



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

RACHEL LAMARCK

**Estudo do perfil clínico, histopatológico e  
busca de proteínas marcadoras associadas à  
progressão de Leucoplasia Verrucosa  
Proliferativa para Carcinoma Espinocelular**

Study of clinical, histopathological profile and search for protein  
markers associated with progression of Proliferative Verrucous  
Leukoplakia to Squamous Cell Carcinoma

Piracicaba

2019

**RACHEL LAMARCK**

**Estudo do perfil clínico, histopatológico e busca de proteínas marcadoras associadas à progressão de Leucoplasia Verrucosa Proliferativa para Carcinoma Espinocelular**

Study of clinical, histopathological profile and search for protein markers associated with progression of Proliferative Verrucous Leukoplakia to Squamous Cell Carcinoma

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Estomatopatologia, na Área de Patologia.

Dissertation presented to Piracicaba Dentistry College from the State University of Campinas as part of the requisites required to obtain a master's degree in Stomatopathology, in the field of Pathology.

Orientador: Profa. Dr<sup>a</sup>. Adriana Franco Paes Leme

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA RACHEL LAMARCK E ORIENTADA PELA PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ADRIANA FRANCO PAES LEME.

**Piracicaba**

**2019**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

L161e Lamarck, Rachel, 1990-  
Estudo do perfil clínico, histopatológico e busca por proteínas marcadoras associadas à progressão de Leucoplasia Verrucosa Proliferativa para Carcinoma Espinocelular / Rachel Lamarck. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Adriana Franco Paes Leme.  
Coorientador: Márcio Ajudarte Lopes.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Leucoplasia bucal. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Proteômica. 4. Espectrometria de massa. I. Leme, Adriana Franco Paes. II. Lopes, Márcio Ajudarte, 1967-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of clinical, histopathological profile and search for protein markers associated with the progression from Proliferative Verrucous Leukoplakia to Squamous Cell Carcinoma

**Palavras-chave em inglês:**

Leukoplakia, oral  
Carcinoma, squamous cell  
Proteomics  
Mass spectrometry

**Área de concentração:** Patologia

**Titulação:** Mestra em Estomatopatologia

**Banca examinadora:**

Adriana Franco Paes Leme [Orientador]  
Marcio Chaim Bajgelman  
Fernanda Viviane Mariano Brum Corrêa

**Data de defesa:** 28-02-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Estomatopatologia

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0007-7417>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2402594517445778>



**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 28 de Fevereiro de 2019, considerou a candidata RACHEL LAMARCK aprovada.

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ADRIANA FRANCO PAES LEME

PROF. DR. MARCIO CHAIM BAJGELMAN

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. FERNANDA VIVIANE MARIANO BRUM CORRÊA

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## Dedicatória

A meu pai, o primeiro cientista que conheci,  
a minha maior saudade.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gostaria de agradecer à Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, na pessoa do diretor Dr. Francisco Haiter Neto.

Ao programa de pós-graduação em estomatopatologia da FOP – UNICAMP na pessoa do coordenador Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes.

Ao Laboratório Nacional de Biociências na pessoa do diretor Dr. Kleber Gomes Franchini, que forneceu a infraestrutura necessária para o processamento e análise das amostras.

À Biomolecular Research Facility da University of Virginia, sob a responsabilidade do Dr. Nick Sherman, por disponibilizar o uso de seus equipamentos para a etapas de espectrometria de massas.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Adriana, pela orientação, paciência e compreensão, pelas (muitas) revisões principalmente durante a padronização de protocolo, sempre pronta para melhorar em cima dos resultados que mostramos, ajudando no que fosse preciso e guiando a todos do laboratório, por desde o início acreditar em mim e no trabalho que me foi dado.

Ao meu coorientador, Prof. Márcio, pelo auxílio na orientação, pelas oportunidades de trabalhos acadêmicos, pela transmissão de conhecimento na prática da clínica, na experiência como docente e coordenador, pelos vários conselhos e acompanhamento durante todas as fases do mestrado.

À toda a equipe de professores do departamento de Estomatologia e Patologia Oral por me darem acesso ao aprendizado, materiais e oportunidades de trabalhos e em especial ao prof. Dr. Márcio e prof. Dr. Alan por abrirem as portas do Orocentro para mim, permitindo não só que eu tivesse acesso à minha amostra, mas que aprendesse muito no dia-a-dia da clínica e da faculdade.

Às meninas do LNBio, em especial Rute, Tati e Ari, pessoas essenciais para o meu aprendizado na espectrometria de massas, adequação na rotina do laboratório, organização de experimentos e principalmente em todos os vários ajustes de protocolo, preparo e processamento de amostras e análises de dados, estando presentes em todas as etapas.

Ao Rogério, Dani e aos amigos de Orocentro que, mesmo com minhas coletas sendo feitas durante seu atendimento, sempre foram muito solícitos, não só me auxiliando, mas permitindo que eu participasse junto com eles da rotina da clínica de diagnóstico.

Aos vários colegas e amigos que fiz nesse período intenso de mestrado, que sempre se fizeram presentes e me deram além do apoio emocional uma grande coletânea de risadas e momentos lindos que levarei em meu coração para a vida. Agradeço também a meu namorado, Thiago, meu companheiro não só de relacionamento como

de jornada de pós-graduação, me ajudando, aconselhando e tornando meus dias mais leves aqui.

Aos meus familiares, os quais nunca conseguirei expressar o suficiente o quão essenciais foram em todos os significados da palavra para que eu estivesse aqui, que estiveram presentes em tudo, por tudo e para tudo não só no meu caminho profissional mas na minha formação como ser humano e para os quais nunca conseguirei pagar a dívida de me darem a vida.

## Resumo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leucoplasias orais (LO) são definidas clinicamente como placas brancas não removíveis à raspagem e que não podem ser definidas como qualquer outra doença. Já a leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), um subtipo de LO, apresenta um perfil epidemiológico diferente, não ligado a hábitos de fumo ou etilismo e apresenta altos índices de recorrência. A progressão de LO e LVP para carcinoma espinocelular (CEC) é de aproximadamente 2% e maior que 70%, respectivamente. A grande preocupação da progressão é que o CEC apresenta taxa de sobrevida de casos avançados de aproximadamente 50% em 5 anos após o diagnóstico, e corresponde a 90% dos tumores malignos de cavidade oral. Além disso, de acordo com o GLOBOCAN 2018, o CEC está entre os 10 tumores com maior incidência no mundo. Dessa forma, torna-se fundamental conhecer os marcadores que possam ajudar prever a transformação maligna na prática clínica. Para isso, nesse estudo avaliou a abundância das proteínas na saliva por proteômica baseada em descoberta, cujo fluido é promissor como fonte de marcadores por não ser invasivo e estar em contato direto com as lesões. Foi realizada a coleta de saliva dos pacientes, divididos em quatro condições de acordo com o tipo de lesão, LO (N=16), LVP (N=13) e CEC (N=14) e, grupo controle (CO, N=15). Em resumo, as proteínas de cada amostra foram submetidas aos passos de i) quantificação, ii) precipitação, iii) redução, alquilação e digestão com tripsina e LysC, iv) marcação dos peptídeos com etiquetas contendo 10 diferentes reagentes isóbaros que permitem a quantificação relativa por meio de íons repórteres únicos e v) injeção e aquisição dos dados no equipamento Q Exactive HF-X acoplado ao sistema de cromatografia líquida. Os arquivos brutos foram submetidos às buscas no programa Proteome Discoverer 2.2 e analisados no programa Scaffold 4.8.7. As análises estatísticas foram realizadas no Perseus 1.6, o enriquecimento dos processos biológicos no Enrichr e a correlação com dados clínicos públicos no PROGgeneV2. Os resultados indicam a identificação e quantificação de 319 proteínas na saliva. Trinta e sete proteínas são estatisticamente significantes entre todas as condições, sendo 13 proteínas diferencialmente abundantes entre CO e CEC e 18 entre LO e CEC, três proteínas foram exclusivas do grupo CO e quatro exclusivas entre LVP e CEC. Das 37 proteínas, doze proteínas tiveram associação entre a expressão gênica em carcinoma de cabeça e pescoço com o baixo prognóstico em sobrevida geral,

sobrevida livre de metástase e sobrevida livre de recorrência. Em conclusão, esse estudo indica que proteínas da saliva apresentam potencial de predizer a transformação maligna. Destacam-se as proteínas alfa-2-macroglobulina, moesina e receptor polimérico de imunoglobulina (CO e CEC) como candidatas a marcadoras de malignização, pois são diferencialmente abundantes entre CO e CEC e nos grupos LO e LVP apresentam uma abundância intermediária. O próximo passo desse projeto é a verificação dos candidatos em saliva por proteômica dirigida e em imunohistoquímica das lesões em um coorte independente de pacientes.

Palavras-chave: Leucoplasia oral; leucoplasia verrucosa proliferativa; carcinoma espinocelular; proteômica; espectrometria de massas.

## Abstract

According to the World Health Organization (WHO), Oral Leukoplakias (OL) are clinically defined as irremovable onto scraping white plaques, which cannot be defined as any other lesion. Proliferative Verrucous Leukoplakia (PVL) is a subtype of OL which has a different epidemiological profile, not related to smoking or drinking habits and presents high rates of recurrence. The progression of OL and PVL into Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) are about 2% and higher than 70%, respectively. The major concern from this progression is that the OSCC survival rate is still about 50% in 5 years after the diagnosis for advanced cases, and corresponds to 90% of malignant tumors of oral cavity. According to GLOBOCAN 2018, it is amongst the 10 most incident tumors in the world. Thus, the knowledge of potential markers that can anticipate the malignant transformation in the clinical routine is needed. For that, this study analyzed the abundance of proteins in saliva through discovery-based proteomics, this fluid is a promising source of markers for not being invasive and having direct contact with the lesions. The saliva was collected from the patients divided in four conditions according to each lesion, OL (N=16), PVL (N=13), OSCC (N=14) and control group (CO), (N=15). Briefly, the proteins of each group were submitted to: i) quantification, ii) precipitation, iii) reduction, alkylation and digestion with trypsin and LysC, iv) peptide tagging with 10 different isobaric tags that allows relative quantification through unique reporter ions and v) injection and data acquisition on a Q Exactive HF-X coupled to liquid chromatography system. Raw files were submitted to Proteome Discoverer 2.2 and Scaffold 4.8.7. This statistical analysis was performed in Perseus 1.6, the enrichment of biological processes in Enrichr and the correlation with public clinical data in PROGgeneV2. Results show the identification and quantification of 319 proteins in saliva. Thirty-seven proteins are statistically significant amongst all conditions and 3 are exclusive of CO group and 4 are exclusive between PVL and OSCC, 13 proteins were differentially abundant between CO and OSCC and 18 between OL and OSCC. From 37 proteins, twelve showed association between the gene expression in HNSCC and poor prognosis in overall survival rate, metastasis free survival rate and relapse free survival rate. In conclusion, this study indicates that saliva proteins have potential to predict malignant transformation. We highlight the proteins alfa-2-macroglobulin, moesin and polymeric immunoglobulin receptor as candidate markers in malignant transformation, considering they are differentially

abundant in CO and OSCC and have an intermediary abundancy in OL and PVL. The next step of this project will be to verify these candidates in saliva through targeted proteomics and immunohistochemistry of lesions in an independent patient cohort.

**Key words:** Oral leukoplakia; proliferative verrucous leukoplakia; oral squamous cell carcinoma; proteomics; mass spectrometry.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	16
3 PROPOSIÇÃO .....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	25
5 RESULTADOS .....	32
6 DISCUSSÃO .....	51
7 CONCLUSÃO .....	59
8 PERSPECTIVAS .....	60
REFERÊNCIAS .....	61
ANEXOS .....	73
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética .....	73
Anexo 2 – Tabela 1 - Distribuição das amostras por tipo de lesão ;.....	82
Anexo 3 – Gráficos de dispersão das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos LO vs CEC .....	83
Anexo 4 – Comparação dos grupos LO e LVP com bancos de dados de sobrevida geral, sobrevida livre de metástase e sobrevida livre de recorrências .....	86
Anexo 5 – Relatório do Turnitin .....	93

## 1. Introdução

A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é um subtipo de leucoplasia oral (LO), uma desordem oral potencialmente maligna que se inicia como uma lesão leucoplásica aparentemente inócua e se torna multifocal e de textura verrucosa, apresentando um comportamento agressivo. Apresenta ainda altas taxas de malignização e múltiplas recorrências, além de não apresentar um fator etiológico conhecido ou métodos de diagnóstico bem estabelecidos, sendo transformada majoritariamente em carcinoma espinocelular (CEC) oral. (Gouvea et al., 2010; Munde & Karle, 2016).

As desordens orais potencialmente malignas (DOPM) apresentam diferentes taxas de transformação em CEC, o que pode ser um indicativo de diferentes genes, proteínas e outras moléculas presentes sendo associados com características como progressão mais rápida, pior prognóstico e presença de metástases. As interações entre células com alterações potencialmente malignas, células do estroma e células do sistema imune podem modificar o desenvolvimento das DOPM em CEC (Ai et al., 2017).

O câncer de cavidade oral está entre os 20 mais prevalentes no mundo e entre os 4 tipos de câncer mais prevalentes em países emergentes, a estimativa é de que em 2018 houveram 354,864 novos casos de câncer em boca e lábio e 177,384 mortes em decorrência deles (Bray et al., 2018). O CEC oral, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017) e o GLOBOCAN 2018, compõe 90% dos tumores de cavidade oral e lábios (Bray et al., 2018).

No Brasil, segundo estimativa anual feito pela Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2018 foram estimados 14,700 novos casos, com 5,898 mortes, sendo o quarto tipo de câncer mais comum em homens na região sudeste. O CEC afeta geralmente homens acima de 50 anos, tabagistas e etilistas e apresenta um comportamento agressivo, tendência a recorrência em 50% dos casos após 5 anos, além do risco de metástase, seu diagnóstico é feito com o auxílio de análise histopatológica de biópsias de tecido retirado da lesão (Wang et al., 2014).

O manejo do CEC oral é feito por meio do sistema de estadiamento *Tumor-Nodes-Metastasis* (TNM), que leva em consideração a quantidade de lesões primárias e seu tamanho; a quantidade, tamanho e localização de metástases em cadeias

linfonodais e o tamanho e quantidade de metástases em outros órgãos para poder determinar o tipo de tratamento e prognóstico esperados, levando esses dados em consideração as lesões são divididas em quatro estágios diferentes, de I a IV, sendo I o mais brando e IV o mais grave; os estágios apresentam diferenças significativas na sobrevida, sendo de 75%-90% no estágio I e caindo para 10-22% no estágio IV (Kowalski et al., 2005).

Contudo, na vivência clínica é possível notar pacientes enquadrados no mesmo estadiamento, submetidos a protocolos semelhantes, porém com diferentes cursos clínicos. O CEC apresenta um desenvolvimento complexo, multifatorial, com vários estágios, interações moleculares atuando como fatores regulatórios, proteínas associadas com transformação maligna, aumento de metástases, recidivas e sobrevida livre da doença (Dong et al., 2015; Rivera, 2015).

Essas moléculas envolvidas no desenvolvimento da doença podem atuar como alvos e auxiliar no diagnóstico prévio ou em um prognóstico com maior exatidão. A busca por proteínas e outras moléculas para atuarem como biomarcadores já vem ocorrendo no estudo de vários tipos de doenças inflamatórias, autoimunes e neoplasias malignas por meio de de biópsias líquidas (Crowley et al., 2013). Esses biomarcadores, de acordo com a *Food and Drug Administration* (Disponível em <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugDevelopmentToolsQualificationProgram/BiomarkerQualificationProgram/ucm535922.htm>), são moléculas capazes de indicar eventos normais ou patogênicos, além da resposta para uma determinada intervenção, portanto o estudo de possíveis marcadores presentes nas DOPM e no CEC podem nos auxiliar a prever a transformação maligna em estágios iniciais, melhorando consideravelmente o prognóstico do paciente.

Alguns exemplos de marcadores utilizados na rotina clínica em diferentes neoplasias são o CD20, que é utilizado em leucemia e linfoma por sua capacidade de matar células B, intimamente relacionadas com a tumorigênese dessas neoplasias, e o gene ALK, que tem aumento de expressão no câncer de pulmão e é alvo do medicamento crizotinib (Selleck, Senthil & Wall, 2017). Apesar disso, ainda não há marcadores utilizados na rotina clínica para LO e LVP, além de nenhum atualmente utilizado para diagnóstico, prognóstico ou presença de metástases em CEC (OMS, 2017).

Uma das principais formas de descobrir novos biomarcadores é comparar as moléculas existentes em uma determinada doença com outra doença ou pacientes saudáveis. Um estudo revisou as metodologias utilizadas para a descoberta de biomarcadores para o câncer de mama e citou métodos como nanoplaquetas com anticorpos imobilizados em sua superfície para ligação com a molécula de interesse, imunoenaios com quimioluminescência para destacar os antígenos previamente escolhidos como alvos, ELISA e várias metodologias diferentes envolvendo a proteômica associada à espectrometria de massas (Nuñez C., 2018).

A proteômica associada à espectrometria de massas é uma técnica promissora na descoberta de biomarcadores, especialmente pelo avanço na instrumentação em termos de sensibilidade, acurácia de massas e versatilidade para realização de diversos tipos de estratégias (Bensimon, Heck & Aebersold, 2012).

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1. Leucoplasia Oral**

As lesões brancas são alguns dos achados clínicos de maior prevalência na cavidade oral, tendo as mais variadas formas de diagnóstico e tratamento (Huber, 2010). Dentre estas, se encontra a LO, que segundo a definição da Organização Mundial da Saúde (2017) é um termo clínico utilizado para descrever placas brancas não removíveis à raspagem após a análise histopatológica excluindo outras condições, com prevalência de 2-3%.

A etiologia da LO é considerada multifatorial, o cigarro e o álcool são os fatores mais comumente associados, também tendo associação com o uso de noz de Areca, sendo seu consumo mais comum na Ásia, além destes, poucos casos são associados exclusivamente a problemas genéticos, os quais são denominados leucoplasia idiopática (Brouns et al., 2012). A localização da lesão, além de sua aparência clínica, também é um fator importante no que diz respeito ao potencial de transformação maligna (Parlatescu et al., 2014).

A LO é mais comumente observada em homens de meia idade e pode ser classificada em dois tipos: homogênea, que clinicamente é vista como uma placa branca uniforme de bordas definidas, e não homogênea, podendo ter pontos vermelhos e superfície exofítica, papilar ou verrucosa, sendo importante observar que os subtipos de LO apresentam prevalências e potenciais de malignização diferentes (Warnakulasuriya et al., 2007; Parlatescu et al., 2014; Ganesh et al., 2018).

Histologicamente, a LO pode apresentar variações em morfologia ou arquitetura celular, desde hiperqueratose e acantose até displasia em diferentes níveis, sendo esse último o achado histológico mais próximo do desenvolvimento de um carcinoma in situ e a confirmação do diagnóstico sempre baseada em análise histopatológica (Müller, 2018).

Segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (2017), a presença de displasias orais no exame histopatológico continua sendo o fator preditivo mais confiável para transformações malignas. Apesar do enorme progresso feito nos últimos tempos na biologia molecular, ainda não foi possível utilizar painéis de

biomarcadores que possam ajudar prever a transformação maligna de leucoplasias orais (OMS, 2017).

## **2.2. Leucoplasia Verrucosa Proliferativa**

Descrita pela primeira vez em 1985 por Hansen e colaboradores em um relato de 30 casos, a leucoplasia verrucosa proliferativa é classificada como um subtipo da leucoplasia oral onde inicialmente as lesões têm aparência convencional, sendo homogênea ou não, tornando-se multifocais e com aspecto verrucoso com o passar do tempo (Hansen et al., 1985).

É considerada uma doença de etiologia desconhecida, com comportamento agressivo, evolução lenta, alta taxa de transformação maligna e múltiplas recidivas após qualquer forma de tratamento. Suas características clínicas são a presença de lesões leucoplásicas, aparentemente inócuas, que se tornam multifocais e de aspecto verrucoso (Hansen et al., 1985; Gouvêa et al., 2010a; Gouvêa et al., 2013).

A maior incidência é em pacientes do sexo feminino em uma proporção de 4:1 e idade média de 62 anos (Silverman & Gorsky, 1997; Gouvêa et al., 2010a; Bagan et al., 2010). Não parece haver relação com fumo (Bagan et al., 2011) ou etilismo (Ge et al., 2011), padrão contrário ao de LO e CEC.

A associação da LVP com alguns patógenos, ainda é controversa. Alguns estudos apontam a relação da ocorrência de LPV com a infecção por papilomavírus humano (HPV), principalmente pelos subtipos 16 e 18 (Silverman; Gorsky, 1997) e pelo vírus do Epstein-Barr (Began et al., 2008). Outros estudos não conseguiram encontrar nenhuma associação tanto com HPV (Pentenero et al., 2014) quanto com Epstein-Barr (Gillenwater et al., 2013).

Histologicamente é possível observar uma sequência de curso da doença, desde hiperqueratose e hiperplasia epitelial até hiperplasia verrucosa, expansão multifocal com ou sem displasia, carcinoma verrucoso ou CEC invasivo (Gouvêa et al., 2010b; Van der Waal, 2010; Gillenwater et al., 2013).

O tempo de transformação maligna da doença é longo, e a porcentagem de pacientes que sofrem essa transformação são altas, com taxas de transformação maligna em média acima de 70% em um período de 4,4 a 11,7 anos, dependendo da

literatura (Hansen et al., 1985; Silverman & Gorsky, 1997; Barnes et al., 2005; Gandolfo et al., 2009; Gouvêa et al., 2010a; Gouvêa et al., 2013). O desenvolvimento de CEC é mais comumente encontrado que carcinoma verrucoso e a transformação maligna geralmente ocorre em mais de um local (Bagan et al., 2003; Bagan et al., 2011).

Embora as lesões de LVP possam ser encontradas em qualquer sítio da cavidade oral, os locais mais comuns são gengiva, mucosa jugal, língua e palato (Hansen et al., 1985; Gouvêa et al., 2010a; Bagan et al., 2013; Gillenwater et al., 2013). Os locais mais comuns para o aparecimento de CEC quando derivado de LVP são gengiva e palato (Bagan et al., 2003; Cerero-Lapiedra et al., 2010), enquanto que no CEC não derivado de LVP as localizações mais comuns são língua e assoalho de boca (Bagan et al., 2004).

Existem vários tratamentos e modalidades terapêuticas isoladas e combinadas preconizados como remoção cirúrgica, crioterapia, uso de laser de dióxido de carbono, radiação, beta-carotenos, uso de vitamina A, retinóides, anti-virais e terapia fotodinâmica (Hansen et al., 1985; Femiano et al., 2001; Poveda-Roda et al., 2010; Ge et al., 2011; Azfar & Elston, 2012; Kharm & Tarakji, 2012), porém a LVP parece resistir a todos os tipos de tratamentos e formar novas lesões (Ge et al., 2011).

Algumas doenças podem mimetizar a LVP principalmente em estágio inicial, como as próprias LOs, hiperkeratoses, líquen plano, reações líquenóides e carcinoma verrucoso esporádico (Batsakis et al. 1999; Gillenwater et al., 2014; Malik et al., 2014). Isto tem gerado divergências na literatura principalmente em relação às reações líquenóides e líquen plano, onde falam da possibilidade de uma transformação das lesões citadas para uma LVP do tipo líquenóide (Lopes et al., 2015).

A LVP ainda não possui critérios de diagnóstico estabelecido, sendo geralmente feita de forma retrospectiva pela união de achados histopatológicos e clínicos e análise de sua evolução (Hansen et al., 1985; Barnes et al., 2005). Geralmente o diagnóstico é estabelecido tardiamente, comprometendo o prognóstico do paciente e aumentando o risco do desenvolvimento de carcinomas (Batsakis et al., 1999). Devido às dificuldades de diagnóstico e transformação maligna, a busca por possíveis biomarcadores na LVP é essencial, pois ainda não temos qualquer marcador sendo utilizado na prática clínica.

### 2.3. Carcinoma Espinocelular

De acordo com a estimativa do GLOBOCAN 2018 (Bray et al., 2018), um estudo global de incidência, prevalência e mortalidade feito pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, da Organização Mundial da Saúde indica que o câncer de boca está entre as dez neoplasias malignas de maior incidência no mundo, com 354.864 novas neoplasias malignas de lábio e boca diagnosticadas no ano de 2018.

Sendo um grupo de lesões fortemente ligadas a fatores ambientais, têm-se observado que mudanças de hábitos, detecção precoce e tratamento adequado podem prevenir dois terços das mortes causadas por tumores malignos de cavidade oral (Parkin et al., 2002). Dentro desse grupo de neoplasias que podem acometer a cavidade oral, orofaringe e lábios, mais de 90% são CEC, sendo a oitava neoplasia com maior taxa de mortalidade no mundo (Cooper et al., 2009).

Os CECs em geral são neoplasias advindas da camada espinhosa da epiderme, são mais comuns em homens acima dos cinquenta anos e têm como principais fatores etiológicos o tabagismo e o etilismo nos CEC de cavidade oral, e exposição à radiação UV nos CEC de lábio. Ambos apresentam tratamentos e prognósticos diferentes, sendo o de cavidade oral com pior resposta às diferentes modalidades de tratamento (Johnson et al., 2011).

A maioria dos CEC de boca se desenvolve a partir de DOPM, dentre as quais as mais comuns são leucoplasias orais, correspondendo a 80% dos achados clínicos desse grupo. Entre as DOPM com maior potencial de transformação, a leucoplasia verrucosa proliferativa ocupa o segundo lugar com potencial acima de 70% de transformação maligna, com o primeiro sendo ocupado pelas eritroplasias (Huber et al., 2014).

O diagnóstico é feito por meio de biópsia para avaliação histopatológica associada ao exame clínico e de imagem para metástases linfonodais e em outros órgãos. Essa associação de parâmetros indica o estadiamento do tumor e plano de tratamento mais adequado, podendo ser cirúrgico, quimioterápico, radioterápico, imunoterápico ou uma associação entre eles (Johnson et al. 2011; Nishio-Nagai et al., 2017).

Na edição mais atualizada da Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da Organização Mundial da Saúde, de 2017, no capítulo de CEC oral e de lábio,

houveram alterações no estadiamento do CEC que levam em conta critérios como tamanho em centímetros da profundidade de invasão da lesão e que permitem entender melhor o comportamento do tumor e melhores critérios de tratamento.

Apesar de todos os avanços das últimas décadas, a taxa de sobrevida de cinco anos para indivíduos com CEC oral permanece estagnada em 50% para casos com estadiamento avançado e o diagnóstico continua tardio, comprometendo assim as chances de melhor sobrevida (Zini et al., 2010; Rivera C., 2015). Além disso, a elaboração de protocolos rígidos de tratamento muitas vezes expõe o paciente a tratamentos inadequados ou excessivos, com graves efeitos colaterais (Montero et al., 2015). Todos esses fatores associados somente impulsionam a busca de biomarcadores utilizáveis no diagnóstico e prognóstico de CEC.

#### **2.4. Potenciais biomarcadores em LO e LVP**

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), um biomarcador é definido como uma característica específica que é mensurável como um indicador de processos biológicos normais, patogênicos ou respostas a exposição ou intervenção, incluindo intervenções terapêuticas. O biomarcador pode ser molecular, histológico, radiográfico, fisiológico, entre outros.

Dentre os vários tecidos e fluidos humanos que podem ser utilizados para a detecção de lesões orais, é interessante notar que a saliva tem gerado grande interesse por ser de fácil acesso, não causar mal estar ao paciente e estar em contato direto com a lesão (Malamud, 2011). Alguns estudos relacionando potencial de marcador e as leucoplasias foram revisados.

