobulina semelhante à proteína 1	IPI00419215	16	27	2	16	65	26	65	45	68	41	6	14	0	0	4	4	40	15	18	0	-3,5	4,70E-03
GUCA1B (fragmento)	IPI00930614	256	2	99	0	220	161	199	262	293	80	0	0	83	0	0	0	269	0	14	0	-4,2	1,20E-02
Proteína 64 kDa	IPI00290078	200	10	310	45	736	60	474	948	1109	35	108	11	38	0	42	15	562	37	30	4	-4,6	4,10E-02
Isoforma 1 da queratina, tipo II citoesqueletal 73	IPI00174775	50	16	0	0	62	17	42	67	93	23	0	0	18	0	0	8	44	0	0	0	-4,7	1,20E-02

Anexo 4

Tabela Suplementar 2 - Proteínas marcadoras de classe segundo as análises multivariadas por PLS-DA e SVM.

Proteínas Identificadas (2529)	Número de acesso	PLS-DA	SVM	Mucosa Oral Normal										CEC Oral										razão	Valor p
				PG57_10_11	PG87_10_11	PG28_12_11	PG88_10_11	PG16_04_91	PG34_12_05	PG41_06_04	PG53_06_08	PG06_04_11	PG34_04_11	PG57_10_11	PG87_10_11	PG28_12_11	PG88_10_11	PG16_04_91	PG34_12_05	PG41_06_04	PG53_06_08	PG06_04_11	PG34_04_11		
Queratina tipo I citoesquelético 17	IPI00450768	•	•	0	369	244	258	0	57	79	0	87	112	346	538	238	154	406	279	55	525	551	116	2,6	1,10 E-02
Isoforma 1 do microtúbulo de actina ligação cruzada fator 1, isoformas 1/2/3/5	IPI00550385	•	•	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	1	0	2	4	2	1	6	6	0	3,1	3,60 E-03
Proteína S100-A14	IPI00010214	•	•	9	5	13	4	11	10	10	16	18	8	2	4	5	1	4	7	9	9	6	3	0,5	3,80 E-03
D-3-fosfoglicerato desidrogenase	IPI00011200	•	•	2	4	2	3	1	1	0	3	3	3	0	0	0	2	0	0	1	0	0	3	0,5	4,00 E-03
Isoforma 1 de 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase tipo 2	IPI00017726	•	•	3	1	2	2	4	5	6	3	6	2	2	1	0	2	1	0	3	1	1	1	0,5	1,60 E-03
Proteína do choque térmico beta-1	IPI00025512	•	•	44	45	51	40	47	45	41	50	62	63	34	26	41	33	31	39	51	36	38	47	0,8	4,70 E-03
Proteína quinase, cAMP dependente, regulatória, tipo II, alfa, isoforma CRA_b	IPI00063234	•	•	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,7	9,80 E-03
Fator de coagulação XIII cadeia A	IPI00297550	•	•	1	2	2	3	1	2	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	4,70 E-03
cDNA FLJ50378, altamente similar a fenilalanina-tRNA sintetase cadeia alfa	IPI00909657	•	•	0	0	0	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	8,90 E-04
Ly6/PLAUR domínio contendo proteína 3	IPI00004310	•	•	6	2	7	6	9	7	9	8	5	5	2	3	4	0	4	5	7	4	6	0	0,6	4,00 E-03
Proteína S100-A14	IPI00010214	•	•	9	5	13	4	11	10	10	16	18	8	2	4	5	1	4	7	9	9	6	3	0,5	3,80 E-03
D-3-fosfoglicerato desidrogenase	IPI00011200	•	•	2	4	2	3	1	1	0	3	3	3	0	0	0	2	0	0	1	0	0	3	0,5	4,00 E-03
Isoforma 1 da 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase tipo 2	IPI00017726	•	•	3	1	2	2	4	5	6	3	6	2	2	1	0	2	1	0	3	1	1	1	0,5	1,60 E-03
Proteína do choque térmico beta 1	IPI00025512	•	•	44	45	51	40	47	45	41	50	62	63	34	26	41	33	31	39	51	36	38	47	0,8	4,70 E-03
Proteína quinase, cAMP dependente, regulatória, tipo II, alfa, isoforma CRA_b	IPI00063234	•	•	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,7	9,80 E-03
Isoforma 1 da queratina tipo II citoesquelético 73	IPI00174775	•	•	50	16	0	0	62	17	42	67	93	23	0	0	18	0	0	8	44	0	0	0	0,2	1,20 E-02
Fator de coagulação XIII cadeia A	IPI00297550	•	•	1	2	2	3	1	2	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	4,70 E-03
Periplakin	IPI00298057	•	•	36	14	34	18	77	35	64	62	78	46	8	14	19	0	7	7	58	18	23	3	0,4	3,00