O plasma contém um dos proteômas, conjunto de proteínas, mais estudado do corpo humano, sendo considerado o padrão para exames e biópsias líquidas (Yan et al., 2009). Em um estudo foi feita a busca por genes com mutações somáticas ou genes de HPV em plasma e saliva de pacientes com lesões malignas em vários estágios. Na saliva foram encontrados em 100% dos pacientes com lesões em boca e em 47-70% de pacientes com câncer em outros órgãos, já no plasma os genes com mutações somáticas foram encontrados em 80% de pacientes com câncer de boca e de 86-100% dos pacientes com câncer em outras localizações, demonstrando que a

saliva pode ser tão eficaz quanto o plasma na detecção de lesões na cavidade oral (Wang et al., 2015).

Pesquisas sobre potenciais biomarcadores para LO buscam moléculas ligadas à proliferação e ao controle do ciclo celular. Um estudo mostrou o aumento na expressão de p53 com mutação e perda de expressão de p16, que marca o papillomavírus humano, por meio da imunohistoquímica e indicou como eventos iniciais no processo de malignização, como também a alteração combinada de p53 com mutação/Ki67/p16INK4a também foi associada em leucoplasias orais sem displasia (Nasser et al., 2011).

Pesquisas também vêm sendo realizadas associando o LVP e a capacidade de transformação maligna utilizando diferentes metodologias. Em estudo com biópsias de LVP foi analisada a expressão imunohistoquímica de p53, Ki-67, Mcm-2 e Mcm-5, tais proteínas foram escolhidas por apresentarem aumento de sua expressão em eventos de estresse celular, DOPM, neoplasias malignas em geral e CEC oral, observou-se o aumento da expressão de Mcm-2 e Mcm-5 em LVP (Gouvêa et al., 2010c; Gouvêa et al., 2013).

Em estudo comparando o proteoma da saliva de pacientes controle e com LVP indicou a diminuição de angiotensinogênio (AGT), que pode atuar como marcador etiológico, e dipeptidil peptidase 1 (DPP-1), que já teve sua diminuição associada com a progressão de tumores malignos de pele, como potenciais marcadores para LVP (Flores et al., 2016).

Em estudo feito por Li e colaboradores (2018) foram avaliados os níveis de proteína e mRNA do gene substrato C-quinase rico em alanina, miristoil (*MARCKS*), que gera o substrato da proteína quinase C, em tecido de CEC utilizando as técnicas de western blotting e RT-qPCR e descobriram que o aumento na sua expressão está ligado a perda de adesão e aumento de motilidade e tem um papel importante no aumento do risco de metástase linfonodal, associado a um pior prognóstico.

A comparação de linhagens celulares de CEC e queratinócitos normais, por meio de eletroforese bidimensional e proteômica foi possível verificar a diminuição na atividade da proteína precursora alfa-1-microglobulina/bikunina (AMBP) em CEC, sendo ela relacionada com invasão e migração. Além disso, foi evidenciado que os tecidos com menor atividade de AMBP apresentaram associação significativa com um

alto potencial metastático para linfonodos cervicais e diminuição da sobrevida global (Sekikawa et al., 2018). A tabela apresenta as proteínas citadas em LO e LVP.

**Tabela 1** – Proteínas reportadas\* com potencial para se tornarem marcadores de progressão maligna.

<b>Lesão</b>	<b>Potenciais marcadores de progressão maligna</b>
LO	p53 com mutação, combinação de p53 com mutação/Ki67/p16INK4a, CD8+, CD163+, CK10
LVP	Mcm-2, Mcm-5, AGT, DPP-1, MARCKS, AMBP

\*referências descritas no texto.

## 2.5. Proteômica e espectrometria de massas

A proteômica teve seu primeiro uso em 1994 pelo pós-doutor Marc Wilkins. Na época ele se referia a esse termo como o panorama de proteínas expressas em células em um determinado momento. Atualmente, o termo engloba o estudo da identificação, quantificação, estudo de função, estrutura, modificações pós-traducionais, relações entre grupos de proteínas e com o sistema biológico, englobando também as técnicas utilizadas para a caracterização de proteínas, como espectrometria de massas e eletroforese bidimensional em gel, e tem sido uma ferramenta de uso crescente na descoberta e validação de potenciais biomarcadores (Gillete & Carr, 2013).

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica utilizada para identificar e quantificar as moléculas por meio do espectrômetro de massas. Um espectrômetro de massas consiste de uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector de íons. O espectrômetro de massas mede os íons em fase gasosa baseando-se na razão entre a massa e carga das moléculas.

As principais estratégias utilizadas atualmente na busca de biomarcadores são divididas entre a proteômica baseada em descoberta, onde não se tem um conhecimento prévio das proteínas de interesse e a proteômica baseada em alvos, onde já se tem proteínas pré-selecionadas para análise (Gillete & Carr, 2013).

Estudos recentes têm combinado ambas as fases, de descoberta e de alvos, na busca e verificação de proteínas em misturas complexas em tecido e vários fluidos corporais como saliva, plasma sanguíneo, lágrimas e urina. Estudo recente do nosso

grupo (Carnielli e colaboradores, 2018) analisaram por meio de proteômica baseada em descoberta sem técnica de marcação, conhecido como *Label-free*, as ilhas neoplásicas e o estroma do fronte invasivo e do interior de CECs orais na busca de proteínas diferencialmente expressas. Proteínas selecionadas foram marcadas com imunohistoquímica para verificação de expressão e integração com parâmetros clinicopatológicos. Em paralelo, foi realizada a proteômica baseada em alvos em saliva de pacientes com CEC de boca sendo divididos em pacientes com metástase linfonodal e sem metástase linfonodal, para a verificação das proteínas selecionadas. Os resultados indicaram a diminuição na abundância de algumas proteínas (COL6A1, CSTB, NDRG1, LTA4H, ITGAV, PGK1 e MB) e associação com metástase linfonodal e pior prognóstico.

Além das técnicas sem marcação de proteínas ou peptídeos, as misturas complexas de proteínas e peptídeos podem ser avaliadas utilizando marcação. Para isso, pode ser feita a marcação seletiva de grupos funcionais de proteína ou peptídeos. Dentre os métodos, nesse estudo foi utilizado marcação por meio de reagentes isóbaros amino-reativos, com o nome comercial de TMT10plex™ (Thermo Fisher Scientific), com o qual é possível fazer a marcação de até dez amostras derivadas de células, tecidos ou fluidos biológicos (Thompson et al., 2003).

O TMT10plex™ é um reagente com 10 compostos isóbaros, isto é, que contém a mesma massa e estrutura química porém que apresentam íons com marcações químicas em diferentes regiões da estrutura, variando em marcações no C13 e N15, esses compostos amino reativos diferentes permitem a marcação de peptídeos de até 10 amostras diferentes, sua estrutura é composta de um agrupamento amino reativo, um braço de ligação e uma região de íon repórter de massa (Thompson et al., 2003).

O íon repórter indica a intensidade da razão entre massa e carga nos C13 e N15 com íons marcados, essa variação ocorre no intervalo de 126 até 131 em um mesmo espectro, o que permite a identificação e quantificação de cada peptídeo entre várias amostras. O reagente utilizado é composto do TMT-126, TMT-127N, TMT-127C, TMT-128N, TMT-128C, TMT-129N, TMT-129C, TMT-130N, TMT-130C e TMT-131 (Shen et al., 2018).

### **3. Proposição**

Considerando a literatura descrita, em resumo, o diagnóstico diferencial entre algumas lesões benignas, malignas ou inflamatórias se baseia na junção de critérios clínicos e histológicos. Entretanto, além de ter certa subjetividade, o aparecimento de uma lesão clínica suspeita muitas vezes já ocorre em estágios intermediários ou avançados, dificultando o tratamento. Os estudos moleculares podem fornecer biomarcadores capazes de prever o diagnóstico, combinado com as informações clínicas e histológicas. Entretanto, pouco se conhece sobre de marcadores validados que indiquem o potencial de malignização de lesões. Assim, a proposta desse estudo foi a busca por biomarcadores que indiquem a evolução de LO ou LVP para CEC é um estudo inédito e pode auxiliar a prever o diagnóstico e, com isso, melhorar o prognóstico dos pacientes acometidos com a doença.

#### **3.1. Objetivo**

O objetivo desse estudo foi comparar o perfil proteômico da saliva de pacientes controle sem lesão, e de pacientes diagnosticados com LVP, LO e CEC na busca por proteínas associadas ao potencial de transformação maligna da lesão.

## **4. Material e métodos**

### **4.1. Comitê de ética**

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, com o número do Parecer: 2.453.631 (ANEXO 1), e Plataforma Brasil, CAAE: 74725417.1.0000.5418. As etapas e experimentos realizados seguiram as normas referentes a este comitê de ética no que diz respeito ao estudo com seres humanos.

### **4.2. Coleta de saliva**

As coletas foram realizadas no Centro de Diagnóstico e Tratamento de Lesões Bucais (OROCENTRO) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. As coletas foram feitas preferencialmente pela manhã. O paciente passava por um intervalo mínimo de uma hora sem ingerir alimentos ou líquidos, enxaguava a boca com água e eram coletados aproximadamente 5 mL de saliva não estimulada em tubos plásticos estéreis de 12 mL. Um total de 58 pacientes participaram do estudo, sendo 16 pacientes com LO, 13 com LVP, 14 com CEC e 15 pacientes saudáveis (controle, CO), sem lesões ou com lesões como mucocele e hiperplasia fibrosa foram coletados, em relação aos pacientes dos grupos LO, LVP e CO, os mesmos já haviam passado por biópsias para diagnóstico e estavam em acompanhamento no OROCENTRO, dessa forma as lesões presentes em boca eram consideradas brandas. As amostras foram coletadas, identificadas e imediatamente armazenadas em freezer – 80° C, sendo posteriormente transportadas em compartimento com gelo seco para o Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, Campinas, para processamento.

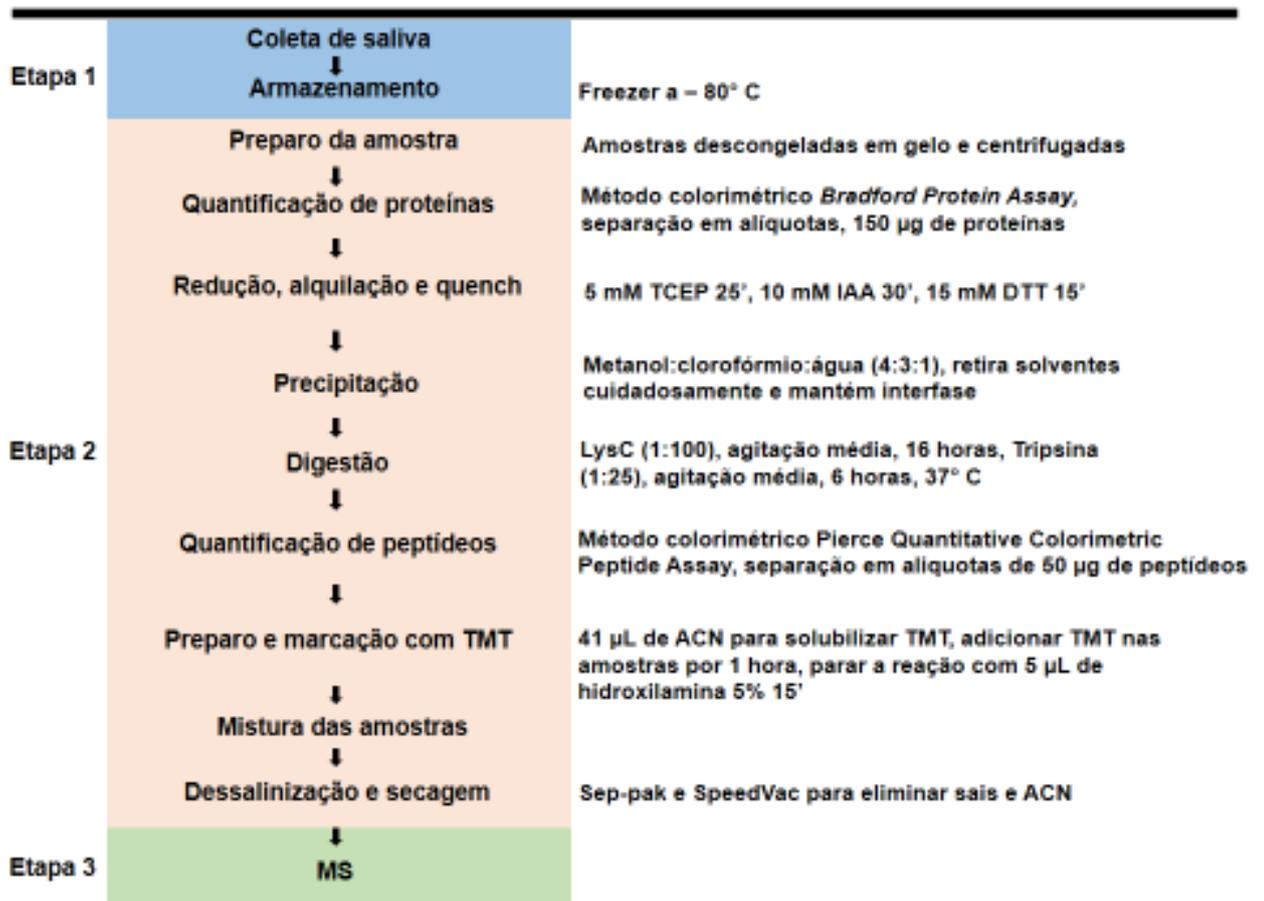
### **4.3. Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes**

Critérios de inclusão: 1) Pacientes de ambos os gêneros com LO, LVP e CEC com lesões presentes na boca no momento da coleta; e 2) pacientes com mucocele ou hiperplasia fibrosa, sem necessariamente estar com as lesões presentes na boca no momento da coleta (grupo controle saudável).

Crítérios de exclusão: 1) pacientes com doenças auto-imunes, diabetes, metástases ou tumores que não são CEC oral; 2) pacientes que já tenham passado por quimioterapia ou radioterapia e 3) pacientes do grupo controle saudável com menos de 45 anos.

#### 4.4. Preparo da amostra

A coleta e o preparo das amostras para análise por espectrometria de massas foram descritos resumidamente na Figura 1 e detalhados nas sessões abaixo.



**Figura 1** – Resumo do protocolo utilizado para coleta, preparo, digestão, marcação com TMT e análise em espectrometria de massas.

#### 4.5. Quantificação e separação de amostras

As amostras foram descongeladas em gelo, centrifugadas a 1500 g por 5 minutos e a quantificação proteica foi feita pelo método colorimétrico *Bradford Protein*

Assay (Sigma-Aldrich). Após a quantificação, um volume correspondente a 150 µg de proteínas foi alíquotado de cada amostra. As amostras foram colocadas em tubos marcados de acordo com cada patologia (Tabela 1, ANEXO 2).

#### **4.6. Extração das proteínas da saliva para digestão**

Às amostras, foi adicionada ureia em concentração final de 6 M de tampão ureia 8M em 50 mM de ácido N-2-hidroxietil piperazina-N-3-propano-sulfônico (EPPS, pH 8,5), posteriormente sendo submetidas ao ultrassom por 10 minutos (Quimis Aparelhos Científicos). A redução das pontes de dissulfeto das proteínas foi feita com 5 mM de Tris carboxietil fosfina hidroxicloreto (TCEP) por 25 minutos, a alquilação das cisteínas livres foi feita com 10 mM de Iodoacetamida (IAA) por 30 minutos no escuro e a interrupção da reação foi feita com 15 mM de ditioneitol (DTT) por 15 minutos também no escuro, em temperatura ambiente.

#### **4.7. Precipitação das proteínas**

Devido ao fato de o TMT ser sensível a soluções que contém amina, foi adicionada a etapa de precipitação para retirada de qualquer material que pudesse interferir na marcação das amostras. Às amostras foram adicionadas solução de metanol:clorofórmio:água (4:3:1). As amostras foram centrifugadas em ultracentrífuga (Beckman Coulter) a 20.000 g por 8 minutos a 22° C. As proteínas desnaturadas formam uma interfase branca na interfase das soluções, sendo retiradas cuidadosamente de forma a não perturbar a interfase formada. Ao tubo, juntamente com a interfase formada foi adicionado 1 volume de metanol, centrifugado novamente a 20.000 g por 8 minutos e 15.000 rpm por 2 minutos, a interfase se tornou mais visível no fundo do tubo, o máximo de volume possível de metanol foi retirado cuidadosamente e a secagem do restante de metanol foi feita com o tubo aberto para evaporação. O precipitado foi então ressuspensionado em 10 µL de tampão ureia a 8 M diluída em 200 mM EPPS com pH 8,5.

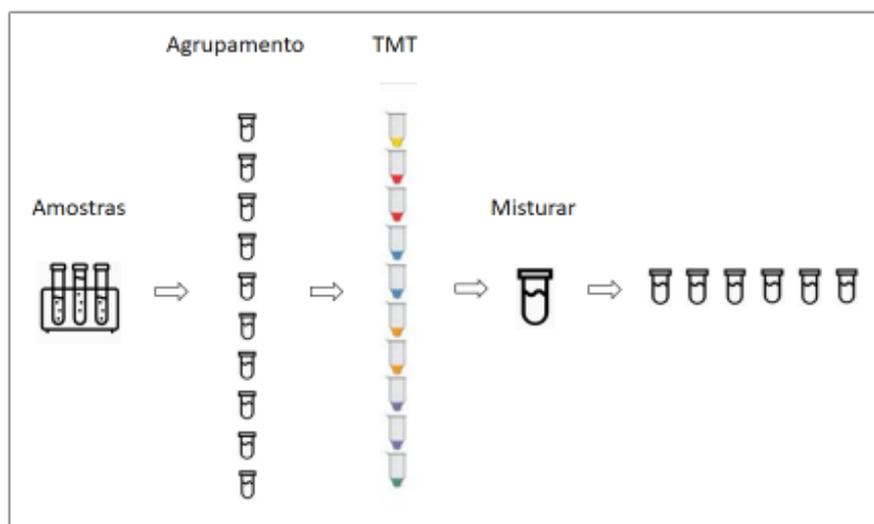
#### 4.8. Digestão das proteínas

A digestão foi feita com LysC (Promega) na proporção enzima:substrato de 1:100 diluída em 50 mM EPPS e permaneceu em agitação média por 16 horas. Em seguida, foi adicionada tripsina (Promega) na proporção enzima:substrato de 1:25, diluída em 50 mM de EPPS e incubada por 6 horas a 37° C em agitação de 300 rpm. A quantidade de peptídeos foi então medida por meio do teste colorimétrico para medição de peptídeos *Thermo Scientific Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay* (Thermo Fisher Scientific) e assim, 50 µg de peptídeos foram aliqotados para marcação com TMT.

#### 4.9. Marcação com TMT

Para as 58 amostras foi utilizado um kit com o TMT10plex™ Isobaric Label Reagent Set 0.8 mg (Thermo Fisher Scientific). Para o preparo do TMT foi adicionado 41 µL de acetonitrila anidro a cada um dos 10 tubos contendo os diferentes marcadores isóbaros, com agitação leve por dez minutos.

Então as amostras contendo os 50 µg de proteínas foram centrifugadas rapidamente, o volume foi equalizado em 100 µL com 200 mM EPPS a pH 8,5. As 58 amostras foram então separadas em 6 grupos para a marcação com o TMT (Figura 2), além disso duas amostras (N10 e L16) foram duplicadas na mistura 6 para controle interno de quantificação, totalizando 60 amostras marcadas (Tabela 2).



**Figura 2** – Delineamento da marcação por TMT, inicialmente as 58 amostras foram separadas em 6 grupos de 10. Em cada grupo foi feita a marcação com TMT e, após o final da reação, foi feita a mistura de todos em um único tubo. No tubo da mistura 6 foram repetidas as amostras N10 e L16 para controle interno e para todas as misturas ficarem com o mesmo número de amostras.

**Tabela 2** – Organização das amostras marcadas com TMT.

Mistura 1	Mistura 2	Mistura 3	Mistura 4	Mistura 5	Mistura 6
N03	E06	N08	L20	N13	L16
O03	L09	O08	E11	E16	O18
L04	O06	N11	L22	N16	L19
E04	L07	O11	E14	O16	E19
N04	E07	N09	N21	L17	N18
O04	L10	O09	E12	O14	E17
N07	E10	N12	L15	N17	L21
E05	L08	O12	O17	E20	O19
N23	E08	N10	L18	N20	O20
O05	L16	O10	E13	O15	N10

- As amostras foram randomizadas para permitir mais de um grupo em cada mistura.

Após a separação, as amostras foram incubadas com o TMT por uma hora em temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 5  $\mu\text{L}$  de hidroxilamina 5% por 15 minutos. Após essa etapa foi feita a mistura de todas as amostras e 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra marcada foram colocadas em um único tubo e a acetonitrila adicionada anteriormente evaporada em SpeedVac (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de solução de ácido fórmico 100% para que o pH ficasse próximo de 2. Cada uma das misturas foi dessalinizada utilizando Sep-Pak 50 mg (Waters) e os solventes foram evaporados em SpeedVac (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.10. Análise por espectrometria de massas

As amostras foram analisadas no *Biomolecular Research Facility* na Universidade de Virginia. As amostras foram ressuspendidas em 200  $\mu\text{L}$  de solução de ácido fórmico a 0,1% dos quais foi injetado 1  $\mu\text{L}$  contendo 1  $\mu\text{g}$  de peptídeos para análises por espectrometria de massa no equipamento Q Exactive<sup>TM</sup> HF-X Hybrid Quadrupole-

Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific) conectado ao sistema de cromatografia líquida EASY-nLC (Thermo Fisher Scientific) através da fonte de nanoeletrospray, em um fluxo de 300 nL/min durante 121 minutos. O gradiente de concentração de acetonitrila de 0 a 95 minutos foi de 2% a 30%, de 95 minutos a 115 minutos foi de 30% a 60%, de 115 a 116 minutos foi de 60% a 95%, e de 116 a 121 minutos, o gradiente permaneceu constante em 95%.

Para a aquisição do precursor, a resolução foi definida em  $r = 120.000$ , *AGC target* de  $1e6$  e IT de 60 ms, sendo a variação de massa de  $m/z$  300 a 2000. Os 15 peptídeos mais intensos foram selecionados para fragmentação em resolução foi de  $r = 45.000$ , *AGC target*  $5e5$ , IT de 87 ms, a janela de isolamento foi definida em  $m/z$  1,2, a faixa de detecção foi de  $m/z$  200 a 2.000, a primeira massa foi fixada no valor de  $m/z$  120 e a exclusão dinâmica foi de 30 s. Todos os dados foram adquiridos em modo *profile*.

#### 4.11. Análise dos dados e estatística

Os espectros obtidos das análises por espectrometria de massas foram submetidos a análise no programa Proteome Discoverer™ utilizando o algoritmo do Sequest (Thermo Fisher Scientific; versão IseNode em Proteome Discoverer 2.2.0.388) em banco de dados do *Human* UniProt (atualizado em 5 de fevereiro de 2018) com 93.273 sequências de proteínas.

A tolerância de massas foi definida de 10 ppm para íons precursores e 0,02 Da para fragmentos. A modificação fixa foi carbamidometilação de cisteínas e, para que o uso do TMT fosse incluído nos parâmetros no programa, o TMTplex também foi considerado uma modificação fixa. As modificações variáveis foram a oxidação da metionina e a acetilação da porção N-terminal do peptídeo. A identificação de peptídeos foi aceita quando atingido mais de 60% de probabilidade de comparação no algoritmo interno de taxas de falso-positivos (*False discovery rate*, FDR) e uma taxa máxima de FDR de 0,2%. Já as proteínas precisavam atingir um nível acima de 95% de probabilidade e conter pelo menos 1 peptídeo identificado, com FDR menor de 1,8%.

A análise subsequente dos dados foi realizada no programa Perseus versão 1.6.2.3, disponível no pacote do MaxQuant (Cox & Mann, 2008) utilizando a

intensidade corrigida do íon repórter transformada em log2 obtida no programa Scaffold. Proteínas identificadas pelo banco reverso ou com menos de 3 valores válidos por grupo foram excluídas da análise. A análise estatística entre os grupos CO, LO, LVP e CEC foi realizada utilizando o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ) e pós-teste *Tukey's honestly significant difference* (THSD) com valor de  $p$  ajustado pelo teste Benjamini & Hochberg para comparação entre dois grupos.

Para a avaliação das proteínas exclusivas e compartilhadas entre as lesões foi utilizada a ferramenta do InteractiVenn (Herbele et al., 2015). Para a análise de enriquecimento da lista de proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos foi utilizada a ferramenta Enrichr (Chen et al., 2013; Kuleshov et al., 2016). A construção das figuras de agrupamento hierárquico dos casos, bem como *volcano plots*, foi realizada no programa R Studio versão 1.1.463. Os gráficos de dispersão foram obtidos para cada proteína diferencialmente abundante com o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

A análise da associação de transcritos com sobrevida foi realizada para genes cujas proteínas estavam diferencialmente abundantes utilizando a ferramenta PROGgeneV2. A sobrevida foi calculada utilizando as seguintes informações de (i) sobrevida livre de metástase do banco E-MTAB-1328, o qual contém dados de mRNA de 89 pacientes com câncer de cabeça e pescoço; (ii) da sobrevida global dos bancos TCGA e GSE65858, os quais contêm dados de mRNA de 291 e 290 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, respectivamente; (iii) da sobrevida livre de recorrência dos bancos GSE10300 e GSE27020, os quais contêm dados de mRNA de 43 e 108 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, respectivamente.

## 5. Resultados

### 5.1. Dados clínicos dos pacientes

Dentre os 15 pacientes do grupo CO, 14 apresentavam hiperplasia fibrosa (93,33%) e 1 não apresentava qualquer tipo de lesão. Seis pacientes do grupo CEC apresentavam estadiamento de tamanho de tumor e presença de metástase linfonodal, sendo um paciente com estadiamento T2/N2b, dois com estadiamento T4/N1, um com estadiamento T2/N0/M0, um com estadiamento T3/N2b e um com estadiamento T3N0. Os dados epidemiológicos dos grupos, número de pacientes, gênero, faixa etária dos pacientes, média de idades entre outras estão descritos na tabela 3.

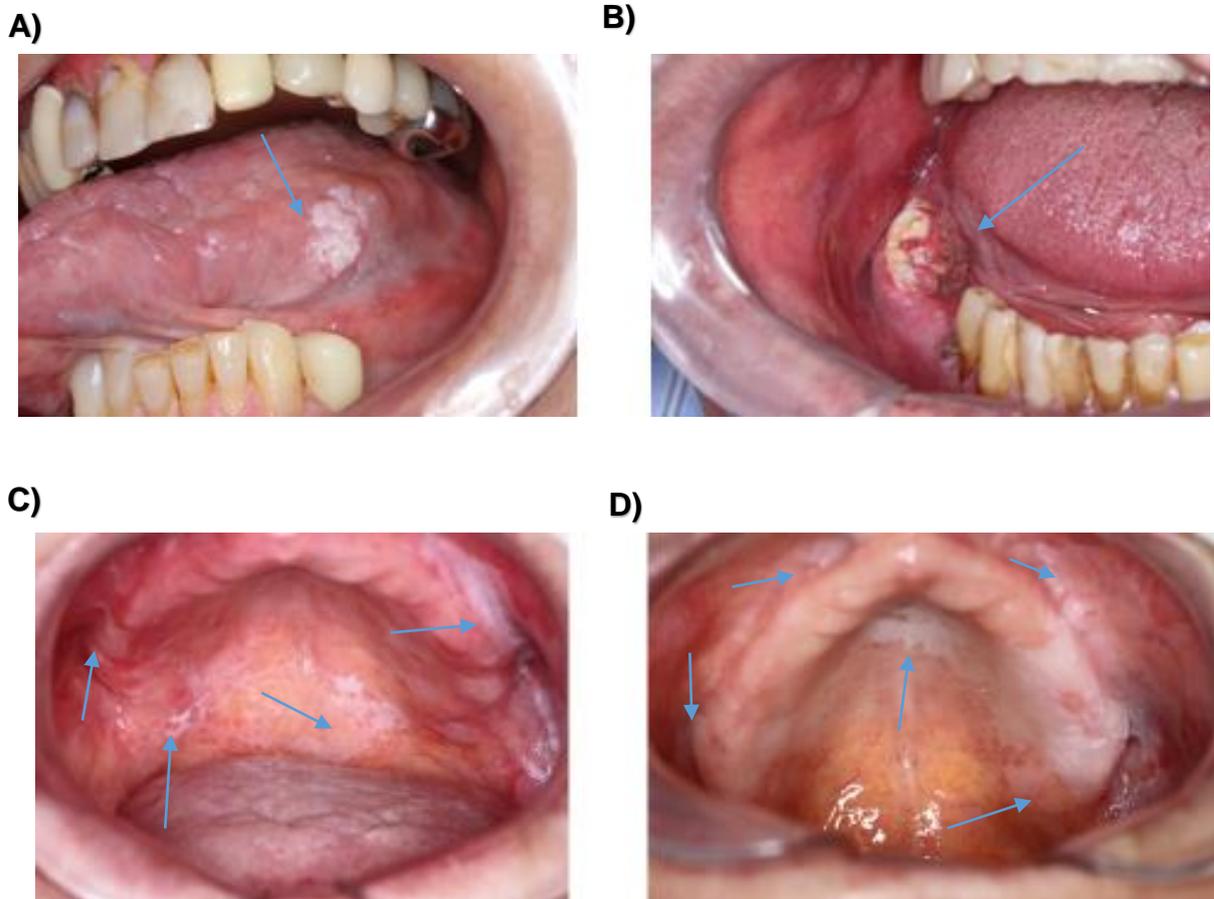
**Tabela 3** – Epidemiologia dos pacientes envolvidos no estudo de acordo com divisão em grupos.