Isoforma 1 do microtúbulo de actina ligação cruzada, isoformas 1/2/3/5	IPI00550385	•	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	2	4	2	1	6	6	0	3,1	3,60 E-03
tRNA splicing RtcB ligase homóloga	IPI00550689	•	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	2	2	0	1	3	1,9	1,00 E-02	
Proteína não caracterizada	IPI00646839	•	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	2	0	4	1	4	3	1	2	4	1,9	6,70 E-03	
Isoforma 1 de MAP7 contendo domínio proteína 1	IPI00654605	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1,5	8,70 E-03	
Isoforma 2 do fator eucariótico de iniciação da tradução 3 subunidade B	IPI00719752	•	3	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2	1	5	2	2	1	4	5	6	1,9	6,70 E-03	
Microtúbulo associado a proteína	IPI00880007	•	3	1	1	1	1	0	0	2	3	3	4	2	1	1	6	4	5	4	6	4	1,8	8,60 E-03	
Filamina B isoforma 1	IPI00900293	•	17	11	4	13	11	7	8	7	4	16	23	16	4	24	81	51	10	56	43	16	3,1	1,00 E-02	
cDNA FLJ56074, altamente similar a proteína reguladora do oxigênio 150kDa	IPI00922838	•	3	1	1	0	2	0	3	0	1	0	2	3	1	1	4	4	7	1	3	4	1,9	9,50 E-03	
L-lactato desidrogenase cadeia A isoforma 3	IPI00947127	•	15	16	21	28	11	20	24	9	13	27	17	27	20	46	30	40	21	40	42	28	1,7	3,90 E-03	
EEF1D	IPI01009986	•	3	1	2	1	1	2	1	2	1	3	2	1	4	7	5	7	6	4	7	11	2,3	1,10 E-03	
Isoforma 1 provável transportadora de fosfolípido ATPase VD	IPI00001723	•	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	3	0	0	1	1	1	1	1	1,6	1,70 E-02	
Sindecin 1	IPI00002441	•	2	1	0	1	0	0	0	2	1	2	1	2	1	1	1	0	2	1	3	1	1,2	2,50 E-01	
Isoforma 1 de ATP dependente RNA helicase DDX19B	IPI00008943	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1,3	6,60 E-02	
Espiral enrolada do domínio contendo proteína 130	IPI00011306	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	1,50 E-01	
Isoforma 1 do Fibrinogênio cadeia alfa	IPI00021885	•	3	16	0	3	10	27	35	17	12	17	29	54	8	14	36	13	2	52	16	33	1,8	9,50 E-02	
Isoforma Gama B de fibrinogênio cadeia gama	IPI00021891	•	7	22	2	1	16	30	31	16	7	12	23	68	23	26	43	22	3	52	20	40	2,1	1,70 E-02	
Complemento C1q subcomponente subunidade C	IPI00022394	•	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1,1	4,40 E-01	
Proteína 202 kDa	IPI00164441	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1,2	1,70 E-01	
Esperma associado a antígeno 17	IPI00174345	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1,2	1,60 E-01	
Isoforma 4 de Nesprin-1	IPI00247295	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1,3	7,40 E-02	
DmX semelhante a proteína 1	IPI00294728	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1,2	1,70 E-01	
Fibrinogênio cadeia beta	IPI00298497	•	5	25	5	3	16	31	45	23	5	19	30	141	19	29	67	21	3	79	18	62	2,6	4,70 E-02	
Vitronectina	IPI00298971	•	0	1	0	0	0	1	3	1	0	0	2	4	0	3	2	1	0	3	0	0	1,6	1,20 E-01	

Isoforma 1 de fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato 5 fosfatase 1	IPI00329213	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	2	0	1	1,7	4,40
Miosina-le	IPI00329672	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1,3	7,00
Isoforma 2 de Fibulina 2	IPI00465038	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	7,30
Isoforma 1 de citoplasmático FMR1 proteína 1 de interação	IPI00644231	•	0	0	1	1	4	1	1	0	0	5	2	2	1	4	0	4	3	0	2	1	1,2	4,60	
Isoforma 2 de proteína vacuolar associada a proteína 13D	IPI00783859	•	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1,3	8,10
Flotillin 2	IPI00789008	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1,3	6,90
Serina treonina quinase receptor associada a proteína	IPI00941907	•	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	2	0	1,4	1,10
Proteína não caracterizada	IPI00967744	•	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1,5	1,00
Proteína não caracterizada	IPI01012107	•	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1,5	1,50
Mitocondrial transportadora homóloga 2	IPI00003833	•	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,9	5,50
NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 alfa subcomplexo subunidade 9, mitocondrial	IPI00003968	•	3	1	0	1	0	1	1	1	2	2	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0,6	1,40	
Proteína Jade 3	IPI00006077	•	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	8,00
Queratina, tipo II citosquelal 2 oral	IPI00008359	•	124	997	149	621	120	170	157	136	241	908	142	193	155	183	141	141	115	168	145	159	0,4	7,40	
Ras proteína relacionada a Rab-1B	IPI00008964	•	3	3	7	5	4	5	6	5	6	0	4	0	5	0	1	0	3	4	0	9	0,7	1,50	
24-hidroxicolesterol 7 alfa hidroxilase	IPI00009883	•	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,7	7,20
Epóxido hidrolase 1	IPI00009896	•	1	0	2	1	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0,7	1,80	
60S ribossomal proteína L8	IPI00012772	•	3	3	4	2	2	1	3	2	2	2	0	1	1	3	0	4	1	0	1	4	0,7	1,10	
Isoforma 1 do fator de clivagem e poliadenilação subunidade 6	IPI00012998	•	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,9	4,30	
Proteína vacuolar associada à proteína 35	IPI00018931	•	4	2	5	2	2	4	4	1	2	3	2	1	0	2	2	4	2	2	3	1	0,8	5,60	
Prolargin	IPI00020987	•	1	4	1	5	0	4	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,4	1,20	
Alfa cristalina cadeia B	IPI00021369	•	0	2	0	0	0	0	4	0	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	4,20	
Transcricional ativador da proteína Pur-alfa	IPI00023591	•	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,8	1,00	
RNA de ligação proteína 3	IPI00024320	•	0	1	2	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0,7	9,50	
PDZ domínio contendo proteína GIPC1	IPI00024705	•	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9	1,50	