<b>Grupo</b>	<b>CO</b>	<b>LO</b>	<b>LVP</b>	<b>CEC</b>
<b>Número de pacientes</b>	15	16	13	14
<b>Gênero</b>	9 mulheres (60%)/6 homens	11 mulheres (68,75%)/ 5 homens	11 mulheres (84,61%)/ 2 homens	9 homens (64,28%)/ 5 mulheres
<b>Faixa de idade</b>	53-73 anos	54-75 anos	55-77 anos	43-87 anos
<b>Tabagismo</b>	9 (60 %)	12 (75%)	0	8 (57,14%)
<b>Etilismo</b>	8 (53,33%)	4 (25%)	2 (15,69%)	10 (71,42%)
<b>Variação de tempo de acompanhamento</b>	1-4 anos	2-13 anos	1-25 anos	1-6 anos
<b>Média de tempo de acompanhamento*</b>	2 anos	5 anos	6,57 anos	2 anos

\*Pacientes com lesões benignas são acompanhados até a remoção e cicatrização e pacientes com DOPM e lesões malignas têm acompanhamento clínico a longo prazo.

Na figura 3 observa-se o padrão clínico de uma LO localizada em região de borda lateral de língua (Figura 3A) e um CEC infiltrativo tomando a região de rebordo alveolar até a mucosa jugal (Figura 3B), além do crescimento proliferativo da LVP (Figura 3C e 3D), inicialmente presente na região de palato mole e fundo de vestíbulo posterior bilateralmente, após o período de dois anos as placas brancas invadiram a

região de palato duro, fundo de vestibulo anterior, além de rebordo alveolar posterior esquerdo.

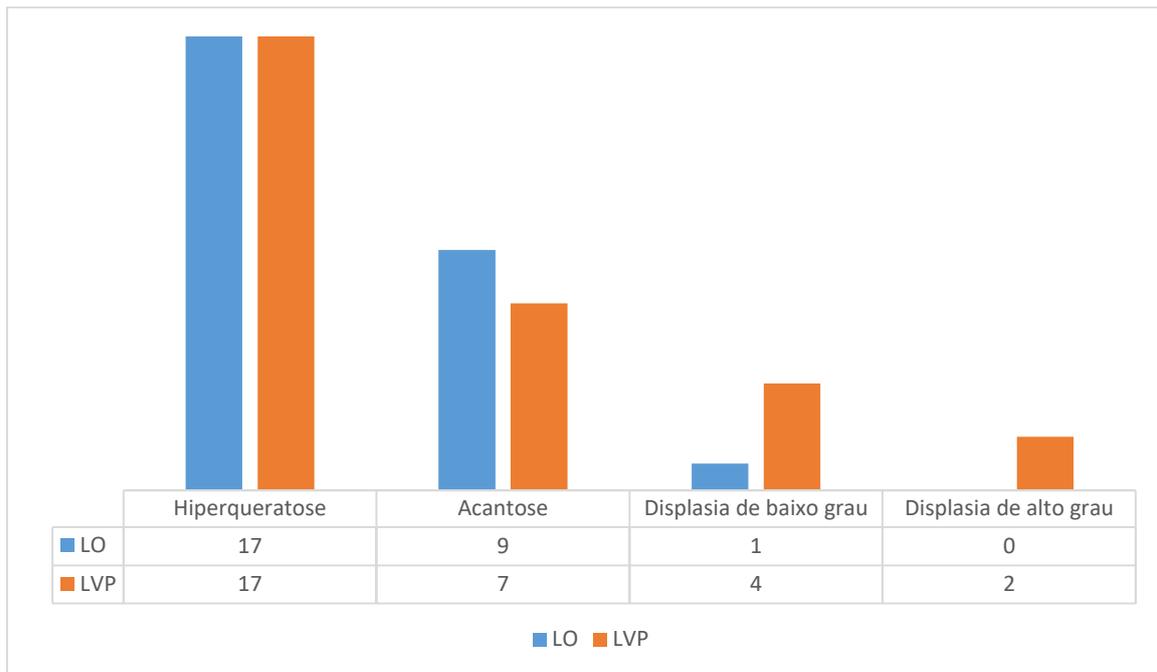


**Figura 3** – Imagens representativas do A) padrão clínico de uma LO, apontado por uma seta azul e de um B) CEC oral, apontado por uma seta azul. Fotos demonstram o padrão de crescimento da LVP, sendo C) a foto inicial e D) o mesmo paciente num curso clínico de 2 anos, com setas azuis demonstrando os locais afetados pela lesão com o passar dos anos. Imagens cedidas pelo Prof. Márcio Ajudarte Lopes, no Centro de Diagnóstico e Tratamento de Lesões Bucais (Orocentro), da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP – UNICAMP).

## 5.2. Dados histopatológicos dos pacientes

Os laudos e lâminas dos pacientes foram analisados para coleta dos dados histopatológicos com as principais alterações celulares e locais de ocorrência das lesões. Os 14 pacientes com hiperplasia fibrosa do grupo CO apresentavam tecido conjuntivo denso com infiltrado inflamatório discreto, sendo majoritariamente localizados no rebordo alveolar superior.

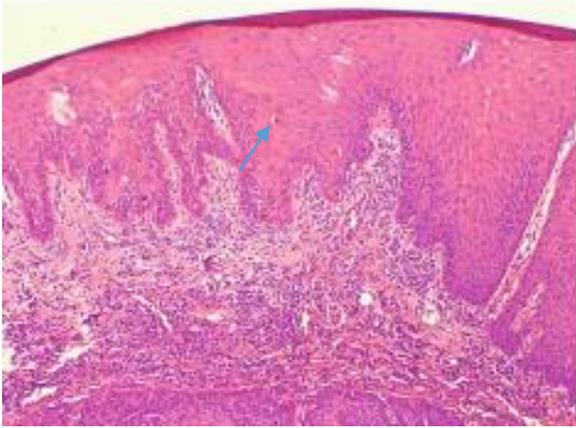
As principais alterações histopatológicas encontradas foram hiperqueratose, acantose, displasia leve e displasia moderada (Figura 4). Os pacientes com CEC não foram incluídos na figura, e apresentavam presença de pleomorfismo celular, mitoses atípicas, hiper cromatismo nuclear entre outras alterações (Figura 5).



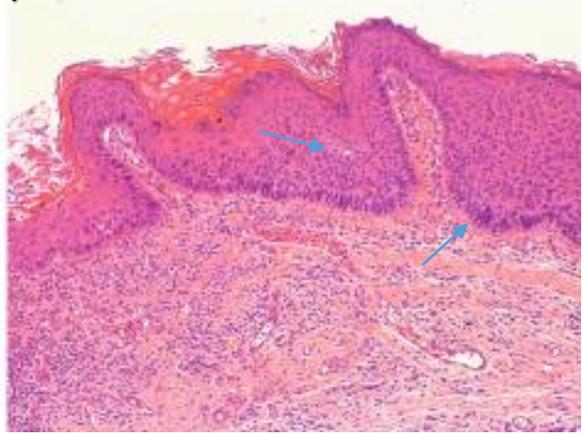
**Figura 4** – Distribuição das principais alterações histopatológicas presentes nos grupos de pacientes com LO e LVP.

Ao comparar lâminas histopatológicas de pacientes com LO e após progredir para CEC na região, o tumor apresentou em média um perfil com maior diferenciação, presença de pérolas de queratina e invaginação discreta para o tecido conjuntivo (Figura 5A). O CEC oral derivado de pacientes com LVP apresentou um perfil mais agressivo, com menor diferenciação, maior invasão tecidual, ilhas neoplásicas em tecido conjuntivo e maior número de atipias celulares (Figura 5B).

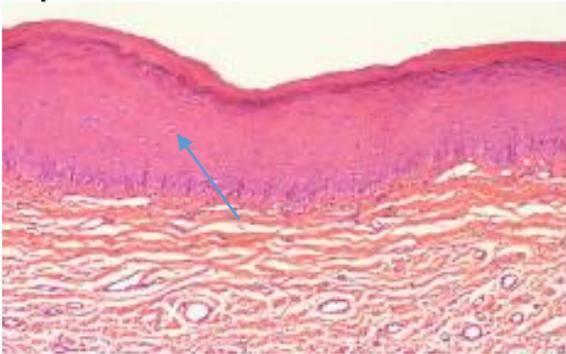
A)  
1)



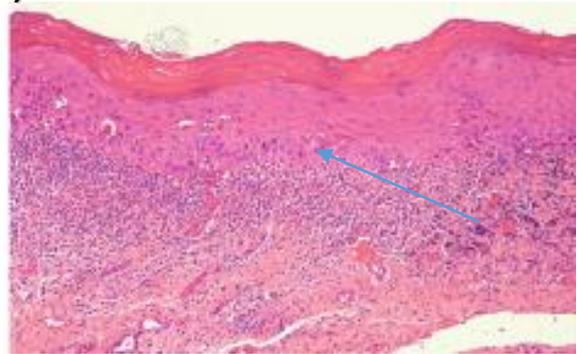
2)



3)

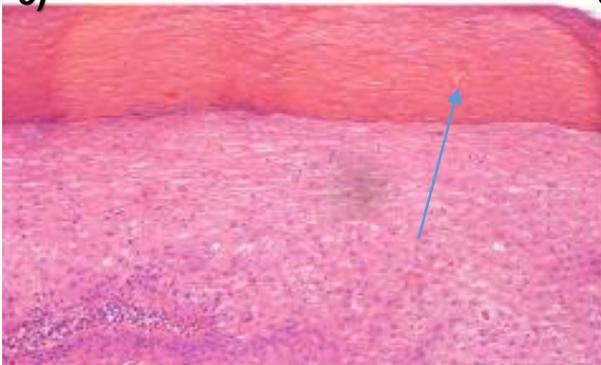


4)

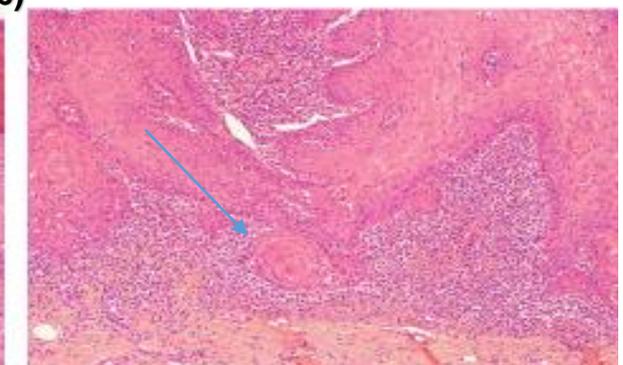


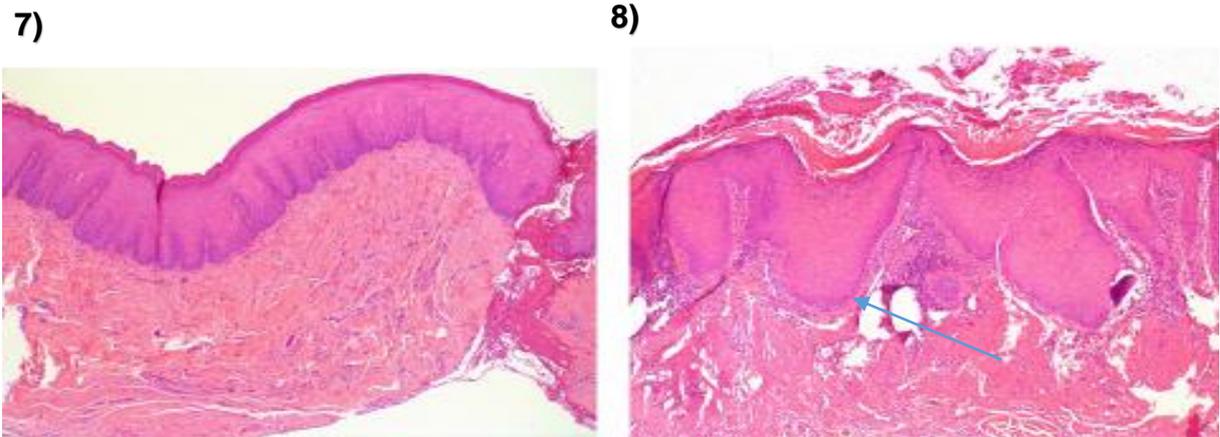
B)

5)



6)





**Figura 5** – Lâminas histopatológicas coradas com hematoxilina e eosina permitindo a comparação de A) 1) LO e seu desenvolvimento em 2) CEC após dez meses e 3) LO e seu desenvolvimento em 4) CEC após um ano respectivamente e B) 5) LVP e seu desenvolvimento em 6) CEC após 1 e 7) LVP e seu desenvolvimento em 8) CEC após 3 anos, respectivamente. As setas apontam alterações morfológicas, sendo respectivamente a presença de: acantose (1, 2, 3 e 5), displasia (2 e 4) e invasão tecidual (8), atipias associadas ao processo de transformação maligna (aumento de 10x). Imagens cedidas pelo Prof. Márcio Ajudarte Lopes, no Centro de Diagnóstico e Tratamento de Lesões Bucais (Orocentro), da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP – UNICAMP).

Em relação à localização das lesões, nos pacientes com LVP, os locais com maior incidência foram na mucosa jugal, rebordo gengival posterior e borda lateral de língua, todos bilateralmente, também havendo lesões em região de palato posterior e borda lateral direita de língua. Nos pacientes com LO, houve uma maior variedade de locais afetados isoladamente, sendo importante levar em consideração que a área total afetada foi menor. As principais áreas afetadas foram rebordo alveolar superior posterior e borda lateral de língua, seguidos por assoalho bucal, região posterior de fundo de vestibulo inferior e pilar amigdaliano. No grupo de pacientes com CEC, 10 (58,82%) lesões localizavam em borda lateral de língua, as outras em região de assoalho bucal e fundo de vestibulo posterior.

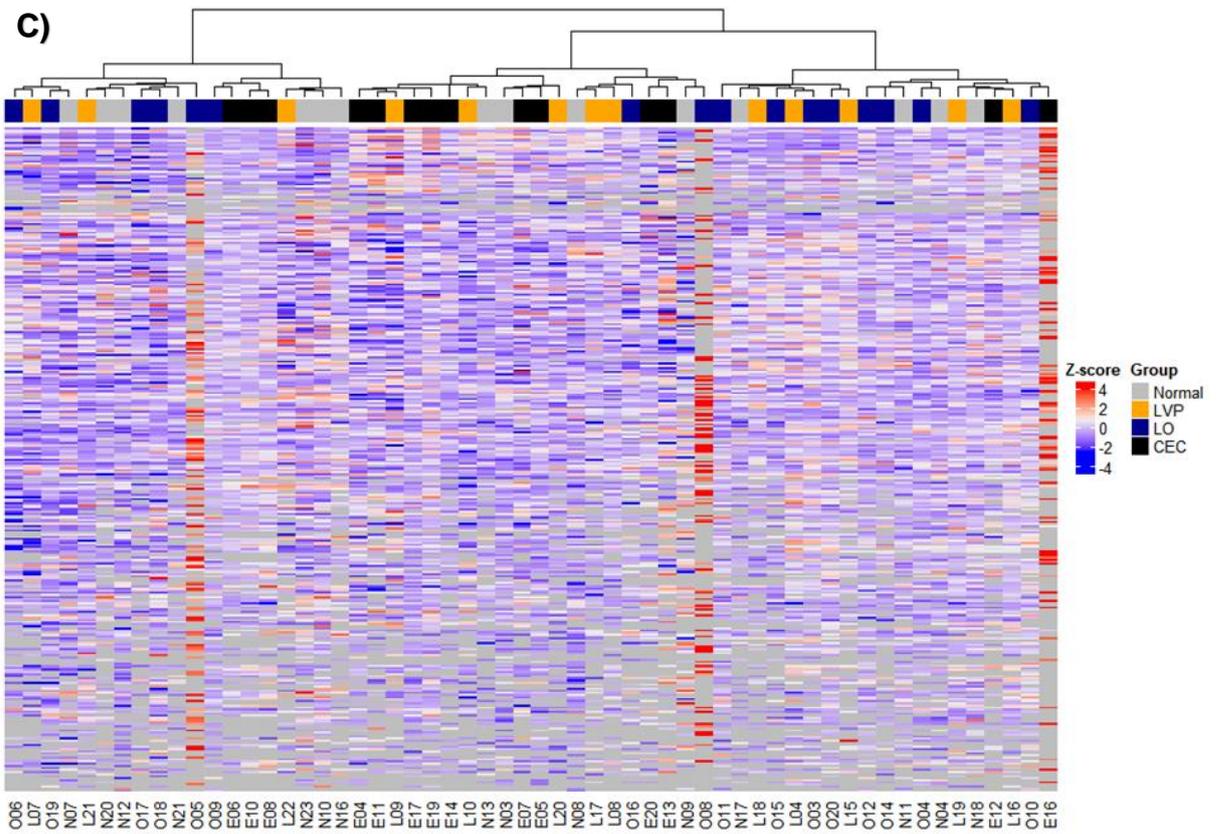
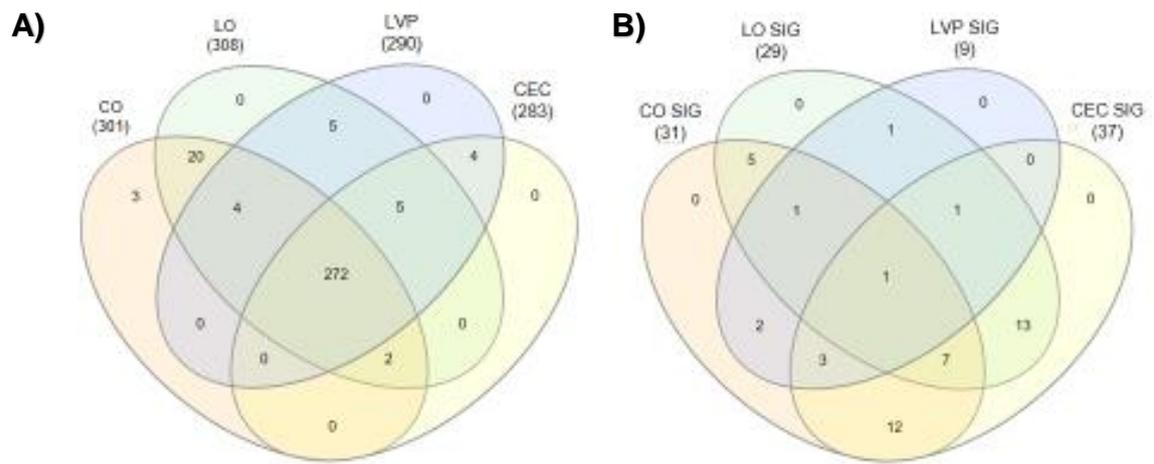
### 5.3. Proteínas totais e estatisticamente significantes

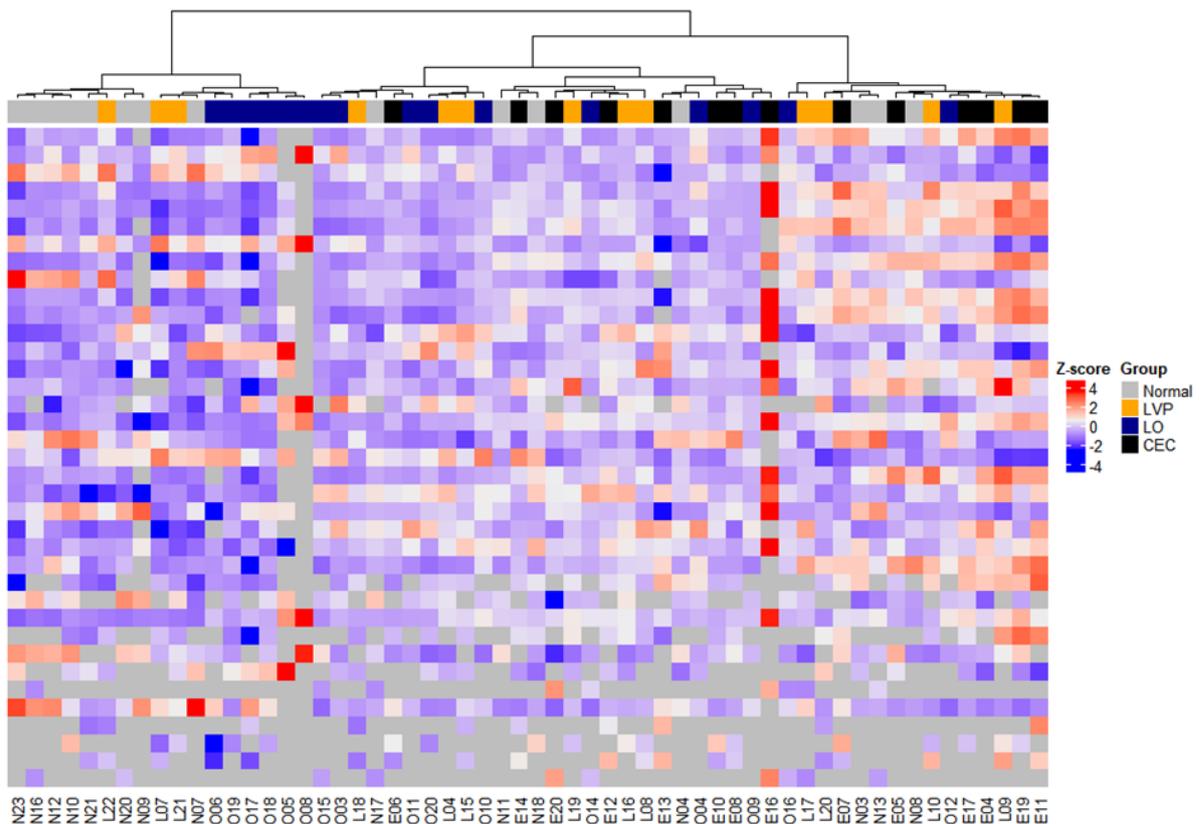
Os dados provenientes da análise de proteínas na saliva resultaram em um total de 501 proteínas identificadas para as 58 amostras analisadas (n=15 CO, 16 LO, 13 LVP e 14 CEC). Após a filtragem de no mínimo 3 valores válidos por proteína, por grupo, o número final de proteínas totais foi de 319.

As proteínas foram submetidas ao agrupamento hierárquico e não foi observada separação em grupos de acordo com a classificação das lesões (Figura 6C). Para visualização das proteínas exclusivas e compartilhadas entre os grupos, foi construído um diagrama de Venn incluindo todas as 319 proteínas identificadas, sendo 308 proteínas em LO, 301 no CO, 290 na LVP e 283 em CEC (Figura 2B). As proteínas comuns entre todos os grupos somaram um total de 272, sendo que nenhuma foi exclusiva de LO, LVP ou CEC.

Três proteínas foram exclusivas do grupo controle, sendo elas Olfatomedina-4 (*OLFM4*), Imunoglobulina kappa variável 1-6 (*IGKV1-6*) e Proteína 16 do domínio de zinco e BTB (*ZBTB16*). 5 proteínas estavam presentes nas três lesões, porém não no grupo controle, sendo elas o Fator inibidor de migração de macrófago (MIF), Queratina, tipo II citoesquelético 78 (*KRT78*), Filamina-A (*FLNA*), Proteína AHNAK associada à diferenciação de neuroblastos (AHNAK) e Proteína dissulfeto-isomerase A3 (*PDIA3*). 4 proteínas foram exclusivas entre LVP e CEC, sendo elas Alfa-2-antiplasmina (*SERPINF2*), Apolipoproteína A-IV (*APOA4*), Componente do complemento C9 (*C9*) e Inibidor H1 de cadeia pesada Inter-alfa-tripsina (*ITIH1*).

A análise estatística feita por meio de Análise de Variância (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ) revelou que, das 319 proteínas identificadas, 37 apresentaram diferenças estatisticamente significantes de abundância entre os 4 grupos correlacionando as lesões. Foi feito um novo diagrama de Venn para visualizar as proteínas estatisticamente significantes. Foi observada uma proteína comum entre todos os grupos, 15 compartilhadas entre os grupos com lesão e ausentes no grupo controle, 8 presentes nos grupos com desordens potencialmente malignas e grupo controle e ausentes em CEC e uma comum somente entre as desordens potencialmente malignas (Figura 6B).





**Figura 6** – A) Diagrama de Venn apresenta todas as proteínas exclusivas e compartilhadas entre os quatro grupos em análise. B) Diagrama de Venn mostra as proteínas estatisticamente significantes, Controle SIG = proteínas diferencialmente expressas no grupo controle, LO SIG = proteínas diferencialmente expressas no grupo LO, LVP SIG = proteínas diferencialmente expressas no grupo LVP, CEC SIG = proteínas diferencialmente expressas no grupo CEC. C) Agrupamento hierárquico por *heatmaps* demonstra o padrão de agrupamento das proteínas identificadas nas amostras de saliva, o primeiro *heatmap* levando em consideração as proteínas identificadas em todos os pacientes e o segundo *heatmap* somente com as proteínas estatisticamente significantes após análise de variância (ANOVA), é possível observar que não ocorre um agrupamento de proteínas em nenhum dos grupos de lesões analisadas. O *heatmap* foi construído utilizando correlação de Pearson e método Ward.

Foi analisada a intensidade das proteínas estatisticamente significantes entre dois grupos por meio do *fold-change* (FC), medido a partir da subtração das medianas do valor de intensidade corrigida transformada em  $\log_2$ , a mediana foi utilizada por ser a melhor forma de agrupar dados que apresentam uma grande variação em um grupo. Não houve diferença estatística de abundância entre os grupos LVP e CEC.