Enoil-CoA hidratase, mitocondrial	IPI00024993	•	3	1	2	3	0	5	4	6	9	2	1	0	0	1	1	1	6	0	1	0	0,5	2,50 E-02
Acetil-CoA acetiltransferase, mitocondrial	IPI00030363	•	3	1	1	1	1	4	1	1	1	3	1	0	0	1	2	4	2	0	0	3	0,8	2,90 E-01
UDP-glucose 6 desidrogenase	IPI00031420	•	3	2	7	1	1	1	9	0	9	12	1	1	0	0	1	0	2	2	1	7	0,5	5,20 E-02
ATP-dependente RNA helicase DHX8	IPI00031508	•	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,9	3,90 E-01
Isoforma 1 da Proteína POF1B	IPI00103242	•	3	9	4	1	3	0	0	1	5	10	0	1	0	0	0	0	0	3	1	0	0,3	1,20 E-02
Isoforma 1 do fator ativador de plaquetas subunidade alfa acetil hidrolase IB subunidade alfa	IPI00218728	•	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0,9	5,40 E-01
NADH desidrogenase [ubiquinona] beta 1 subcomplexo subunidade 4	IPI00220059	•	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0,9	5,30 E-01
Insulina enzima de degradação	IPI00220373	•	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	1,10 E-01
Potencial receptor transitório canal catiônico subfamília M membro 7	IPI00290032	•	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	1,50 E-01
Monoglicerídeo lipase isoforma 1	IPI00293590	•	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,8	1,90 E-01
Isoforma 2 do canal aniônico voltagem dependente seletivo proteína 3	IPI00294779	•	2	1	1	1	1	2	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	2	1	2	3	0,8	2,60 E-01
Isoforma 2 da hidroxíacil coenzima A desidrogenase, mitocondrial	IPI00298406	•	3	1	1	1	1	4	3	3	0	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	1	0,5	1,20 E-02
Isoforma 1 do fator de crescimento epidérmico receptor quinase substrato 8 semelhante a proteína 1	IPI00301250	•	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9	1,70 E-01
Complexo citocromo b-c1 subunidade 2, mitocondrial	IPI00305383	•	4	2	7	2	4	4	5	5	2	3	2	1	1	2	2	2	2	0	1	6	0,6	1,30 E-02
Isoforma 2 da desidrogenase aldeído graxo	IPI00394758	•	3	2	8	1	3	2	0	3	7	5	0	1	1	2	0	0	5	0	0	0	0,4	1,20 E-02
ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial	IPI00440493	•	20	12	38	23	20	24	27	30	23	16	8	8	16	24	24	26	25	12	9	38	0,8	2,80 E-01
Isoforma 2 da proteína não caracterizada C18orf54	IPI00445152	•	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9	1,70 E-01
Isoforma 2 do receptor transitório do canal catiônico subfamília V membro 3	IPI00555580	•	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9	1,70 E-01
Isoforma 2 da proteína 3 com atividade inibitória, Melanoma	IPI00739902	•	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9	1,50 E-01
Isoforma 4 de STAR relacionada com a tranferência, proteína 13	IPI00741772	•	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,7	2,50 E-02
Transaldolase	IPI00744692	•	7	2	7	6	8	5	5	10	6	9	2	3	3	3	5	2	5	2	4	10	0,6	1,60 E-02

Isoforma 1 de ATP de ligação sub-família membro 1	IP100873899	•	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0,8	2,40 E-01	
Isoforma 4 de Dynein cadeia pesada 14, axonemal	IP100925578	•	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9	1,50 E-01	
Proteína não caracterizada	IP100985430	•	1	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,8	2,30 E-01