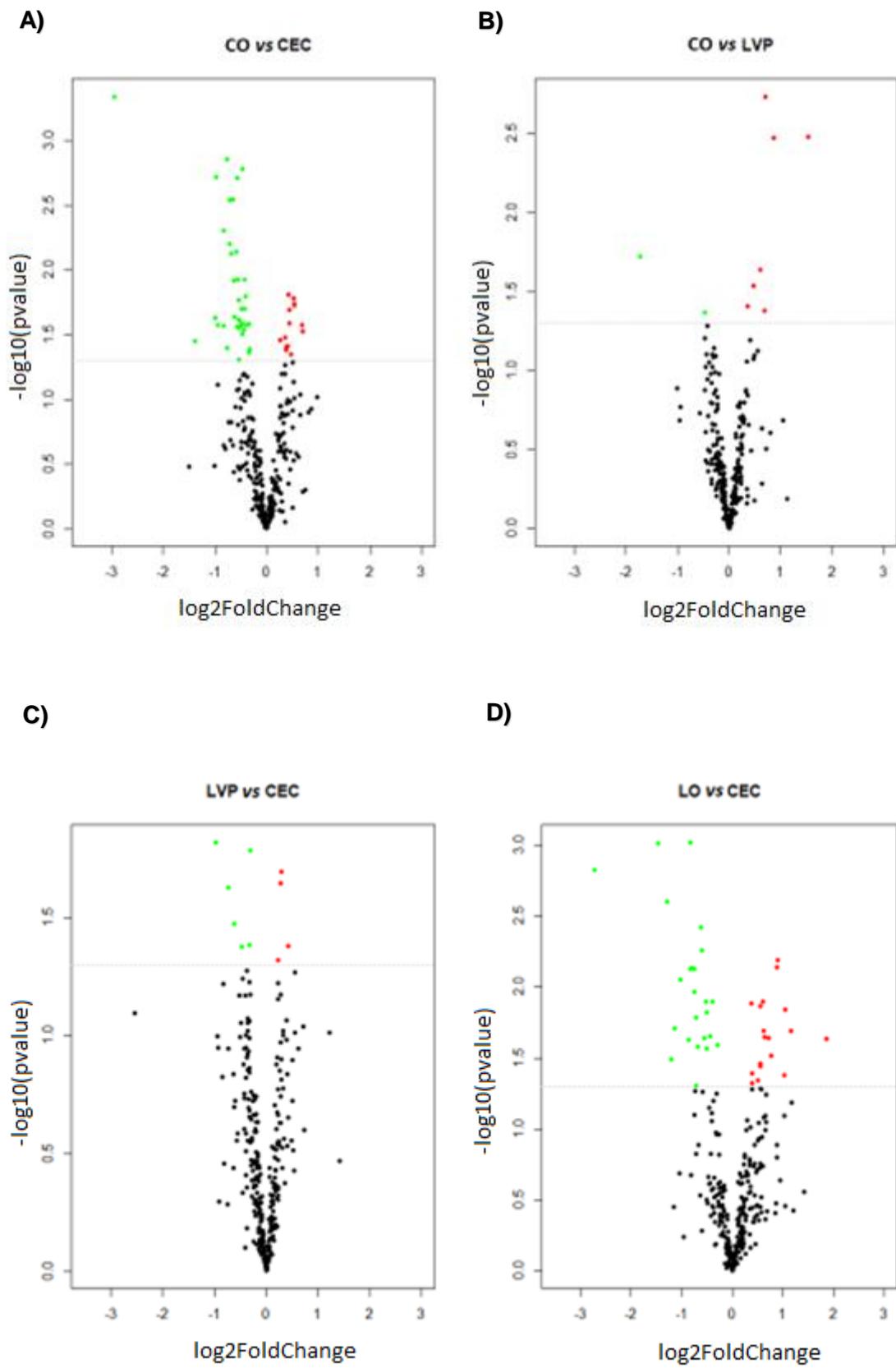
**Tabela 5** – Lista das proteínas estatisticamente significantes após pós-teste THSD na comparação entre os quatro grupos de estudo (CO, LO, LVP e CEC).

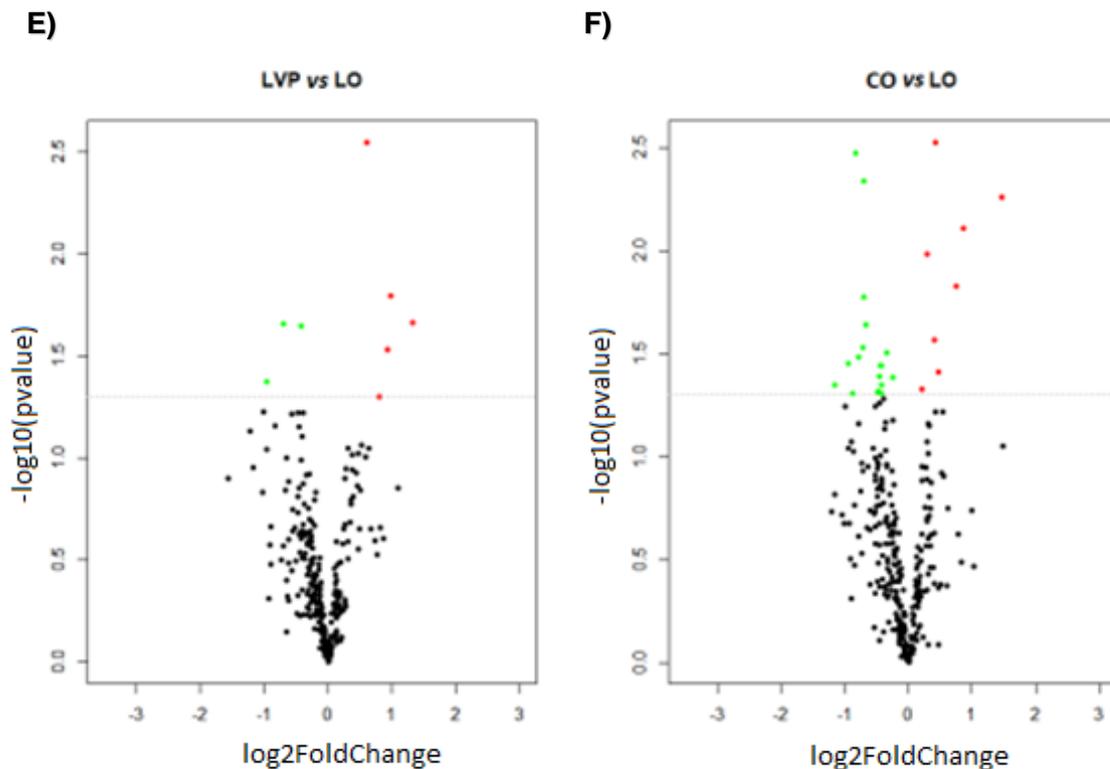
Nome da proteína, nome do gene	ANOVA, valor de p	<i>Fold-change</i>					
		CO vs CEC	CO vs LO	CO vs LVP	LO vs LVP	LVP vs CEC	LO vs CEC
<b>Albumina sérica, ALB</b>	0,01	0,43*	-0,35	-0,205	-0,145	0,43	1,57*
<b>Alfa-2-macroglobulina, A2M</b>	0,02	0,3*	0,47	0,57	-0,1	0,3*	0,73*
<b>Angiotensinogênio, AGT</b>	0,04	1,135	0,42	0,61	-0,19	1,135	-0,525
<b>Antileucoproteínase, SLPI</b>	0,03	-0,24	0,165	0,015	0,15	-0,24	0,255*
<b>Apolipoproteína A-I, APOA1</b>	0,003	1,29*	-0,24	-0,01	-0,23	1,29*	-0,325
<b>Apolipoproteína A-IV, APOA4</b>	0,01	-1,135	-0,19	-0,06	-0,13	-1,135	-0,47
<b>Apolipoproteína D, APOD</b>	0,02	0,7*	-0,17	0,065	-0,235	0,7*	-0,47
<b>Beta-2-glicoproteína 1, APOH</b>	0,02	-0,26	0,08	0,14	-0,06	-0,26	0,4*
<b>Cadeia fibrinogênio alfa, FGA</b>	0,006	0,21*	-0,25	0,05	-0,3	0,21*	-0,64
<b>Caderina-1, CDH1</b>	0,02	0,29*	-0,53	-1,93	1,4	0,29*	-0,24
<b>Cistatina-SA, CST2</b>	0,03	-0,07	-0,065	-0,145	0,08	-0,07	-0,075
<b>Complemento C3, C3</b>	0,007	0,485	-0,48	-0,215	-0,265	0,485	-0,7
<b>Componente do complemento C9, C9</b>	0,02	1,29	-0,22	-0,05	-0,21*	1,29	-1,34
<b>Cornifina-B, SPRR1B</b>	0,02	0,405	0,02	0,28	-0,26	0,405	-0,125
<b>Coronina-1A, CORO1A</b>	0,02	0,48*	0,13	0,18	-0,05	0,48*	0,31*
<b>Defensina alfa 1, DEFA1</b>	0,02	-0,29	-0,19	0,71*	-0,07	-0,29	0,17
<b>Fator inibidor da migração de Macrófago, MIF</b>	0,005	0,57	1,135*	0,27	-0,36	0,57	-0,3
<b>Haptoglobina, HP</b>	0,006	0,69*	-0,64	-0,335	-0,305	0,69*	-1,035
<b>Hemoglobina subunidade alfa, HBA</b>	0,006	-0,02	0,395*	0,22	0,395*	-0,02	0,24
<b>Hemopexina, HPX</b>	0,04	0,805	-0,3	0,3	-0,6	0,805	-0,505

<b>Hornerina, HRNR</b>	0,007	7,62*	0,48	0,38	0,1	7,62*	0,97*
<b>Imunoglobulina kappa constante, IGKC</b>	0,03	0,475	-0,32	0,145*	-0,125	0,475	-0,67
<b>Imunoglobulina pesada variável 1-18, IGHV1-18</b>	0,02	0,45*	0,2	0,45	-0,25	0,45*	-0,03
<b>Inibidor 1 de rho GDP-dissociado, ARHGDI</b>	0,03	-0,45	0,14	-0,15	0,29	-0,45	0,3*
<b>Kinogen-1, KNG1</b>	0,006	0,805*	0,09	-0,59	0,68	0,805*	0,025
<b>Miosina-9, MYH9</b>	0,02	0,65	-0,435	0,22*	-0,385	0,65	-0,7
<b>Moesina, MSN</b>	0,04	0,405*	0,03	0,71	-0,68	0,405*	-0,01
<b>Mucina-5B, MUC5B</b>	0,001	0,28	0,57*	0,02	0,57*	0,28	-0,26
<b>Mucina-7, MUC7</b>	0,01	0,78	-0,15	-0,1	-0,05	0,78	-0,88
<b>Plasminogênio, PLG</b>	0,03	0,65*	0,015	0,375	-0,36	0,65*	-0,325
<b>Proteína 17 contendo domínio Tiorredoxina, TXNDC17</b>	5,71E-05	3,055*	-0,335	0,175	-0,51	3,055*	-0,57
<b>Proteína ORM1, ORM1</b>	0,03	-0,47	0,28	-0,71	0,99	-0,47	-0,24
<b>Proteína S100-A7, S100A7</b>	0,004	-0,79	1	0,53	0,47	-0,79	1,32*
<b>Receptor polimérico de imunoglobulina, PIGR</b>	0,04	0,24*	0,54	0,37	0,17	0,24*	-7,25
<b>Serotransferrina, TF</b>	0,01	0,315*	-0,475	-1,135	0,66	0,315	-0,66
<b>Transgelina-2, TAGLN2</b>	0,02	0,41	-0,81	-0,6	-0,21	0,41	-1,01
<b>Zinco alfa 2 glicoproteína, AZGP1</b>	0,04	3,055*	0,55	0,345	0,205	3,055	-2,71

(\*) Proteínas estatisticamente significantes pelo pós-teste Tukey's honestly significant difference (THSD) com valor de  $p < 0,05$  ajustado, Benjamini & Hochberg.

A Figura 7 mostra os gráficos do perfil de abundância comparando o  $p$ -valor da Análise de Variância *versus* o valor em  $\log_2$  do *fold-change*, tornando mais fácil a visualização da semelhança entre os padrões de intensidade de proteínas entre os diferentes grupos (Figura 7). Nota-se que as proteínas que apresentaram maiores *fold-changes* estatisticamente significantes foram Hornerina (FC=7,62 em LVP vs CEC, FC=7,62 em CO vs CEC), proteína 17 contendo domínio tiorredoxina (FC=3,055 em LVP vs CEC, FC=3,055 em CO vs CEC) e proteína zinco alfa 2 glicoproteína (FC=3,055 em LVP vs CEC, FC=3,055 em CO vs CEC).



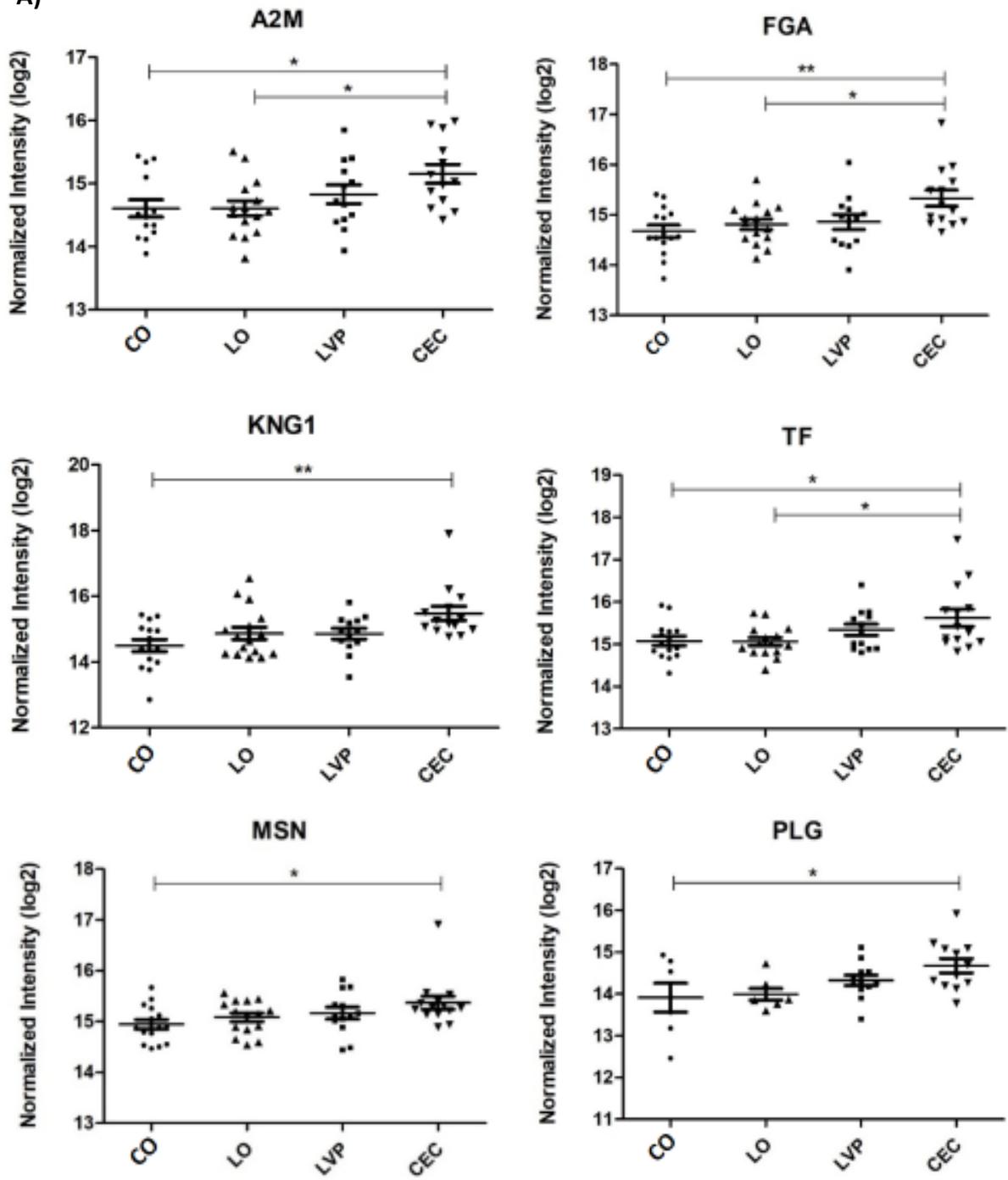


**Figura 7** – Perfil de abundância de proteínas estatisticamente significantes entre dois grupos (*Volcano plot*). Os gráficos mostram o valor de  $-\log_{10}(p \text{ value})$ , sendo valor de  $p$  após Análise de Variância, versus o  $\log_2$  do fold change para (A) Controle vs CEC, (B) Controle vs LVP, (C) LVP vs CEC, (D) LO vs CEC, (E) LVP vs LO, (F), Controle vs LO.

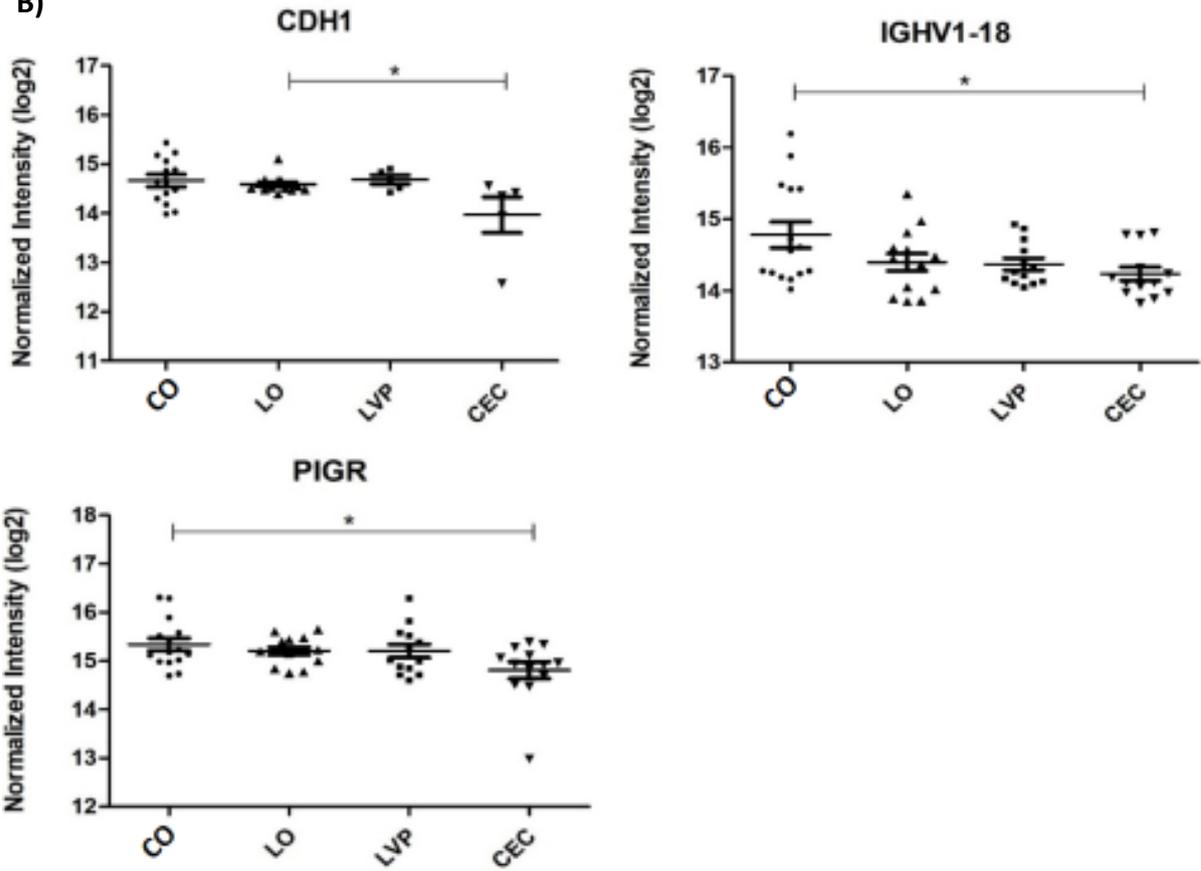
Os gráficos de dispersão das 37 proteínas estatisticamente significantes são apresentados abaixo. As proteínas diferencialmente abundantes entre o grupo controle e o grupo CEC com os respectivos nomes dos genes são *A2M*, *APOA1*, *APOD*, *CDH1*, *CORO1A*, *FGA*, *HP*, *IGHV1-18*, *KNG1*, *MSN*, *PIGR*, *PLG* e *TF* (Figura 8).

Nesse conjunto CO vs CEC, as proteínas com respectivo nome do gene *A2M*, *FGA*, *KNG1*, *MSN*, *PLG* e *TF*, apresentam um aumento de intensidade crescente no sentido do grupo CO, LO, LVP e CEC, mostrando o aumento de sua intensidade conforme a lesão apresenta maiores índices de transformação maligna (Figura 8A). Já os transcritos *CDH1*, *IGHV1-18* e *PIGR* (Figura 8B), tiveram o resultado oposto, com sua diminuição conforme o aumento do risco de transformação maligna. Finalmente, *APOA1*, *APOD*, *CORO1A* e *HP* apresentaram padrões irregulares de intensidade entre os grupos (Figura 8C).

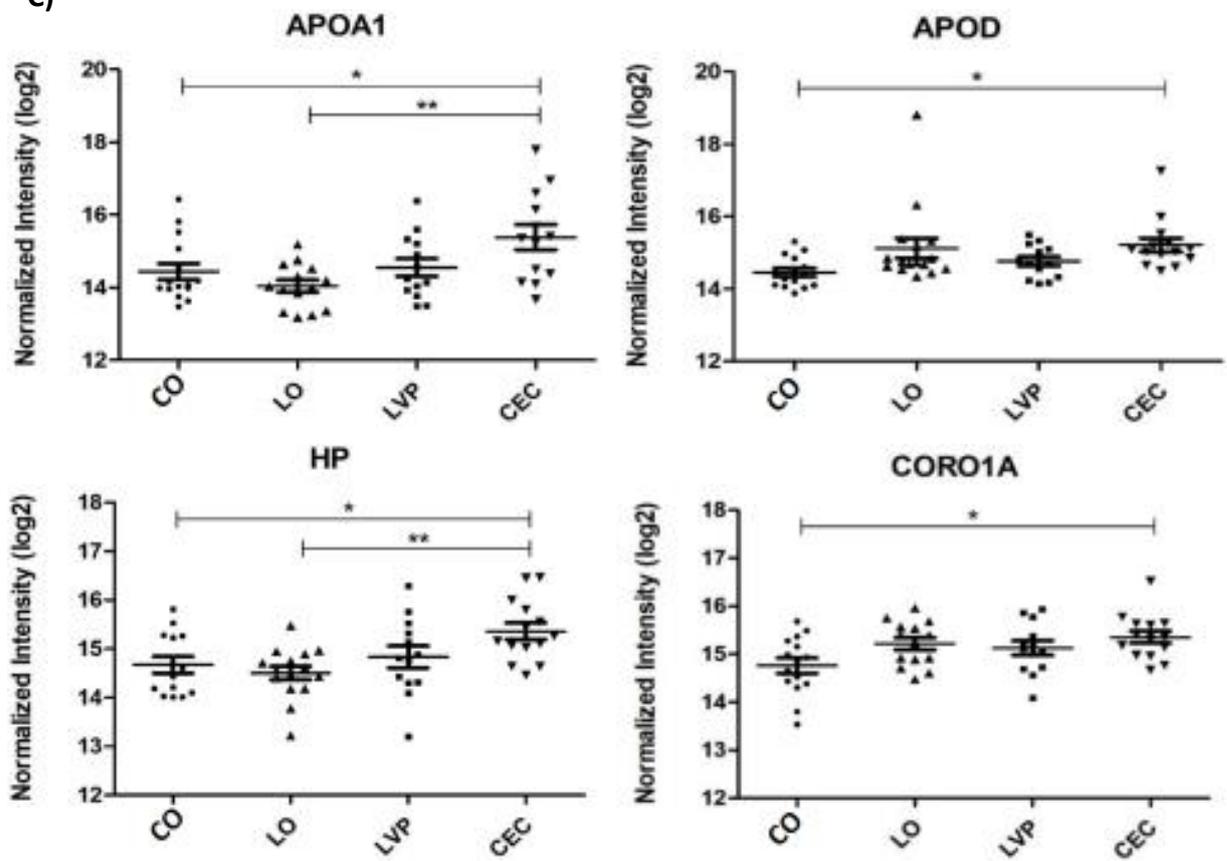
A)



B)



C)



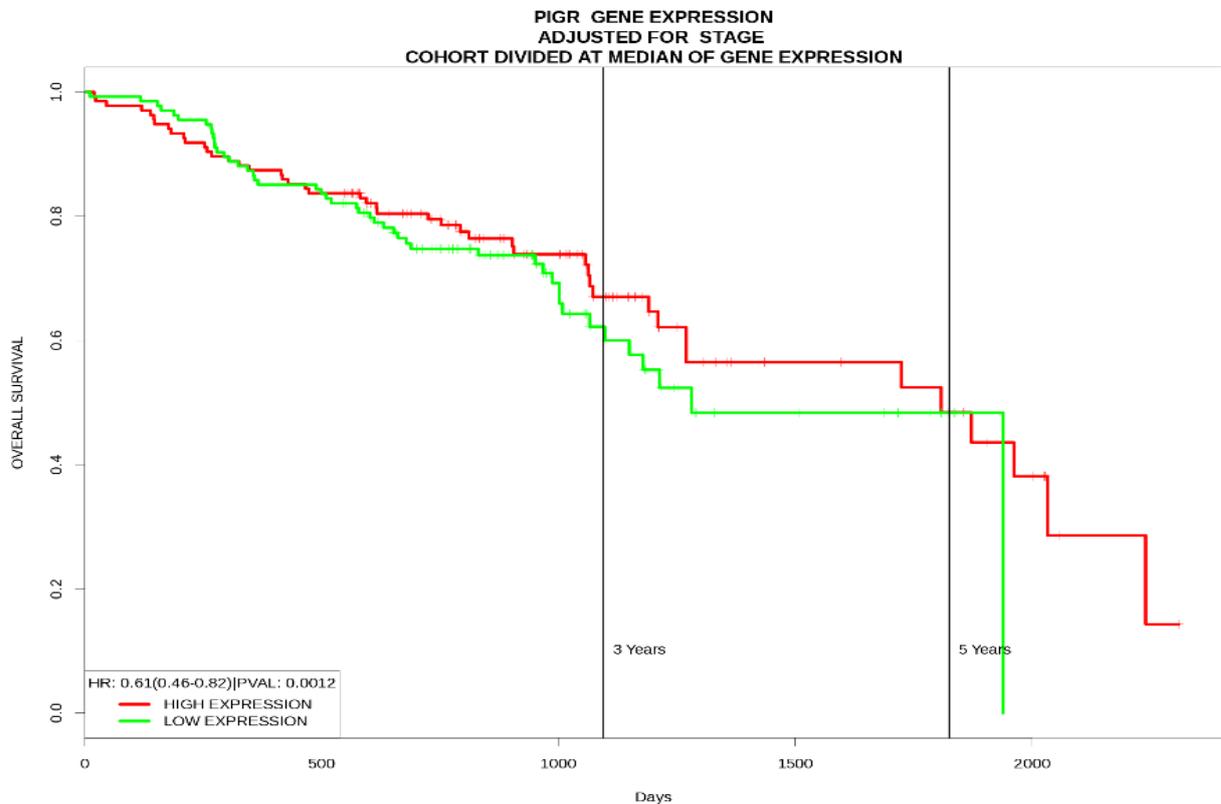
**Figura 8** – Gráficos de dispersão da intensidade normalizada em Log2 das proteínas com diferença estatisticamente significativa após pós-teste Tukey's honestly significant difference ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e pacientes com CEC, demarcadas por asteriscos e separadas por perfis distintos onde A) *A2M*, *FGA*, *KNG1*, *MSN*, *PLG* e *TF* apresentam um aumento de intensidade crescente do grupo controle até o CEC, B) *CDH1*, *IGHV1-18* e *PIGR* apresentam uma diminuição em relação ao CEC e C) *APOA1*, *APOD*, *CORO1A* e *HP* apresentam padrões irregulares. As proteínas *A2M*, *APOA1*, *CDH1*, *FGA*, *HP* e *TF* também apresentam diferença na abundância com significância estatística entre as desordens potencialmente malignas e grupo de paciente com CEC. A identidade das proteínas foi associada ao seu respectivo nome do gene.

As proteínas diferencialmente abundantes entre as desordens orais potencialmente malignas e CEC são *A2M*, *ALB*, *APOA1*, *APOH*, *ARHGDI1A*, *AZGP1*, *C3*, *CDH1*, *CST2*, *FGA*, *HBA*, *HP*, *HPX*, *MUC5B*, *MUC7*, *ORM1*, *SLPI* e *TF* (Figura 9, ANEXO 3). Existem proteínas comuns entre os dois grupos, ou seja, que apresentam diferença estatisticamente significativa comparadas com o grupo CEC tanto no grupo CO quanto no LO, sendo elas *A2M*, *APOA1*, *CDH1*, *FGA*, *HP* e *TF*.

As proteínas estatisticamente significantes também foram comparadas com bancos de dado de mRNA associados a sobrevida global, sobrevida livre de metástase e livre de recorrência por meio da ferramenta PROGgeneV2 para avaliação da associação com prognóstico descrita previamente, resultando em valor de significância  $p$  e *Hazard ratio* (HR), ou taxa de risco, que é a probabilidade de um paciente desenvolver o fator de risco estudado.

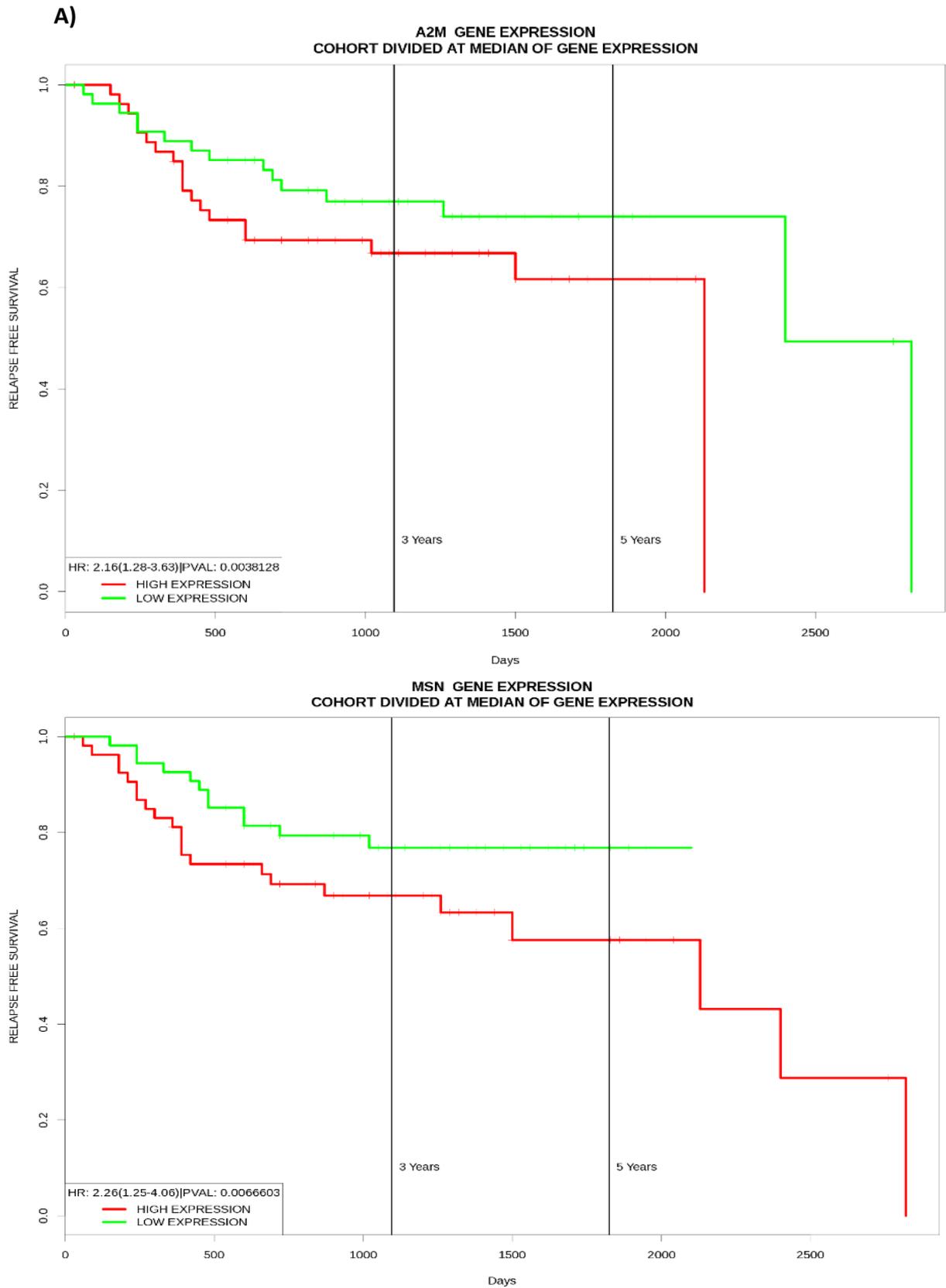
As proteínas apresentaram associação com sobrevida global em câncer de cabeça e pescoço de acordo com os bancos de dados públicos contendo a análise de expressão gênica de alvos na lesão obtidos pelo PROGgene. Todos os gráficos apresentam resultados onde as proteínas diferencialmente expressas entre CO e CEC encontradas em saliva no nosso trabalho mantiveram um padrão similar aos transcritos (Figuras 10, 11 e 12).

*PIGR* ( $p=0,0012$ ; HR=0,61) apresentou uma relação onde a baixa expressão está associada com pior prognóstico, o que está de acordo com os gráficos de dispersão das proteínas analisadas em nosso estudo, com diminuição gradual de abundância do grupo CO até progressão para CEC (Figura 9). As outras proteínas que apresentaram relação de baixa expressão com pior prognóstico estão em anexo (Figura 10, ANEXO 4).



**Figura 9** – Proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos incluídos nesse trabalho cujos transcritos foram associados com sobrevida global. A análise foi realizada com a ferramenta PROGgene e os genes presentes no grupo *PIGR* têm associação com uma pior sobrevida geral ao diminuírem sua expressão. O nome de cada gene está descrito no cabeçalho de cada figura. As linhas encerram de acordo com o máximo de sobrevida alcançada pelos pacientes avaliados no banco de dados.

Em relação à recorrência, de acordo com os bancos de dados públicos, a diminuição da expressão dos transcritos *MSN* ( $p=0,0066$ ;  $HR=2,26$ ) e *A2M* ( $p=0,0038$ ;  $HR=2,16$ ) teve associação com o aumento da sobrevida livre de recorrência, o que está de acordo com os resultados encontrados (Figura 11).



**Figura 11** – Proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos, cujos transcritos são associados com sobrevida livre de recorrência. Os genes presentes no grupo (A) *A2M* e *MSN*, além de seu

agrupamento têm associação com uma melhor sobrevida livre de recorrência ao diminuírem sua expressão.

No banco de dados de sobrevida livre de metástase foi possível encontrar associação entre a diminuição na expressão do transcrito *CDH1* ( $p=0,021$ ; HR=0,64) (Figuras 8B e 12A). O efeito contrário foi visto no transcrito *KNG1* ( $p=0,026$ ; HR=7,95) (Figuras 8A e 12B), a diminuição da sua expressão foi associada com melhor sobrevida livre de metástase.

Os dados referentes à associação entre os grupos LO e LVP com os bancos de dados estão em anexo (Figura 10A, ANEXO 4).

Foi realizado também o enriquecimento do grupo de 37 proteínas estatisticamente significantes utilizando a ferramenta Enrichr para ter uma visão geral dos potenciais processos biológicos que podem estar envolvidas por meio de pós-teste exato de Fisher. Os três principais processos biológicos são: i) ativação da atividade da fosfatidilcolina-esterol O-aciltransferase, com envolvimento das proteínas APOA1 e APOA 4, ii) na inibição de endopeptidase, com envolvimento das proteínas CST2, SLPI, A2M, AGT e KNG1, e por último a iii) ligação a colesterol, novamente com envolvimento das proteínas APOA1 e APOA 4, além da proteína APOD (Tabela 6).

**Tabela 6** – Enriquecimento das proteínas estatisticamente significantes para verificação de seus principais processos biológicos.

<b>Processo biológico</b>	<b>valor de p ajustado*</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Grupos de lesões</b>
<b>Ativador de atividade da fosfatidilcolina-esterol O-aciltransferase</b>	0,001	<i>APOA1; APOA4</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Atividade de inibição de endopeptidase</b>	0,0001	<i>CST2; SLPI; A2M; AGT ;KNG1</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Ligação a colesterol</b>	0,001	<i>APOA1; APOA4; APOD</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Ligação a estéreis</b>	0,001	<i>APOA1; APOA4; APOD</i>	CEC e LO; CEC e CO

<b>Atividade de transportação de colesterol</b>	0,005	<i>APOA1; APOA4</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Atividade da proteína-disulfido redutase</b>	0,05	<i>TXNDC17</i>	CEC e CO; CEC e LVP
<b>Atividade inibidora da endopeptidase tipo-cisteína</b>	0,026	<i>CST2; KNG1</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Atividade transportadora transmembrana de macromolécula</b>	0,050	<i>AZGP1</i>	CEC e LO
<b>Atividade inibidora de endopeptidase tipo serina</b>	0,002	<i>SLPI; A2M; AGT</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Ligante do receptor de apolipoproteína</b>	0,05	<i>APOA1</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Ligante do receptor de transferrina</b>	0,05	<i>TF</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Ligante da cadeia de miosina pesada</b>	0,05	<i>CORO1A</i>	CEC e CO
<b>Atividade de oxidoreductase</b>	0,05	<i>TXNDC17</i>	CEC e CO; CEC e LVP
<b>Atividade de transportador esterol</b>	0,013	<i>APOA1; APOA4</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Atividade de regulador de endopeptidase</b>	0,016	<i>SLPI; KNG1</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Atividade do ativador de lipase</b>	0,05	<i>APOH</i>	CEC e LO
<b>Ligante do receptor RAGE</b>	0,05	<i>S100A7</i>	CO e LVP; CO e LO
<b>Ligante do íon cobre</b>	0,019	<i>ALB; APOA4</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Ligante do receptor de imunoglobulina</b>	0,047	<i>IGKC; IGHV1-18</i>	CO e LO, CEC e CO
<b>Ligante da interleucina-1</b>	0,05	<i>A2M</i>	CEC e LO; CEC e CO
<b>Ligante de partícula reconhecadora de sinais</b>	0,05	<i>TF</i>	CEC e LO; CEC e CO

(\*) Pós-teste exato de Fisher com valor de p ajustado por Benjamini & Hochberg.

## 6. Discussão

Esse estudo busca identificar e quantificar potenciais proteínas marcadores de progressão tumoral. Para isso, analisou-se amostras de saliva de pacientes que apresentavam lesões potencialmente malignas de leucoplasia oral (LO) e leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) em comparação com carcinoma espinocelular (CEC) oral.

De maneira geral, os estudos publicados têm indicado marcadores candidatos entre as lesões de LO e CEC (Sridharan et al., 2017; Wu et al., 2018), ou entre LVP e CEC (Akrish et al., 2015; Akrish et al., 2017). Nenhum estudo publicado buscou por marcadores utilizando em conjunto as lesões de LO, LVP e CEC. Assim, esse estudo é pioneiro na análise de perfil de proteínas dessas duas DOPMs e CEC, além do grupo saudável.

O raciocínio de incluir amostras de pacientes com lesões LO e LVP em um mesmo estudo foi permitir uma visão global de marcadores das lesões com potenciais de transformação maligna diferentes. A análise de proteínas presentes em desordens orais potencialmente malignas (DOPMs) com diferentes porcentagens de transformação para CEC pode oferecer uma melhor compreensão dos fatores moleculares envolvidos em diferentes estágios de transição do epitélio sadio para epitélio com displasia, carcinoma *in situ* e por fim, em CEC.

Dessa forma, neste estudo foram analisadas duas DOPMs bem conhecidas na literatura, apresentando diferenças quanto ao gênero e faixa etária dos pacientes afetados, mas principalmente com uma grande diferença na taxa de transformação maligna, sendo de aproximadamente 3% na LO e acima de 70% na LVP (OMS, 2017).

### 6.1. Discussão de dados clínicos e histopatológicos

Os pacientes deste estudo apresentaram um perfil epidemiológico similar ao descrito na literatura no que diz respeito a distribuição por gênero, idade, localização das lesões e padrão histopatológico. Os estadiamentos obtidos no grupo CEC refletem o diagnóstico tardio da doença, não havendo nenhum tumor dentro do grupo T1, que pode apresentar o melhor prognóstico. A média de faixa etária dos pacientes com LVP está de acordo com a literatura (Warnakulasuryia, Johnson & Van der Waal,

2007; Münscher et al., 2018), sendo de 67,14 anos, variando de 55 a 67 anos, o que é mais elevada que CEC e LO. O tempo de acompanhamento de LVP em média foi de 6,57 anos, sendo as coletas realizadas de março de 2017 até outubro de 2018, a predominância pelo sexo feminino, com 84,61% dos casos. As características histopatológicas são presença de um número maior de hiperkeratose, hiperplasia epitelial, expansão multifocal e maior número de displasias celulares de grau leve e moderado em comparação com LO.

O uso da saliva como fluido de escolha foi realizado considerando os vários resultados promissores envolvendo a detecção de perfis proteômicos por meio da espectrometria de massas. A saliva é de fácil coleta, não invasivo, relativamente de baixo custo e está em contato direto com as lesões (Nagler et al., 2006; Prasad, Sharma & Babu, 2013).

## **6.2. Proteínas ‘exclusivas’ do grupo controle**

Nessa análise proteômica após os filtros aplicados, foram identificadas 319 proteínas no total, com 3 proteínas exclusivas do grupo controle, dentre elas a Imunoglobulina kappa variável 1-6 (*IGKV1-6*), que foi estudada por Chen e colaboradores por meio de imunohistoquímica utilizando linfonodos livres de metástase em pacientes com câncer de mama, o aumento de sua expressão teve associação com sobrevida livre de doença e sobrevida global (Chen et al., 2012).

## **6.3. Proteínas ‘exclusivas’ dos grupos de lesões LO, LVP e CEC**

5 proteínas estavam presentes nas três lesões, porém não no grupo controle, sendo elas o Fator inibidor de migração de macrófago (*MIF*), Queratina, tipo II citoesquelético 78 (*KRT78*), Filamina-A (*FLNA*), Proteína AHNAK associada à diferenciação de neuroblastos (*AHNAK*) e Proteína dissulfeto-isomerase A3 (*PDIA3*).

O MIF é um importante mediador inflamatório e, em revisão feita por Nobre e colaboradores, estudos experimentais e clínicos demonstraram o aumento de sua expressão associado com a produção de citocinas, fatores de crescimento tumoral e angiogênese (Nobre et al., 2017). KRT78 teve a expressão de seu gene avaliada através da construção de uma rede de co-expressão feita por Zhang e colaboradores

e foi encontrada associação entre o aumento de sua expressão e a tumorigênese de CEC oral (Zhang et al., 2018).

A filamina-A é uma proteína de adesão e movimentação celular e, em um estudo analisando a expressão de ki-67 em fibroblastos de CEC irradiado e fibroblastos de pacientes sadios, observou-se o aumento de sua expressão e sua associação com crescimento, invasão e motilidade de CEC (Shao et al., 2016). A PDIA3 é uma endopeptidase cuja expressão aumenta em alguns tipos de carcinoma, dessa forma, Ye e colaboradores compararam medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda e grupo controle através de RT-PCR, notando-se o aumento de sua expressão no tecido tumoral e, após a regulação negativa da PDIA3 foi possível notar diminuição de proliferação e invasão celular (Ye et al., 2018).

#### **6.4. Proteínas 'exclusivas' entre LVP e CEC**

Em relação às 4 proteínas exclusivas entre LVP e CEC, a Alfa-2-antiplasmina é um membro da família protease inibidora de serina e, em um estudo por meio de espectrometria de massas buscando uma assinatura proteômica do câncer de ovário, houve aumento de abundância estatisticamente significativa em biópsia de tumor em relação ao tecido do grupo CO (Poersch et al., 2016).

De forma semelhante foi analisado o tecido de câncer de ovário e grupo CO por espectrometria de massas e a Apolipoproteína A-IV (*APOA4*), uma proteína presente no plasma, teve diminuição em sua abundância no tecido tumoral, após isso foi feita sua medição por ELISA, sendo capaz de discriminar estágios tumorais iniciais de paciente saudável (Timms et al., 2014).

A proteína Componente complemento C9 (*C9*), que faz parte do sistema complemento, relacionado ao sistema imune, foi incluída em um agrupamento de 7 proteínas com potencial para serem biomarcadoras em câncer de pulmão, o estudo utilizou proteômica por meio de espectrometria de massas e etapas posteriores de verificação e validação, obtendo no resultado final 91,7% de especificidade e 75% de sensibilidade para esse painel que inclui a proteína Receptor 1 do fator de crescimento epidermal (*EGFR1*), metaloproteinase de matrix 7 (*MMP7*), Precursor 6 da anidrase carbônica (*CA6*), Receptor do fator de crescimento de células-tronco (*KIT*), Proteína

C reativa (*CRP*) e Alfa 1 anti quimiotripsina (*SERPINA3*), além da C9 (Jung et al., 2017).

A proteína Inibidor H1 de cadeia pesada Inter-alfa-tripsina (*ITIH1*) faz parte de uma família de proteases inibidoras do plasma com papel importante na resposta inflamatória, foi feita q-PCR e cDNA *dot blot* e imunohistoquímica para detecção de sua expressão em câncer de mama, endométrio, ovário, estômago, intestino delgado, cólon, reto, pulmão, tireóide, próstata, rins e pâncreas, foi possível observar a diminuição de sua expressão em múltiplos tumores, como os de mama, cólon e câncer de pulmão, sua diminuição está ligada com a perda de estabilidade da matrix extracelular, tendo associação com progressão tumoral, invasão e metástase (Hamm et al., 2008).

### **6.5. Agrupamento hierárquico e abundância de proteínas**

O agrupamento hierárquico não supervisionado indicou que os pacientes não se agruparam perfeitamente de acordo com a classificação histológica e clínica em relação à abundância das proteínas. Esse padrão está associado à falta de similaridade dentro do grupo como já observado em estudo anterior de Winck et al., (2015), que também observou que pacientes com lesão ativa se agrupavam no grupo controle.

De maneira geral, observamos um melhor agrupamento de controle mais próximo de LO e parte das amostras não se agruparam. Esses resultados podem ser explicados por diversos fatores, e entre eles, a alta variabilidade do grau de cada lesão, baixa capacidade da análise em refletir as diferenças entre as lesões potencialmente malignas, alta similaridade em relação alguns grupos analisados, baixo número de amostras, baixo número de proteínas quantificadas que poderiam segregar os grupos, entre outros.

Apesar da abundância das proteínas não levarem a separação entre classes, entre as proteínas identificadas e quantificadas, 37 apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Cinco proteínas apresentam diferenças entre CO e LO, 3 entre CO e LVP, 2 entre LO e LVP, 18 entre LO e CEC e 13 entre CO e CEC. Do total de proteínas identificadas, a maior parte é compartilhada pelos três grupos. Esses resultados podem ser observados nos gráficos tipo *volcano* que

mostram a comparação da abundância de proteínas comparadas entre dois grupos (Figura 7).

### **6.6. Comparação de proteínas entre os grupos LVP e CEC**

Não houve diferença estatística de abundância entre os grupos LVP e CEC, o que já poderia ser previsto já que os pacientes com LVP muito provavelmente desenvolverão CEC durante o seu curso clínico. O resultado nos mostra um possível caminho de malignização, como observado no *heatmap* e, mais especificamente, nos gráficos de dispersão (Figuras 8 e 9).

Em várias das proteínas com diferença estatística entre CO e CEC ou LO e CEC, a LVP apresenta um padrão de proximidade com o CEC, mostrando uma possível similaridade na abundância de determinadas proteínas no sentido que a saliva de pacientes com CEC é mais similar à LVP e de pacientes com LO é mais similar ao controle. Por exemplo, as proteínas com os respectivos nomes dos genes, *A2M*, *AGT*, *FGA*, *IGHV1-18*, *MSN*, *PIGR*, *PLG* e *TF*.

### **6.7. Seleção de grupo de interesse e estudos sobre proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos CO e CEC**

Estudo recente de Shan e colaboradores (2018), partindo de um delineamento experimental similar ao nosso trabalho com o uso de marcação isóbara e análise proteômica, compararam a saliva de pacientes CO, LO, Líquen plano, que é outra DOPM, e CEC. Obtiveram um total de 246 proteínas identificadas e quantificadas, e 21 proteínas diferencialmente expressas, dando prioridade às proteínas diferencialmente expressas entre o grupo CO e CEC para a etapa posterior de validação por meio do ensaio de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), selecionando 3 proteínas com alta sensibilidade e especificidade, sendo elas proteína receptora antagonista de interleucina 1 (*IL1RN*), proteína S100 de ligação ao cálcio (*S100A2*) e membro 2 da família 3 de carreamento de solutos (*SLC3A2*) (Shan et al., 2019).

Em relação as proteínas identificadas e quantificadas, as proteínas CDH1 e SLPI, que apresentaram uma tendência a diminuição do grupo CO em relação ao CEC e

MSN, que contrariamente apresentou aumento do grupo CO em relação ao CEC, estavam presentes na análise da sobrevida global, livre de metástase e livre de recorrência, o que, aliado à análise da função molecular chamam atenção para possíveis funções biológicas dessas proteínas no contexto molecular do câncer.

A proteína alfa-2-macroglobulina (A2M) é uma molécula presente no sangue, responsável pela inibição de vários grupos de proteínas (Lemanska-Perek et al., 2018). Ela apresentou um aumento de intensidade no grupo de pacientes com CEC em relação ao grupo CO e LO ( $p < 0,05$ ). Não apresentou significância estatística entre CEC e LVP, como também entre LVP e LO. Na análise de sobrevida, seu transcrito teve uma relação direta entre o aumento de sua expressão e a piora na sobrevida livre de recidivas. Estudos identificaram o aumento desta proteína em câncer de bexiga, principalmente por estar envolvido na inativação de uma série de proteases envolvidas (Lemanska-Perek et al., 2018). Em acréscimo, observou-se que o uso de Cisplatina, droga comumente usada no tratamento desse tipo de câncer, causa sua diminuição (Zia et al., 2018). Essa proteína pode ser um potencial marcador de progressão.

Uma proteína que segue o mesmo padrão é a moesina (MSN), com aumento de intensidade no grupo CEC em relação a CO ( $p < 0,05$ ), não apresentando diferença estatisticamente significativa em relação aos outros grupos. Seu transcrito teve associação entre o aumento de expressão e a piora na sobrevida livre de recidivas. Essa proteína está envolvida na morfologia celular, adesão celular, junções aderentes e mobilidade celular e, em um estudo conduzido por meio de imunohistoquímica no fronte invasivo de CEC oral, foi observado que sua marcação imunohistoquímica foi forte nessa região nas células tumorais, distribuída de forma homogênea e considerada um fator desfavorável para prognóstico em CEC oral (Barros et al., 2018).

A albumina sérica (ALB), proteína mais abundante no sangue, também apresentou um aumento no grupo de pacientes com CEC em relação a LO ( $p < 0,05$ ), com comportamento similar a A2M na análise de sobrevida. Já existem estudos demonstrando que o aumento dessa proteína está ligado com uma resposta inflamatória mais agressiva e com a progressão de vários tipos de carcinoma, incluindo o CEC oral (Park et al., 2016).

Além disso, apresentou um aumento no grupo CEC em relação ao CO ( $p < 0,05$ ). Essa proteína é um fator de transcrição envolvida na regulação de genes ligados a doenças autoimunes e câncer (Kumar et al., 2015). Além disso, é um componente essencial no citoesqueleto de células com alta motilidade, o que também se reflete na capacidade tumoral de invasão e metástase. Em um estudo de proteômica e verificação por ELISA e *Western Blotting*, foi considerada parte de um painel de 5 potenciais biomarcadores para carcinoma de bexiga (He et al., 2018).

A cadeia de fibrinogênio alfa (FGA), proteína presente na formação de tampões de fibrina em lesões, apresentou um aumento em CEC em relação ao grupo CO e LO ( $p < 0,05$ ) e uma tendência a aumento em relação à LVP. Estudos relatam seu potencial como biomarcador em câncer de bexiga, estômago e esôfago, sendo envolvida em processos de carcinogênese, metabolismo de xenobióticos, adesão focal e ativação de plaquetas, é possível inferir um papel importante dessa proteína na tumorigênese e sua expressão diferenciada em DOPM (Duan et al., 2018; Wang et al., 2017; Du & Zang, 2017).

O receptor polimérico de imunoglobulina (PIGR) apresentou diferenças entre o grupo CO e o CEC ( $p < 0,05$ ), sendo um padrão decrescente do grupo CO, LO, LVP e por último CEC. Essa proteína é uma componente chave no sistema imune das mucosas e, de acordo com os resultados do Proggene, a diminuição da sua expressão está associada com menor sobrevida geral. Sua diminuição foi observada tanto em RNA quanto na proteína em um estudo feito com pacientes com carcinoma nasofaríngeo comparado a um grupo controle, sendo vista uma relação direta da sua diminuição em estágios mais avançados, comparados com estágios iniciais (Qi et al., 2014).

#### **6.8. Estudo de proteínas diferencialmente abundantes entre grupos LO e CEC**

A hemoglobina alfa (*HBA1*), apresentou uma diferença estatística entre LO e CEC e entre LO e LVP ( $p < 0,05$ ), sendo LO o grupo de menor expressão em ambos os casos. A sua baixa expressão em tecido foi associada com uma melhor sobrevida geral. Essa proteína está envolvida no transporte de oxigênio do pulmão para os tecidos e já tem uma correlação bem estabelecida do seu aumento como fator preditivo para uma pior resposta à radioterapia e quimioterapia em várias neoplasias,

incluindo no câncer de cabeça e pescoço (Glaser et al., 2001). A diferença estatística entre LO e LVP pode indicar uma proteína presente em estágios mais agressivos da lesão, além de corroborar a tendência do grupo LVP de ter um perfil de expressão mais próximo ao CEC do que do LO. Nesse estudo, essa foi a única proteína comum entre LO e LVP que apresentou diferença estatisticamente significativa.

### **6.9. Critérios de seleção de proteínas para próximas etapas**

Para preparação para uma nova fase do estudo, nosso critério de escolha das potenciais proteínas associadas à transformação maligna se baseou em proteínas diferencialmente expressas entre os grupos CO e CEC, nas quais as DOPM apresentam padrão ou tendência similar ao CEC. As proteínas significantes foram analisadas em relação à análise de sobrevida pelo programa PROGgene e com dados da literatura de estudos envolvendo a análise de proteínas em diferentes neoplasias. Observou-se que algumas proteínas não apresentam associações clínicas ou mesmo, são inversas à análise no PROGgene. Isso é esperado, uma vez que para algumas proteínas a expressão no tecido pode não se correlacionar com a abundância na saliva. Entretanto, de maneira geral, tais critérios de seleção nos auxiliam a selecionar proteínas mais promissoras para etapas futuras de verificação por imunohistoquímica e por proteômica dirigida.

Em resumo, as proteínas alfa-2-macroglobulina, moesina e receptor polimérico de imunoglobulina são, pelos critérios escolhidos, as que estão associadas ao maior potencial de malignização, pois apresentam diferentes abundâncias entre controle e CEC, e com um padrão de aumento ou diminuição em relação à LO e LVP, com abundância crescente (*A2M*), (*MSM*) ou decrescente (*PIGR*) do grupo CO para o CEC. Além disso, o transcrito *A2M* apresenta associação com sobrevida livre de recorrência e *PIGR* apresenta associação com sobrevida global.

## 7. Conclusão

1. Esse estudo indica que as lesões de leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa apresentaram diferenças do perfil clínico e histopatológico.
2. Os resultados sugerem que o perfil de abundância de proteínas na saliva é mais similar entre controle e pacientes com lesões de leucoplasia oral LO e entre leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma espinocelular.
3. Entre as potenciais proteínas que podem estar associadas à malignização, destacam-se as proteínas alfa-2-macroglobulina, moesina e receptor polimérico de imunoglobulina que apresentaram diferenças de abundância estatisticamente significantes entre CO e CEC, aumentando ou diminuindo a abundância nas DOPM. As proteína alfa-2-macroglobulina e moesina apresentaram maior expressão em CEC em relação a LO e CO, e receptor polimérico de imunoglobulina apresentou menor expressão em CEC em relação ao grupo CO, e seus transcritos tiveram correlação com o prognóstico.

## **8. Perspectivas**

Serão realizadas etapas de verificação de proteômica dirigida utilizando a saliva de pacientes em um corte independente e as análises de imunohistoquímica das DPOM e CEC.

## Referências

Al, Ruixue et al. Microenvironmental regulation of the progression of oral potentially malignant disorders towards malignancy. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81617, 2017.

AKRISH, Sharon et al. Oral squamous cell carcinoma associated with proliferative verrucous leukoplakia compared with conventional squamous cell carcinoma—a clinical, histologic and immunohistochemical study. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 119, n. 3, p. 318-325, 2015.

AKRISH, Sharon J. et al. Cancer-associated fibroblasts are an infrequent finding in the microenvironment of proliferative verrucous leukoplakia-associated squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 5, p. 353-358, 2017.

AZFAR, Rahat S.; ELSTON, D. M. Proliferative verrucous leukoplakia. **Medscape Reference-Drugs, Diseases and Procedures**, 2012.

BAGAN, Jose V. et al. Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: a series of 55 cases. **Oral oncology**, v. 47, n. 8, p. 732-735, 2011.

BAGAN, J. et al. Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. **Oral diseases**, v. 16, n. 4, p. 328-332, 2010.

BAGAN, J. V. et al. Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. **MEDICINA ORAL PATOLOGIA ORAL Y CIRUGIA BUCAL**, v. 13, n. 2, p. 110, 2008.

BAGAN, Jose V. et al. Proliferative verrucous leukoplakia: unusual locations of oral squamous cell carcinomas, and field cancerization as shown by the appearance of multiple OSCCs. **Oral oncology**, v. 40, n. 4, p. 440-443, 2004.

BAGAN, Jose V. et al. Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 32, n. 7, p. 379-382, 2003.

BAJO-GRANERAS, Raquel et al. Expression and potential role of apolipoprotein D on the death–survival balance of human colorectal cancer cells under oxidative stress conditions. **International journal of colorectal disease**, v. 28, n. 6, p. 751-766, 2013.

BARNES, Leon et al. (Ed.). **Pathology and genetics of head and neck tumours**. IARC, 2005.

BARROS, Francisco Bárbara Abreu et al. Moesin expression by tumor cells is an unfavorable prognostic biomarker for oral cancer. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 53, 2018.

BATSAKIS, John G.; SUAREZ, Patricia; EL-NAGGAR, Adel K. Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. **Oral oncology**, v. 35, n. 4, p. 354-359, 1999.

BENSIMON, Ariel; HECK, Albert JR; AEBERSOLD, Ruedi. Mass spectrometry–based proteomics and network biology. **Annual review of biochemistry**, v. 81, p. 379-405, 2012.

BORRÀS, Eva; SABIDÓ, Eduard. What is targeted proteomics? A concise revision of targeted acquisition and targeted data analysis in mass spectrometry. **Proteomics**, v. 17, n. 17-18, p. 1700180, 2017.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BROUNS, Elisabeth RE A. et al. The relevance of uniform reporting in oral leukoplakia: definition, certainty factor and staging based on experience with 275 patients. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 18, n. 1, p. e19, 2013.

CAMISASCA, Danielle Resende et al. A proteomic approach to compare saliva from individuals with and without oral leukoplakia. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 43-52, 2017.

CARNIELLI, Carolina Moretto et al. Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 3598, 2018.

CERERO-LAPIEDRA, Rocio et al. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 6, p. e839-45, 2010.

CHEN, Zonglin et al. Immunoglobulin kappa C predicts overall survival in node-negative breast cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44741, 2012.

CHEN, Edward Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 128, 2013.

CINE, Naci et al. Identification of ApoA1, HPX and POTEE genes by omic analysis in breast cancer. **Oncology reports**, v. 32, n. 3, p. 1078-1086, 2014.

COOPER, Jay S. et al. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. **Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, v. 31, n. 6, p. 748-758, 2009.

COX, Jürgen; MANN, Matthias. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367, 2008.

CROWLEY, Emily et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 10, n. 8, p. 472, 2013.

DONG, Yan et al. Establishment of a new OSCC cell line derived from OLK and identification of malignant transformation-related proteins by differential proteomics approach. **Scientific reports**, v. 5, p. 12668, 2015.

DU, Jiang; ZHANG, Lin. Analysis of salivary microRNA expression profiles and identification of novel biomarkers in esophageal cancer. **Oncology letters**, v. 14, n. 2, p. 1387-1394, 2017.

EL-NAGGAR A. K. et al. WHO Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 9, 2017

FEMIANO, F.; GOMBOS, F.; SCULLY, C. Oral proliferative verrucous leukoplakia (PVL); open trial of surgery compared with combined therapy using surgery and methisoprinol in papillomavirus-related PVL. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 30, n. 4, p. 318-322, 2001.

FLORES, Isadora Luana et al. Low expression of angiotensinogen and dipeptidyl peptidase 1 in saliva of patients with proliferative verrucous leukoplakia. **World journal of clinical cases**, v. 4, n. 11, p. 356, 2016.

GANDOLFO, Sergio; CASTELLANI, Roberto; PENTENERO, Monica. Proliferative verrucous leukoplakia: a potentially malignant disorder involving periodontal sites. **Journal of periodontology**, v. 80, n. 2, p. 274-281, 2009.

GANESH, DIVYA et al. Potentially Malignant Oral Disorders and Cancer Transformation. **Anticancer research**, v. 38, n. 6, p. 3223-3229, 2018.

GE, Lin et al. Case report of rapidly progressive proliferative verrucous leukoplakia and a proposal for aetiology in mainland China. **World journal of surgical oncology**, v. 9, n. 1, p. 26, 2011.

GILLENWATER, Ann M. et al. Proliferative verrucous leukoplakia: recognition and differentiation from conventional leukoplakia and mimics. **Head & neck**, v. 36, n. 11, p. 1662-1668, 2014.

GILLENWATER, Ann M. et al. Proliferative verrucous leukoplakia (PVL): a review of an elusive pathologic entity!. **Advances in anatomic pathology**, v. 20, n. 6, p. 416-423, 2013.

GILLETTE, Michael A.; CARR, Steven A. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. **Nature methods**, v. 10, n. 1, p. 28, 2013.

GISSI, Davide Bartolomeo et al. Podoplanin expression as a predictive marker of dysplasia in oral leukoplakia. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 5, p. 759-764, 2018.

GLASER, Christoph M. et al. Impact of hemoglobin level and use of recombinant erythropoietin on efficacy of preoperative chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. **International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics**, v. 50, n. 3, p. 705-715, 2001.

GOUVÊA, Adriele F. et al. High incidence of DNA ploidy abnormalities and increased M cm2 expression may predict malignant change in oral proliferative verrucous leukoplakia. **Histopathology**, v. 62, n. 4, p. 551-562, 2013.

GOUVÊA, Adriele Ferreira et al. Clinicopathological features and immunohistochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 6, p. 447-452, 2010.

GOUVEA, Adriele Ferreira et al. Proliferative verrucous leukoplakia, squamous cell carcinoma and axillary metastasis. **Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal**, 2010.

GOUVÊA, Adriele Ferreira et al. Leucoplasia verrucosa proliferativa: revisão da literatura deste tipo agressivo de leucoplasia oral. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent**, v. 64, n. 1, p. 59-64, 2010.

HAMM, Alexander et al. Frequent expression loss of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH) genes in multiple human solid tumors: a systematic expression analysis. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 25, 2008.

HANSEN, Louis S.; OLSON, James A.; SILVERMAN, Sol. Proliferative verrucous leukoplakia: A long-term study of thirty patients. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 60, n. 3, p. 285-298, 1985.

HEAWCHAIYAPHUM, Chukkris et al. Peroxiredoxin-2 and zinc-alpha-2-glycoprotein as potentially combined novel salivary biomarkers for early detection of oral squamous cell carcinoma using proteomic approaches. **Journal of proteomics**, v. 173, p. 52-61, 2018.

HEBERLE, Henry et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 169, 2015.

HUANG, Dandan et al. Rho GDP-dissociation inhibitor  $\alpha$  is a potential prognostic biomarker and controls telomere regulation in colorectal cancer. **Cancer science**, v. 108, n. 7, p. 1293-1302, 2017.

HUBER, Michael A.; TANTIWONGKOSI, Bundhit. Oral and oropharyngeal cancer. **Medical Clinics**, v. 98, n. 6, p. 1299-1321, 2014.

HUBER, Michael A. White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: facts and controversies. **Clinics in dermatology**, v. 28, n. 3, p. 262-268, 2010.

JOHNSON, Newell W.; JAYASEKARA, Prasanna; AMARASINGHE, AA Hemantha K. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Periodontology 2000**, v. 57, n. 1, p. 19-37, 2011.

JUNG, Young Ju et al. Development of a Protein Biomarker Panel to Detect Non-Small-Cell Lung Cancer in Korea. **Clinical lung cancer**, v. 18, n. 2, p. e99-e107, 2017.

KAWAHARA, Rebeca et al. Integrative analysis to select cancer candidate biomarkers to targeted validation. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43635, 2015.

KAWAHARA, Rebeca et al. Agrin and perlecan mediate tumorigenic processes in oral squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e115004, 2014.

KELSTRUP, Christian D. et al. Performance evaluation of the Q exactive HF-X for shotgun proteomics. **Journal of proteome research**, v. 17, n. 1, p. 727-738, 2017.

KHARMA, Mohamed Yasser; TARAKJI, Basal. Current evidence in diagnosis and treatment of proliferative verrucous leukoplakia. **Annals of Saudi medicine**, v. 32, n. 4, p. 412-414, 2012.

KUDARHA, Ritu R.; SAWANT, Krutika K. Albumin based versatile multifunctional nanocarriers for cancer therapy: fabrication, surface modification, multimodal therapeutics and imaging approaches. **Materials Science and Engineering: C**, v. 81, p. 607-626, 2017.

KULESHOV, Maxim V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W90-W97, 2016.

KUMAR, Prashant et al. Highly sensitive and specific novel biomarkers for the diagnosis of transitional bladder carcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 13539, 2015.

LEMAŃSKA-PEREK, A. et al. Potential plasma biomarkers of bladder cancer identified by proteomic analysis: A pilot study. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, 2018.

LI, Chengjing et al. Overexpression of MARCKS indicates a poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. **Oncology letters**, v. 16, n. 4, p. 5498-5504, 2018.

LOPES, Marcio Ajudarte et al. Proliferative verrucous leukoplakia may initially mimic lichenoid reactions. **World Journal of Clinical Cases: WJCC**, v. 3, n. 10, p. 861, 2015.

MALAMUD, Daniel. Saliva as a diagnostic fluid. **Dental Clinics**, v. 55, n. 1, p. 159-178, 2011.

MALIK, M. et al. Verrucous hyperplasia, proliferative verrucous leukoplakia and verrucous carcinoma-A diagnostic dilemma-Case report. **J Periodontal Med Clin Pract**, v. 1, p. 112-7, 2014.

MANDILI, Giorgia et al. Beta-2-glycoprotein-1 and alpha-1-antitrypsin as urinary markers of renal cancer in von Hippel–Lindau patients. **Biomarkers**, v. 23, n. 2, p. 123-130, 2018.

MONTERO, Pablo H.; PATEL, Snehal G. Cancer of the oral cavity. **Surgical Oncology Clinics**, v. 24, n. 3, p. 491-508, 2015.

MÜLLER, Susan. Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, 2018.

MUNDE, Anita et al. Proliferative verrucous leukoplakia: An update. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 469, 2016.

MÜNSCHER, Adrian et al. Survivin expression in head and neck squamous cell carcinomas is frequent and correlates with clinical parameters and treatment outcomes. **Clinical oral investigations**, p. 1-7, 2018.

NAGLER, Rafael et al. Concomitant analysis of salivary tumor markers—a new diagnostic tool for oral cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 13, p. 3979-3984, 2006.

NARUSE, Tomofumi et al. Cetuximab for the treatment of locally advanced and recurrent/metastatic oral cancer: An investigation of distant metastasis. **Molecular and clinical oncology**, v. 5, n. 2, p. 246-252, 2016.

NASSER, Wasim et al. Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for malignant progression of oral leukoplakias. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 8, p. 629-635, 2011.

NISHIO-NAGAI, Mayako et al. Adoptive immunotherapy combined with FP treatment for head and neck cancer: An in vitro study. **International journal of oncology**, v. 51, n. 5, p. 1471-1481, 2017.

NOBRE, Camila Cristina Guimarães et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Biological activities and relation with cancer. **Pathology & Oncology Research**, v. 23, n. 2, p. 235-244, 2017.

NÚÑEZ, Cristina. Blood-based protein biomarkers in breast cancer. **Clinica Chimica Acta**, 2018.

PARK, Heung-Chul; KIM, Moon-Young; KIM, Chul-Hwan. C-reactive protein/albumin ratio as prognostic score in oral squamous cell carcinoma. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 42, n. 5, p. 243-250, 2016.

PARKIN, D. Max et al. Global cancer statistics, 2002. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.

PARLATESCU, Ioanina et al. Oral leukoplakia—An update. **Maedica**, v. 9, n. 1, p. 88, 2014.

PENTENERO, Monica et al. Oral proliferative verrucous leucoplakia: are there particular features for such an ambiguous entity? A systematic review. **British Journal of Dermatology**, v. 170, n. 5, p. 1039-1047, 2014.

PICOTTI, Paola; AEBERSOLD, Ruedi. Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. **Nature methods**, v. 9, n. 6, p. 555, 2012.

POERSCH, Aline et al. A proteomic signature of ovarian cancer tumor fluid identified by highthroughput and verified by targeted proteomics. **Journal of proteomics**, v. 145, p. 226-236, 2016.

POVEDA-RODA, Rafael et al. Retinoids and proliferative verrucous leukoplakia (PVL). A preliminary study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 1, p. e3-9, 2010.

PRASAD, Ramnarayan Belur Krishna; SHARMA, Akhilesh; BABU, Harsha Mysore. An insight into salivary markers in oral cancer. **Dental research journal**, v. 10, n. 3, p. 287, 2013.

QI, Xuanchang; LI, Xuechang; SUN, Xiuxia. Reduced expression of polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in nasopharyngeal carcinoma and its correlation with prognosis. **Tumor Biology**, v. 37, n. 8, p. 11099-11104, 2016.

RIVERA, César et al. Agrin has a pathological role in the progression of oral cancer. **British journal of cancer**, p. 1, 2018.

RIVERA, César. Essentials of oral cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 9, p. 11884, 2015.

SARJEANT, Jennifer M. et al. Apolipoprotein D Inhibits Platelet-Derived Growth Factor-BB–Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferated by Preventing Translocation of Phosphorylated Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2 to the Nucleus. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 12, p. 2172-2177, 2003.

SASAKI, Yasushi et al. p53 family members regulate the expression of the apolipoprotein D gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 2, p. 872-883, 2009.

SEARLE, Brian C. Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. **Proteomics**, v. 10, n. 6, p. 1265-1269, 2010.

SEKIKAWA, Shoichi et al. Underexpression of  $\alpha$ -1-microglobulin/bikunin precursor predicts a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. **International journal of oncology**, 2018.

SELLECK, Matthew J.; SENTHIL, Maheswari; WALL, Nathan R. Making meaningful clinical use of biomarkers. **Biomarker insights**, v. 12, p. 1177271917715236, 2017.

SHAN, Jing et al. Discovery and preclinical validation of proteomic biomarkers in saliva for early detection of oral squamous cell carcinomas. **Oral diseases**, v. 25, n. 1, p. 97-107, 2019.

SHAO, Qian-Qian et al. Filamin A: Insights into its exact role in cancers. **Pathology & Oncology Research**, v. 22, n. 2, p. 245-252, 2016.

SHEN, Jianqiao et al. Spectral Library Search Improves Assignment of TMT Labeled MS/MS Spectra. **Journal of proteome research**, v. 17, n. 9, p. 3325-3331, 2018.

SILVERMAN, Sol; GORSKY, Meir. Proliferative verrucous leukoplakia: a follow-up study of 54 cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 84, n. 2, p. 154-157, 1997.

SRIDHARAN, Gokul et al. Serum metabolomics in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 13, n. 3, p. 556, 2017.

STASIKOWSKA-KANICKA, Olga; WAŹGROWSKA-DANILEWICZ, Małgorzata; DANILEWICZ, Marian. CD8+ and CD163+ infiltrating cells and PD-L1 immunoexpression in oral leukoplakia and oral carcinoma. **Apmis**, v. 126, n. 9, p. 732-738, 2018.

TIMMS, John F. et al. Discovery of serum biomarkers of ovarian cancer using complementary proteomic profiling strategies. **PROTEOMICS–Clinical Applications**, v. 8, n. 11-12, p. 982-993, 2014.

THOMPSON, Andrew et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1895-1904, 2003.

THOMSON, P. J.; GOODSON, M. L.; SMITH, D. R. Profiling cancer risk in oral potentially malignant disorders—A patient cohort study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 10, p. 888-895, 2017.

VAN DIJK, Willem et al. The plasma lipocalins  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, apolipoprotein D, apolipoprotein M and complement protein C8 $\gamma$ . 2013.

VAN ROY, Frans; BERX, Geert. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and molecular life sciences**, v. 65, n. 23, p. 3756-3788, 2008.

WANG, Hao et al. Serum peptidome profiling for the diagnosis of colorectal cancer: discovery and validation in two independent cohorts. **Oncotarget**, v. 8, n. 35, p. 59376, 2017.

WANG, Yuxuan et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. **Science translational medicine**, v. 7, n. 293, p. 293ra104-293ra104, 2015.

WANG, Qihui et al. The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. **Scientific reports**, v. 4, p. 6802, 2014.

WARNAKULASURIYA, S1; JOHNSON, Newell W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 36, n. 10, p. 575-580, 2007.

WASINGER, Valerie C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 1, p. 1090-1094, 1995.

WU, Xiangbing et al. Transglutaminase 3 contributes to malignant transformation of oral leukoplakia to cancer. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 104, p. 34-42, 2018.

YE, Qidong et al. Downregulation of PDia3 inhibits proliferation and invasion of human acute myeloid leukemia cells. **OncoTargets and therapy**, v. 11, p. 2925, 2018.

ZHANG, Xiaoqi et al. application of weighted gene co-expression network analysis to identify key modules and hub genes in oral squamous cell carcinoma tumorigenesis. **OncoTargets and therapy**, v. 11, p. 6001, 2018.

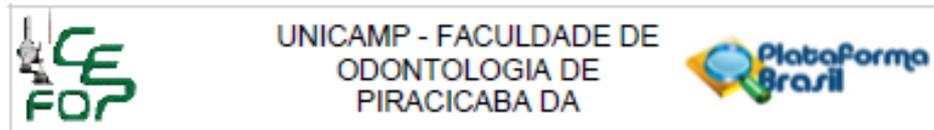
ZHONG, Liang et al. Biomarkers: paving stones on the road towards the personalized precision medicine for oral squamous cell carcinoma. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 911, 2018.

ZIA, Mohammad Khalid et al. Interaction of anti-cancer drug-cisplatin with major proteinase inhibitor-alpha-2-macroglobulin: Biophysical and thermodynamic analysis. **International journal of biological macromolecules**, v. 116, p. 721-727, 2018.

ZINI, Avraham; CZERNINSKI, Rakefet; SGAN-COHEN, Harold D. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 39, n. 4, p. 299-305, 2010.

## ANEXOS

### Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo do perfil clínico, histopatológico e busca de proteínas marcadoras associadas à progressão de Leucoplasia Verrucosa Proliferativa para Carcinoma de Células Escamosas

**Pesquisador:** RACHEL LAMARCK

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 74725417.1.0000.5418

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.453.631

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo clínico e in situ, com etapa transversal e etapa longitudinal e retrospectiva, que utilizará material coletado a fresco (Orocentro) e material de arquivo e envolverá pacientes do Orocentro da FOP. Como critérios de inclusão foram descritos: pacientes de ambos os sexos que apresentem Leucoplasia Oral, Leucoplasia Verrucosa Proliferativa ou CEC e que estejam com a lesão presente na boca no momento da coleta das amostras. Como critério de exclusão: Pacientes com doenças autoimunes, metástases ou tumores que não sejam Carcinoma Espinocelular. EM UMA ETAPA serão coletadas amostras de saliva, sangue, lágrima e biópsia DE UM GRUPO de 15 pacientes provenientes do Orocentro da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), sendo 5 de pacientes com Leucoplasia Oral, 5 de pacientes com Leucoplasia Verrucosa Proliferativa e 5 de pacientes com Carcinoma de Células Escamosas derivados de LVP ou não. De OUTRO GRUPO será coletada a saliva de pacientes saudáveis que venham para primeira consulta. As amostras serão conservadas e levadas para o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), onde serão preparadas, marcadas com TMT e, em seguida, será realizada a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas. A COLETA DE SALIVA será feita preferencialmente entre as nove e onze da manhã, o paciente deverá estar a uma hora no mínimo de jejum, sem realizar higiene bucal, fumar e sem beber nada além de água. Os pacientes serão instruídos a lavar a boca com 5 mL de água potável e coletar a saliva em tubo de 50 mL estéril, cinco minutos após o procedimento de

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
 Bairro: Areião CEP: 13.414-003  
 UF: SP Município: PIRACICABA  
 Telefone: (19)2108-5349 Fax: (19)2108-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 2.453.631

lavagem da boca (Yoshizawa & Wong, 2013). Após a coleta, a saliva será imediatamente colocada em gelo seco e transportada para freezer – 80 °C para armazenamento e futuro procedimento de extração de proteínas. A COLETA DE LÁGRIMAS será realizada com o uso de pipeta calibrada e ponteira de 20 µl contendo soro fisiológico. Inicialmente 20 µl de soro serão depositados na região de carúncula lacrimal sem entrar em contato direto com o olho e colhidos na região de pálpebra inferior sem contato direto com o olho, o processo será repetido mais uma vez e todo o líquido colhido será imediatamente colocado em gelo seco e transportado para freezer – 80 °C para armazenamento e futuro procedimento de extração de proteínas. A COLETA DE SANGUE será feita a vácuo com punção venosa periférica superficial de veias localizadas nos membros superiores. O sangue será coletado em 4 tubos de 4,5 mL cada, contendo citrato de sódio 3,2 % (Tubo vácuo coleta sangue, citrato de sódio, 4,5ML cod. 369714, marca: BD), e as amostras serão centrifugadas a aproximadamente 600g por 10 minutos a temperatura ambiente para separação de fases, a fração contendo o plasma será alíquotada em tubos de 2 mL e armazenadas em freezer 80 °C. O plasma será processado conforme descrito em detalhes no projeto. A coleta de tecido e preparo das lâminas: Os tecidos serão coletados em biópsias de aproximadamente 0,4 – 0,6 cm e logo após congelados a – 80 °C. A inclusão das amostras será feita 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. As amostras serão mantidas em Isopor com gelo seco a -78° C durante todo o processo de inclusão. Após, cortes de 8 µm de espessura serão realizados em um criostato portátil (Leica Microsystem) a -20° C. Lâminas de vidro com membrana plástica para o sistema Arcturus de ML (Arcturus PEN Membrane Glass Slides) (Life Technologies) serão empregadas para montagem dos cortes. Todas as lâminas serão imediatamente estocadas em uma caixa plástica a -80° C. A seguir serão preparadas as lâminas para microdissecação a laser e será realizada a microdissecação das amostras. As amostras de saliva serão analisadas por proteômica quantitativa, com marcação isóbara com TMT (tandem mass tags). Haverá o fracionamento em fase reversa de pH básico e a análise por Espectrometria de massas. Os dados brutos provenientes da análise por LC-MS/MS das amostras dos 63 pacientes selecionados para este estudo serão processados pelo programa MaxQuant v1.3.0.3 (Cox e Mann, 2008) e os espectros MS/MS serão submetidos à busca contra o banco de dados Human Uniprot (download em maio de 2017, com 92646 sequências e 36874315 resíduos) por meio da ferramenta Andromeda (Cox et al, 2011), com uma tolerância de massas de 20 ppm para ions precursoros e de 0,5 Da para ions fragmentos para a identificação de proteínas e no máximo uma perda de dois sítios de clivagens. Em OUTRA ETAPA, um estudo clínico e histopatológico, serão selecionados 30

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
Bairro: Areião CEP: 13.414-903  
UF: SP Município: PIRACICABA  
Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 2.453.631

pacientes, provenientes do Orocentro da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, que possuem diagnóstico de LVP atualmente, contudo, foram previamente diagnosticados com líquen plano/reação líquenóide/lesão líquenóide e que, ao longo do acompanhamento clínico, apresentaram modificações das lesões orais levando à suspeita clínica diagnóstica de LVP. Além disso, serão coletados dos prontuários clínicos dados como gênero, idade e hábitos de tabagista e etilismo, quando presentes. Para ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, bem como da evolução das lesões, serão utilizadas imagens fotográficas que serão organizadas de acordo com a cronologia das consultas, de modo que possa abranger a evolução da doença. As imagens então, serão enviadas a dois estomatologistas experientes, que não terão acesso a qualquer informação a respeito do paciente, para que sugiram o diagnóstico clínico baseado nas imagens fotográficas. De cada paciente selecionado serão enviados dois conjuntos de fotografias. O conjunto A, será um painel de fotos da lesão no momento do diagnóstico inicial. O conjunto B será um painel de fotos da lesão no momento da última consulta realizada. Porém, os avaliadores não terão conhecimento que tais conjuntos de fotos pertencem ao mesmo paciente e tampouco a ordem cronológica das fotografias, para que as sugestões diagnósticas sejam independentes destes fatores. Para ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS, do mesmo modo, serão levantadas as imagens microscópicas de biópsias realizadas, que serão enviadas a dois patologistas experientes para que eles sugiram o diagnóstico baseado nos achados histopatológicos também em dois momentos: na primeira biópsia e na mais recente. De forma semelhante, os dois avaliadores não terão conhecimento de que duas imagens microscópicas possam pertencer ao mesmo paciente. Além da avaliação clínica e histopatológica, também será observado o tempo de evolução médio que tais lesões líquenóides levam para sofrer modificação até se tornarem fortemente sugestivas de LVP. A análise estatística será feita utilizando os testes de qui-quadrado, análise de variância e regressão logística. A pesquisa será realizada no Orocentro da FOP (coleta de amostras), no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio do CNPEM, Campinas) (processamento de amostras) e na área de Semiologia da FOP-UNICAMP (demais etapas). O cronograma previsto para a pesquisa será executado após a aprovação do protocolo pelo Sistema CEP/CONEP é de 24 meses, como descrito no projeto. A capa do protocolo lista como pesquisadores Rachel Lamarck (pesquisadora responsável), Patrícia Maria Fernandes, César Rivera Martínez, Tatiane De Rossi Mazo, Rute Alves Pereira e Costa, Márcio Ajudarte Lopes, Adriana Franco Paes Leme, com os dados de identificação, link para CV Lattes e a contribuição específica de cada pesquisador para o projeto e posterior publicação. Os mesmos pesquisadores assinam a declaração dos pesquisadores e estão listados na PB. Pendência 01 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores ajustaram a PB e

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
Bairro: Areião CEP: 13.414-003  
UF: SP Município: PIRACICABA  
Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br



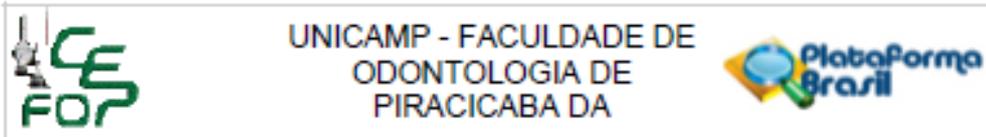
UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA



Continuação do Parecer: 2.453.631

reapresentaram a FR e o projeto ajustados, Informando que haverá 45 participantes na pesquisa. Pendência 02 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que esperam participantes com idades acima de 40 e distribuição por sexo variável conforme a característica específica das doenças estudadas, sem determinação pelo pesquisador (distribuição natural). Pendência 03 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que haverá etapa longitudinal de caráter retrospectivo e etapa transversal, em duas etapas, uma com intervenção clínica (biópsias, coleta de sangue, saliva e lágrimas) e outra em que haverá avaliação de características clínicas e histopatológicas de material de arquivo. Pendência 04 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que haverá etapa longitudinal de caráter retrospectivo e etapa transversal, em duas etapas, uma com intervenção clínica (biópsias, coleta de sangue, saliva e lágrimas) e outra em que haverá avaliação de características clínicas e histopatológicas de material de arquivo. Alguns participantes podem estar em ambas as etapas, se as lesões detectadas na primeira etapa forem compatíveis com os critérios de inclusão na segunda. Pendência 05 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que o número de participantes será de cerca de 45, 15 na primeira etapa, 30 na segunda. Pendências 06 e 07 (atendidas)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que o grupo saudável foi inserido no texto de forma equivocada, não haverá tal grupo na pesquisa, e o projeto foi modificado e reapresentado. Pendência 08 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que os dois estomatologistas experientes que participarão da pesquisa como avaliadores voluntários são professores universitários e não serão avaliadores pagos. Pendência 09 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que os dois patologistas experientes que participarão da pesquisa como avaliadores voluntários são professores universitários e não serão avaliadores pagos. Pendência 10 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que as amostras de saliva e lágrimas serão coletadas pela aluna de mestrado Rachel que recebeu treinamento prévio no Orocentro. As biópsias serão feitas pelos alunos de Estomatologia do Orocentro que já receberam treinamento prévio para biópsias e a amostra de sangue será retirada pela enfermeira responsável pelo ambulatório da FOP; e o projeto foi modificado e reapresentado. Pendência 11 (atendida)- Em resposta de 21/11/17 os pesquisadores informaram que "o projeto apresentado faz a correlação estatística entre os resultados obtidos e interpretação dos resultados até o dia 19/12/2018, porém ainda será feita a seguinte etapa: redação do relatório final e artigos científicos que vai de 20/12/2018 até 02/01/2019. As datas foram ajustadas na PB conforme orientações acima". A pesquisa terá duração de 24 meses, sendo 12 de etapas preparatórias e 12 a partir da coleta de amostras

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
 Bairro: Areião CEP: 13.414-903  
 UF: SP Município: PIRACICABA  
 Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.453.631

(descrição no arquivo projeto). Na PB a informação presente lista 21/08/2017 como data de início da pesquisa (etapas preliminares) e 02/01/2018 (coleta de amostras e dados) e término em 19/12/2018, em um total de 12 meses após o início da etapa de coleta de amostras. Pendência 12 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores apresentaram o arquivo "projeto" com o resumo no formato estruturado. O arquivo "projeto" ajustado de acordo com a resposta às pendências foi apresentado.

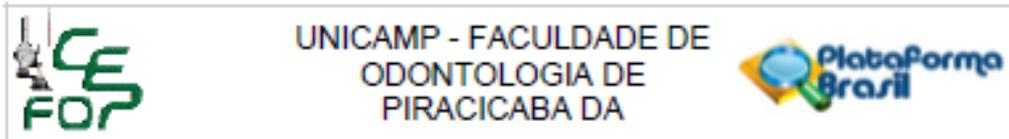
**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo geral desse estudo é comparar o perfil proteômico de pacientes com Leucoplasia Verrucosa Proliferativa, Leucoplasia Oral e CEC derivado de LVP ou não para buscar proteínas comuns encontradas em CEC, podem estar ligadas ao potencial de transformação maligna da lesão. São objetivos específicos: Traçar um perfil proteômico de pacientes com Leucoplasia Verrucosa Proliferativa para detecção de proteínas específicas da LVP para prováveis biomarcadores e possibilitar um diagnóstico precoce e objetivo para que haja um controle da doença em estágios iniciais; Comparar as proteínas encontradas em lesões de Leucoplasia Oral, Leucoplasia Verrucosa Proliferativa e Carcinoma de Células Escamosas para traçar um perfil longitudinal da doença, um padrão de desenvolvimento; Comparar os CECs derivados de LVP e não derivados de LVP para entender os possíveis fatores associados a seu desenvolvimento; Encontrar proteínas que possam estar ligadas ao potencial de transformação maligna ao comparar com os CECs desenvolvidos a partir de LVPs. Revisar o aspecto clínico e microscópico de lesões bucais de pacientes antes diagnosticados com líquen plano e que, posteriormente, desenvolveram novas áreas de lesões leucoplásicas, levando à suspeita diagnóstica de LVP.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os pesquisadores citaram que "O estudo será baseado, em parte, em dados clínicos e histopatológicos já obtidos em consultas e cirurgias pregressas com o objetivo de alcançar o diagnóstico, neste contexto, não há previsão de riscos e desconfortos. No caso das coletas de saliva, sangue e lágrima, os pacientes estarão expostos aos riscos e desconfortos inerentes à técnica". Pendência 13 (Atendida)- Em resposta de 21/11/17 os pesquisadores reapresentaram o arquivo "comentários" com algum grau de ajuste, reconhecendo que existem riscos e desconfortos potenciais aos participantes. Ainda que persista a abordagem sumária, pelo menos os pesquisadores admitem a realidade da possibilidade de riscos e desconfortos variados aos participantes. Pendência 14 (atendida)- Em resposta de 21/11/17 os pesquisadores reapresentaram o arquivo "comentários" com o devido ajuste do item "benefícios esperados", que traça perfil bastante equilibrado da perspectiva de benefícios pela realização da pesquisa: "O

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
 Bairro: Areião CEP: 13.414-903  
 UF: SP Município: PIRACICABA  
 Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br



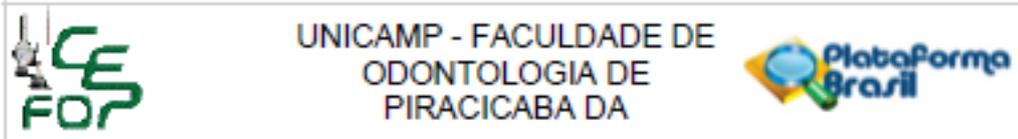
Continuação do Parecer: 2.453.631

estudo visa benefícios em enriquecer a literatura e a comunidade científica com novas diretrizes em termos de diagnóstico precoce e prognóstico das leucoplasias verrucosas proliferativas. Em termos de benefícios diretos os dados serão compartilhados com os clínicos e alunos que atendem no Orocentro, possibilitando melhorias no diagnóstico precoce. Os resultados poderão ter potencial de uso clínico para os participantes com lesões benignas com potencial de malignização no sentido de possibilitar um melhor conhecimento sobre o prognóstico, os resultados poderão ser apresentados no retorno do paciente ao Orocentro". As modificações foram refletidas no texto do TCLE, que foi ajustado e reapresentado.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores informaram que "A obtenção do TCLE será realizada quando o paciente comparecer ao acompanhamento clínico. Nesta ocasião ele será informado sobre a existência da pesquisa e receberá maiores explicações e esclarecimentos sobre o estudo, bem como para recolhida das assinaturas pertinentes para permissão da análise do material, deixando claro que as despesas de transporte e quaisquer outras despesas eventuais que o paciente possa ter em virtude da pesquisa serão ressarcidas". Segundo os pesquisadores não haverá participação de grupos vulneráveis na pesquisa ("Na amostra desta pesquisa não serão considerados indivíduos menores de idade ou com quaisquer problemas mentais que possam interferir no julgamento do paciente"), mas reconhecem que existe algum grau de vulnerabilidade no grupo de pacientes com lesões malignas ("pacientes oncológicos podem ser considerados vulneráveis devido ao seu estado psicológico") e deixam claro que não utilizarão esta vulnerabilidade relativa contra os interesses do participante. Os pesquisadores garantiram o sigilo dos dados que possibilitem a identificação dos participantes. Os pesquisadores informaram que não há "risco previsível pela participação na pesquisa e, por consequência", não há "previsão de indenização e/ou reparação de dano". Não foram estabelecidos critérios para suspensão ou encerramento precoce da pesquisa. Pendência 15 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram no arquivo "comentários" que "a aplicação do TCLE será realizada a todos os pacientes que se enquadrem no estudo e aceitem participar da pesquisa. A obtenção do TCLE será realizada quando o paciente comparecer ao acompanhamento clínico". Pendência 16 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que os participantes receberão informação sobre a pesquisa como forma de reduzir ansiedade e que serão utilizadas as boas técnicas e procedimentos de biossegurança para reduzir desconforto e risco durante os procedimentos de coleta. Pendência 17 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que a pesquisa será realizada durante os procedimentos de rotina aos quais os participantes já serão submetidos e não serão geradas despesas extras

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
 Bairro: Areião CEP: 13.414-903  
 UF: SP Município: PIRACICABA  
 Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.453.631

pelo participação na pesquisa.

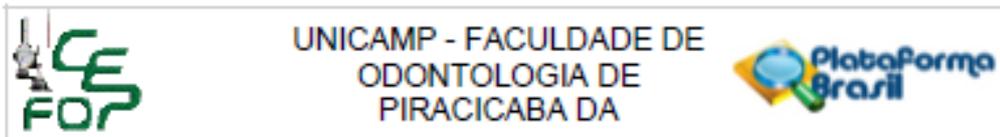
**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados a carta de envio, a declaração dos pesquisadores, a autorização para acesso ao arquivo de fichas do Orocentro. Pendência 18 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores apresentaram FR ajustada para 45, o número esperado de participantes. Pendência 19 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores apresentaram a declaração de acesso e uso do LNBio ajustada. Pendência 20 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores apresentaram a declaração da Instituição com a lista completa de pesquisadores (7 pesquisadores). Pendência 21 (atendida)- Em resposta de 22/10/17 os pesquisadores informaram que o valor citado no orçamento presente na PB (R\$ 500,00), que será bancado pelos pesquisadores, será utilizado para gastos eventuais e todo o material para a pesquisa já está disponível nos laboratórios e clínicas onde a pesquisa será realizada. Pendência 22 (atendida)- Em resposta de 14/12/17 os pesquisadores apresentaram o modelo ajustado de TCLE: A) (atendida) a linguagem foi simplificada, mas ainda precisa de simplificação adicional. B) (atendida) a descrição da metodologia ainda é muito econômica, mas pelo menos descreve as metodologias de Interesse para o participante. C) (atendida) a descrição de riscos e desconfortos foi ajustada ao par dos métodos empregados em cada grupo. D) (atendida) A descrição dos benefícios foi ajustada. E) atendida. A garantia de sigilo foi ajustada. F) (atendida) foi informado que não há previsão de ressarcimento pois a pesquisa será realizada em sincronia com as atividades de rotina do paciente. G) (atendida) Os itens obrigatórios foram incluídos.

**Recomendações:**

**RECOMENDAÇÃO 1-** Após a aprovação do protocolo de pesquisa os pesquisadores devem atentar para a necessidade de envio de relatórios parciais de atividade (no mínimo um a cada 12 meses) e do relatório final de atividade (ao término da pesquisa). **RECOMENDAÇÃO 2-** Reforça-se a necessidade do registro, na forma de Biorrepositórios ou Biobancos, dos materiais biológicos coletados que venham a ser estocados para uso futuro, tanto no projeto quanto na declaração dos pesquisadores e de registrar a intenção no TCLE que será assinado pelo participante. **RECOMENDAÇÃO 3-** Os pesquisadores devem atentar para a necessidade de aplicação de TCLE para coleta de amostras a serem estocadas em Biobancos e Biorrepositórios e para a necessidade de aplicação de novo TCLE quando da realização de novas pesquisas com o material estocado. **RECOMENDAÇÃO 4-** Pesquisas com dentes doados por profissionais de saúde ainda são toleradas em hipótese pelo CEP-FOP, mas os pesquisadores devem estar cientes de que esta solução dista do ideal ético de consulta direta ao participante por meio de TCLE específico da pesquisa ou da

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
 Bairro: Areião CEP: 13.414-903  
 UF: SP Município: PIRACICABA  
 Telefone: (19)2108-5349 Fax: (19)2108-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.453.631

obtenção dos dentes a partir de um Biobanco de dentes e que estas últimas situações deveriam ser escolhidas em substituição à primeira. **RECOMENDAÇÃO 5-** Destaca-se que o parecer consubstanciado é o documento oficial de aprovação do sistema CEP/CONEP e os certificados emitidos pela secretaria do CEP-FOP, a pedido, após a aprovação final do protocolo, só têm valor simbólico e devem ser evitados. **RECOMENDAÇÃO 6-** Intercorrências e eventos adversos devem ser relatados ao CEP-FOP por meio da PB. **RECOMENDAÇÃO 7-** Eventuais mudanças pretendidas no protocolo devem ser comunicadas como emendas ao CEP por meio da PB. **RECOMENDAÇÃO 8-** O parecer do CEP-FOP é fortemente baseado nos textos do protocolo encaminhado pelos pesquisadores e pode conter inclusive trechos transcritos literalmente do projeto ou de outras partes do protocolo. Trata-se, ainda assim, de uma interpretação do protocolo. Caso algum trecho do parecer não corresponda ao que efetivamente foi proposto no protocolo, os pesquisadores devem se manifestar sobre esta discrepância. A não manifestação dos pesquisadores será interpretada como concordância com a fidedignidade do texto do parecer no tocante à proposta do protocolo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há mais pendência por resolver.

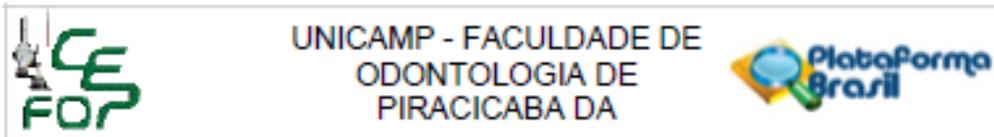
**Considerações Finais a critério do CEP:**

Parecer de aprovação de Protocolo emitido "ad referendum" conforme autorização do Comitê na reunião de 05/04/2017. Será submetido para homologação na reunião de 21/02/2018.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMações_BÁSICAS_DO_P ROJETO_982828.pdf	14/12/2017 16:02:43		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5TCLE.pdf	14/12/2017 16:02:13	RACHEL LAMARCK	Aceito
Outros	4comentarios.pdf	21/11/2017 14:02:07	RACHEL LAMARCK	Aceito
Outros	Respostaparecer.pdf	21/11/2017 14:01:11	RACHEL LAMARCK	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	62Declinst.pdf	09/10/2017 15:30:06	RACHEL LAMARCK	Aceito

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
 Bairro: Areião CEP: 13.414-003  
 UF: SP Município: PIRACICABA  
 Telefone: (19)2108-5349 Fax: (19)2108-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.453.631

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	3projeto.pdf	09/10/2017 14:01:31	RACHEL LAMARCK	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	64Decinfra.pdf	09/10/2017 13:26:39	RACHEL LAMARCK	Acelto
Folha de Rosto	1Folhaderosto.pdf	05/10/2017 16:55:22	RACHEL LAMARCK	Acelto
Outros	CEPcompleto.pdf	06/09/2017 12:16:14	Jacks Jorge Junior	Acelto
Outros	65Autarq.pdf	29/08/2017 14:21:51	RACHEL LAMARCK	Acelto
Declaração de Pesquisadores	91DecPesq.pdf	29/08/2017 14:19:02	RACHEL LAMARCK	Acelto
Outros	2cartadeenvio.pdf	29/08/2017 14:10:25	RACHEL LAMARCK	Acelto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PIRACICABA, 21 de Dezembro de 2017

---

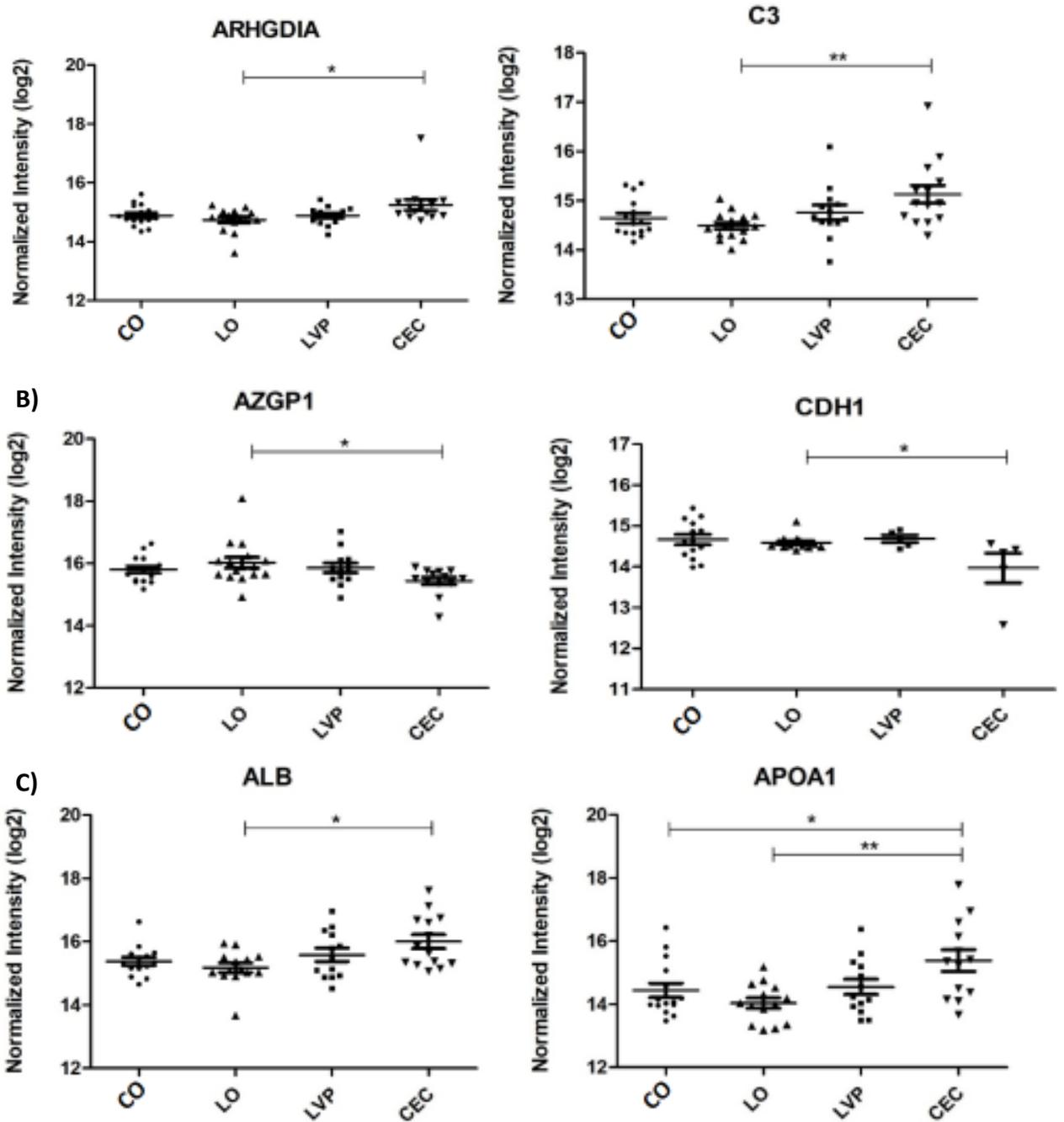
Assinado por:  
Jacks Jorge Junior  
(Coordenador)

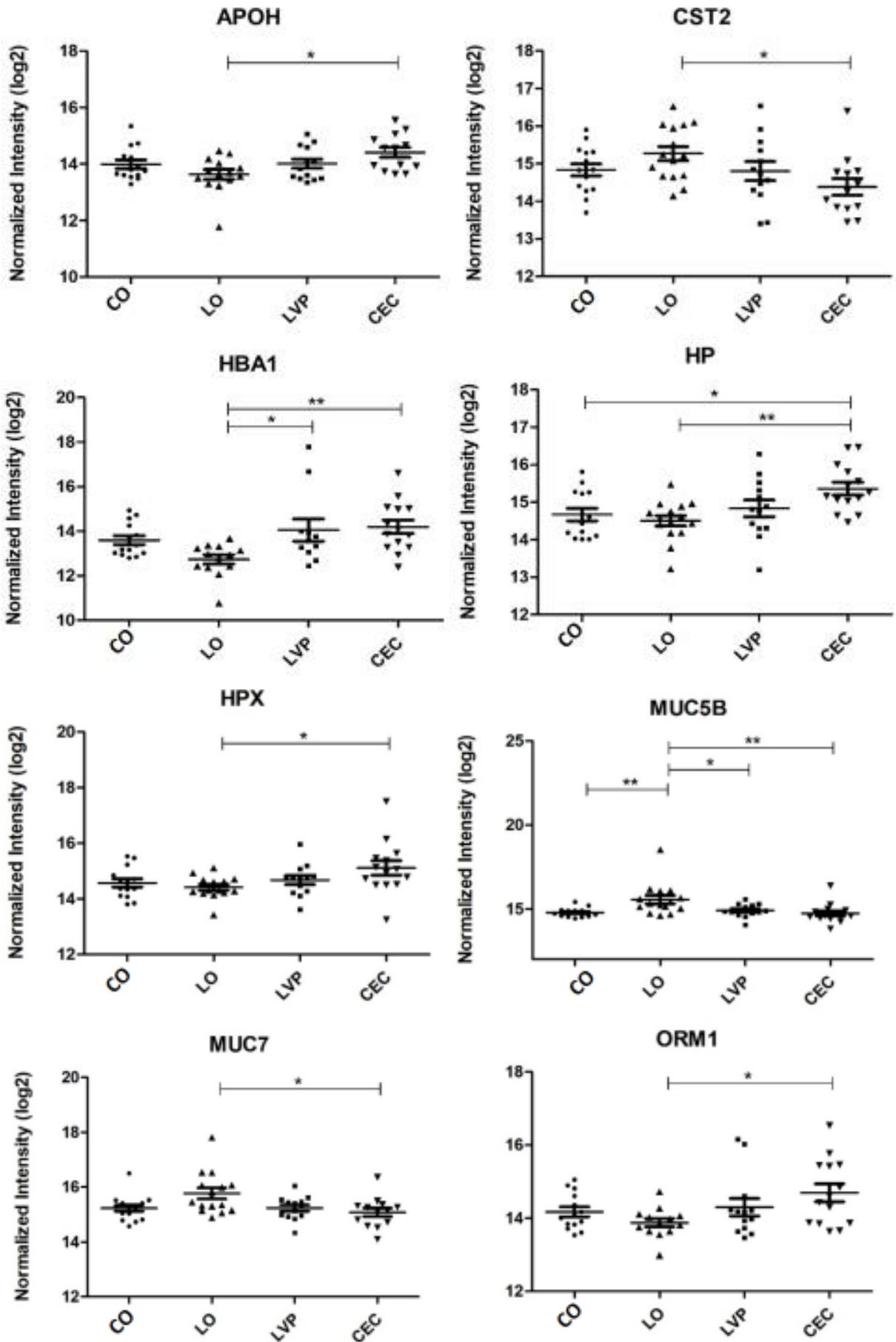
Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
Bairro: Areião CEP: 13.414-003  
UF: SP Município: PIRACICABA  
Telefone: (19)2108-5349 Fax: (19)2108-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br

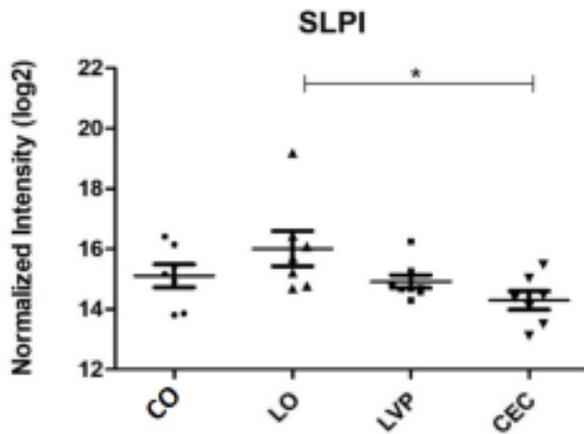
**Anexo 2 – Tabela 1 - Distribuição das amostras por tipo de lesão.**

Grupo Controle	Leucoplasia Verrucosa Proliferativa	Leucoplasia Oral	Carcinoma Espinocelular
N03	L04	O03	E04
N04	L07	O04	E05
N07	L08	O05	E06
N08	L09	O06	E07
N09	L10	O08	E08
N10	L15	O09	E10
N11	L16	O10	E11
N12	L17	O11	E12
N13	L18	O12	E13
N16	L19	O14	E14
N17	L20	O15	E16
N18	L21	O16	E17
N20	L22	O17	E19
N21		O18	E20
N23		O19	
		O20	

**Anexo 3** - Gráficos de dispersão das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos LO vs CEC.

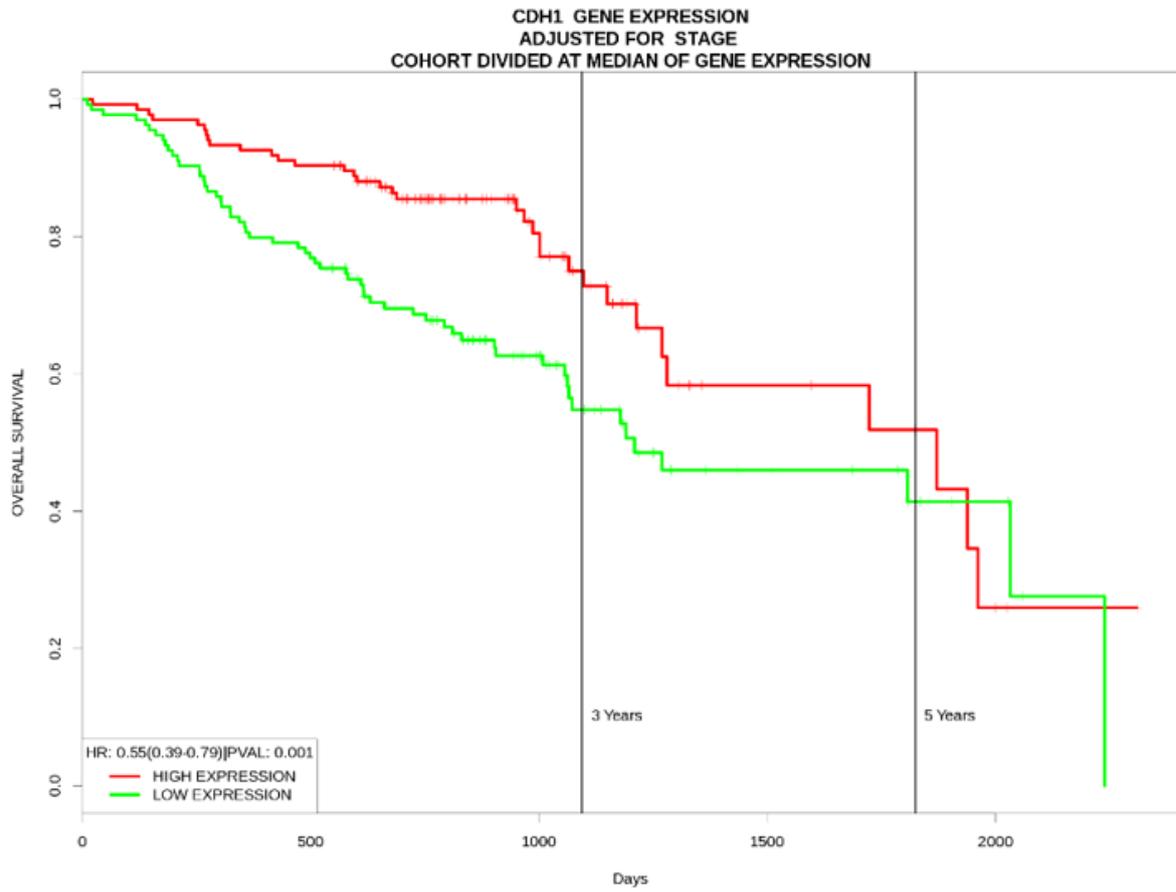


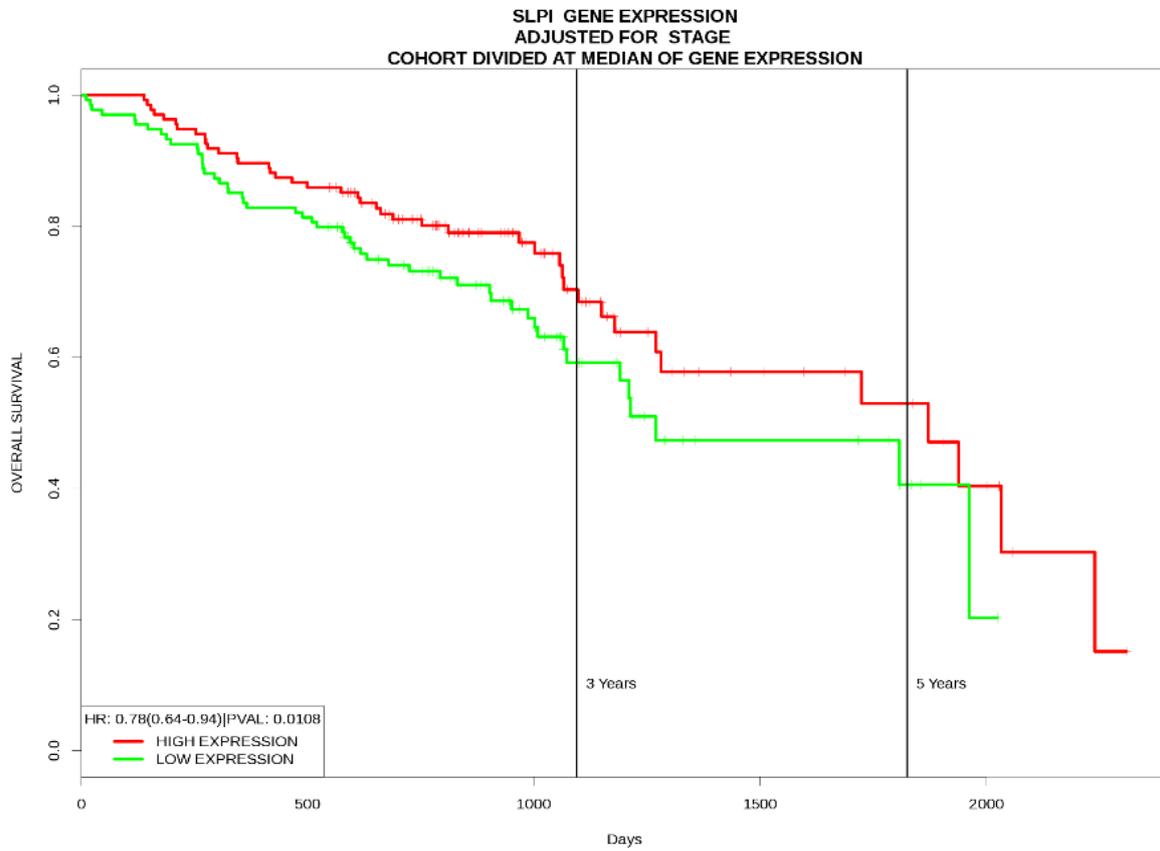
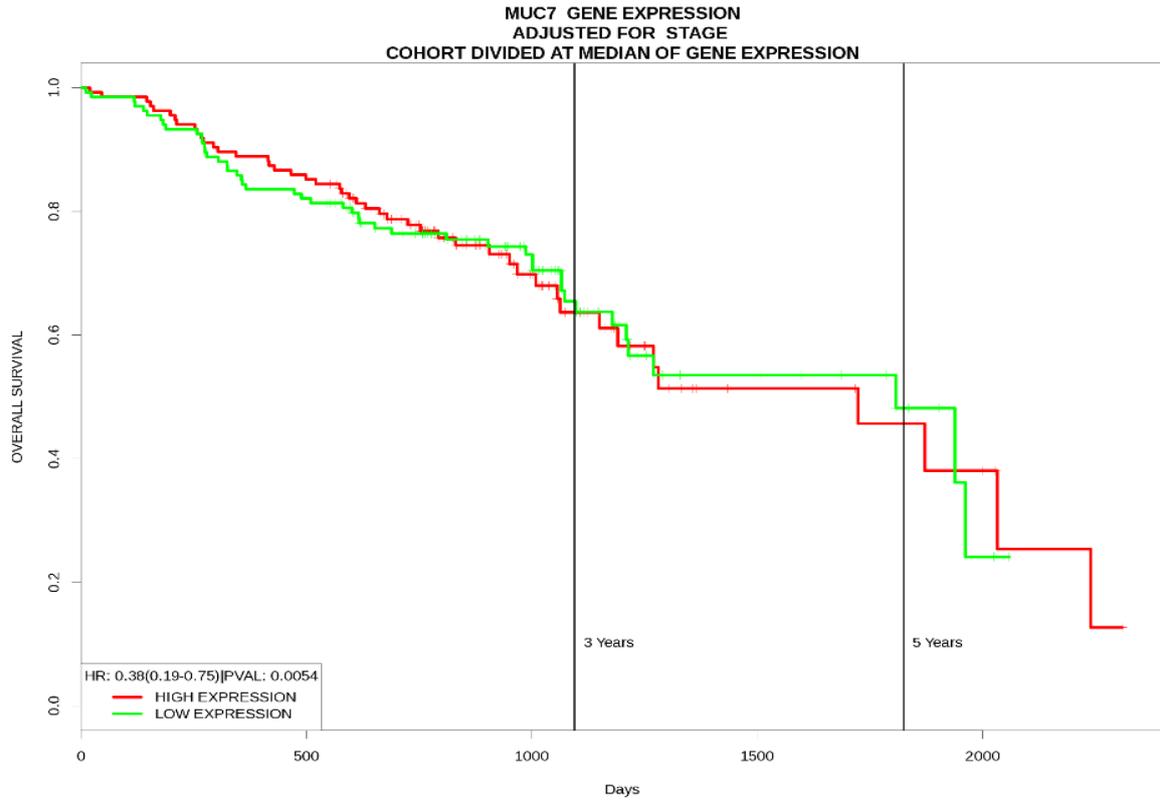


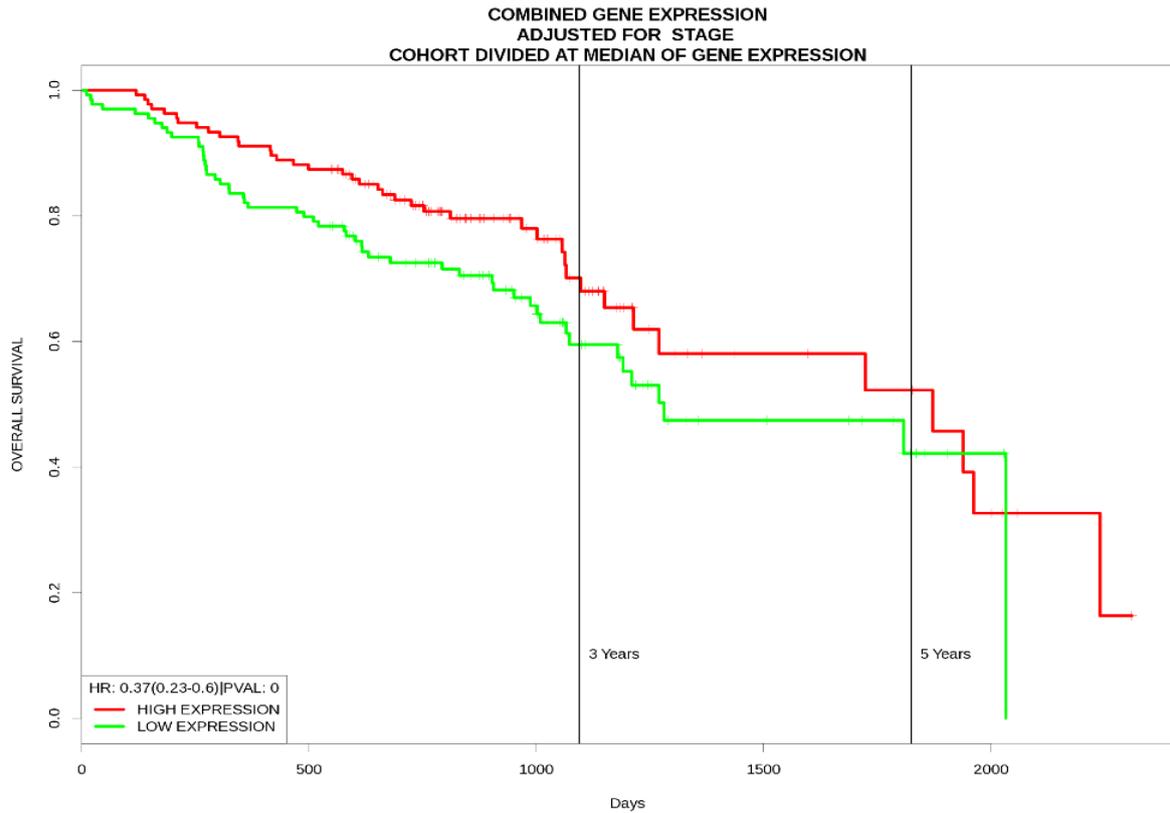


**Figura 9** – Gráficos de dispersão da intensidade normalizada em Log2 das proteínas com diferença estatisticamente significativa após pós-teste Tukey's honestly significant difference ( $p < 0,05$ ), entre o grupo LO e pacientes com CEC, demarcadas por asteriscos e separadas por perfis distintos onde A) ARHGDIA, C3 e FGA apresentam um aumento de intensidade crescente do grupo LO até o CEC, B) AZGP1 e CDH1 apresentam uma diminuição do grupo LO até o grupo CEC e C) ALB, APOA1, APOH, CST2, HBA1, HP, HPX, MUC5B, MUC7, ORM1 e SLPI apresentam padrões irregulares. A identidade das proteínas foi associada ao seu respectivo nome do gene.

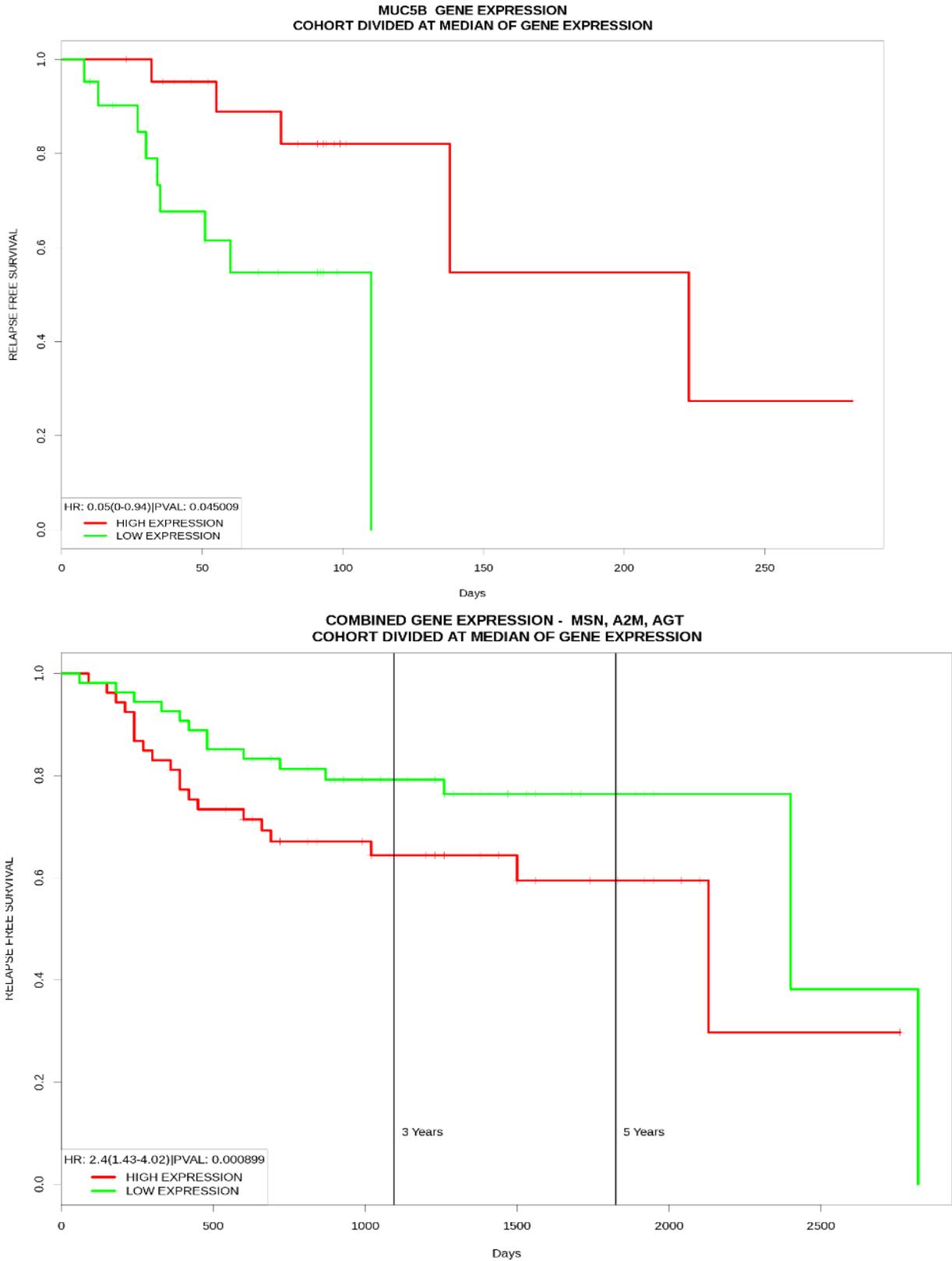
**Anexo 4 – Comparação dos grupos LO e LVP com bancos de dados de sobrevida geral, sobrevida livre de metástase e sobrevida livre de recorrências.**



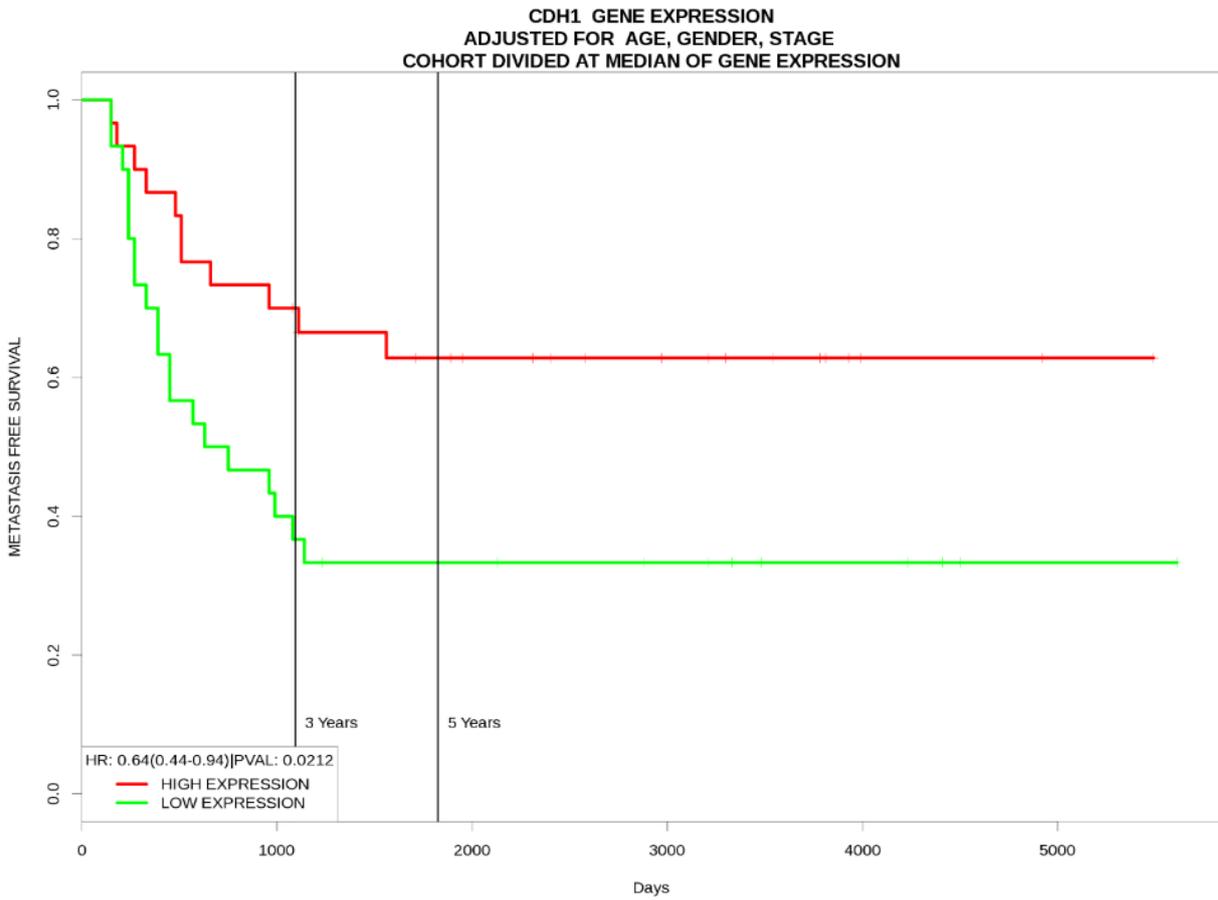
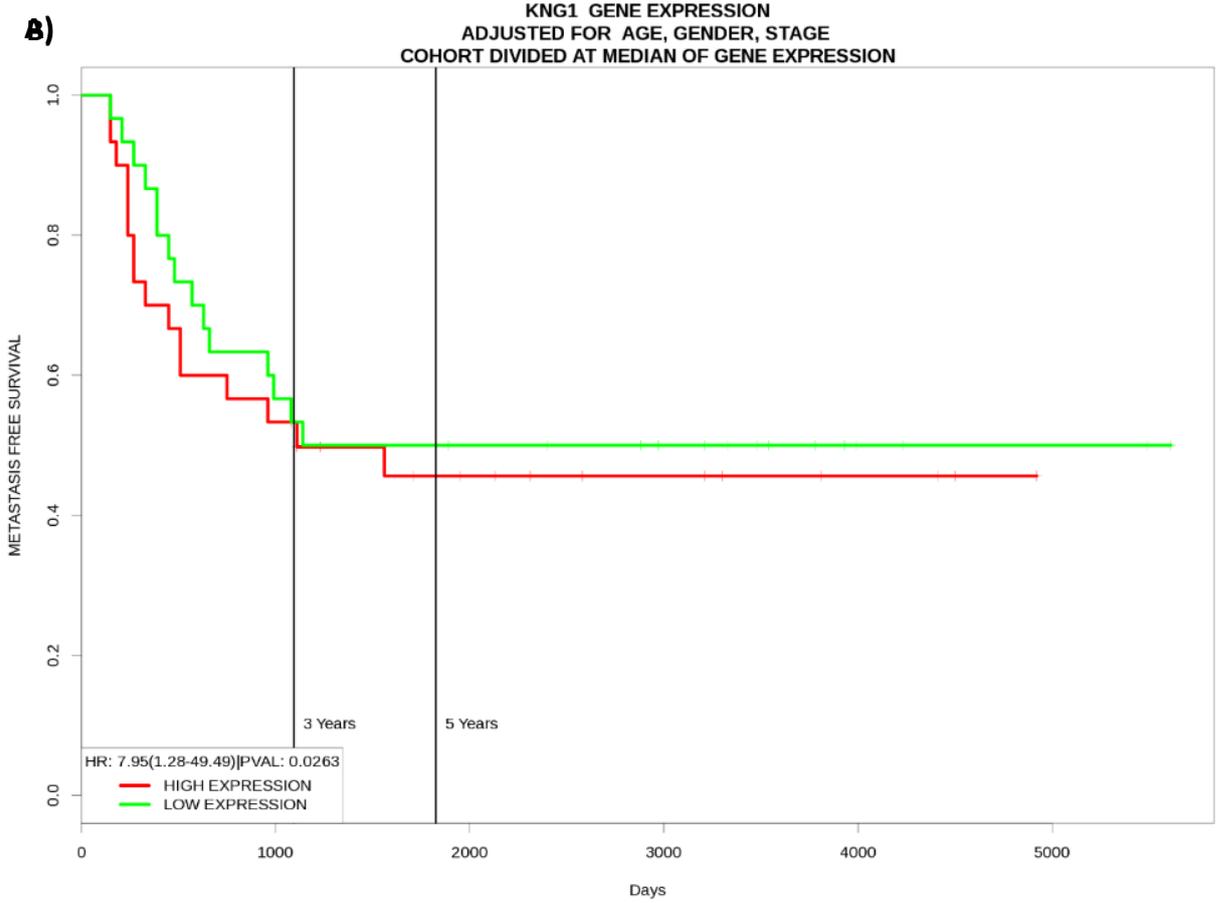


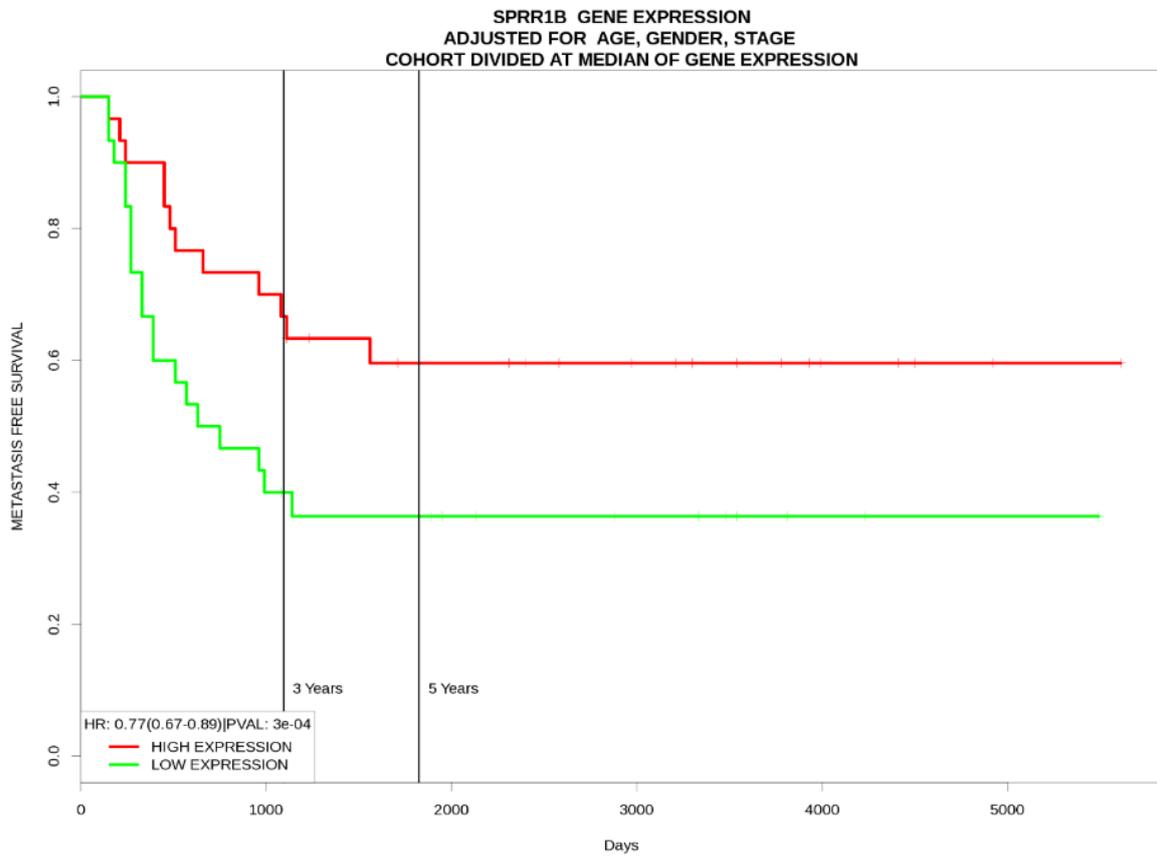
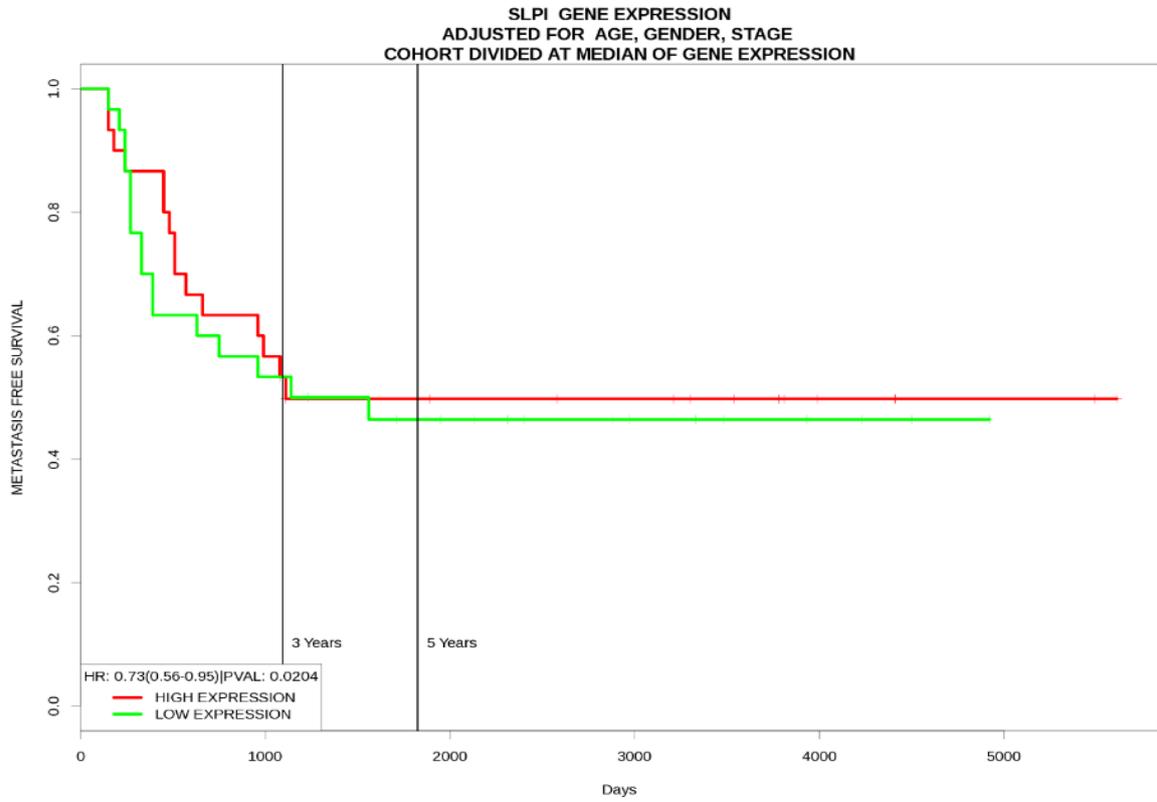


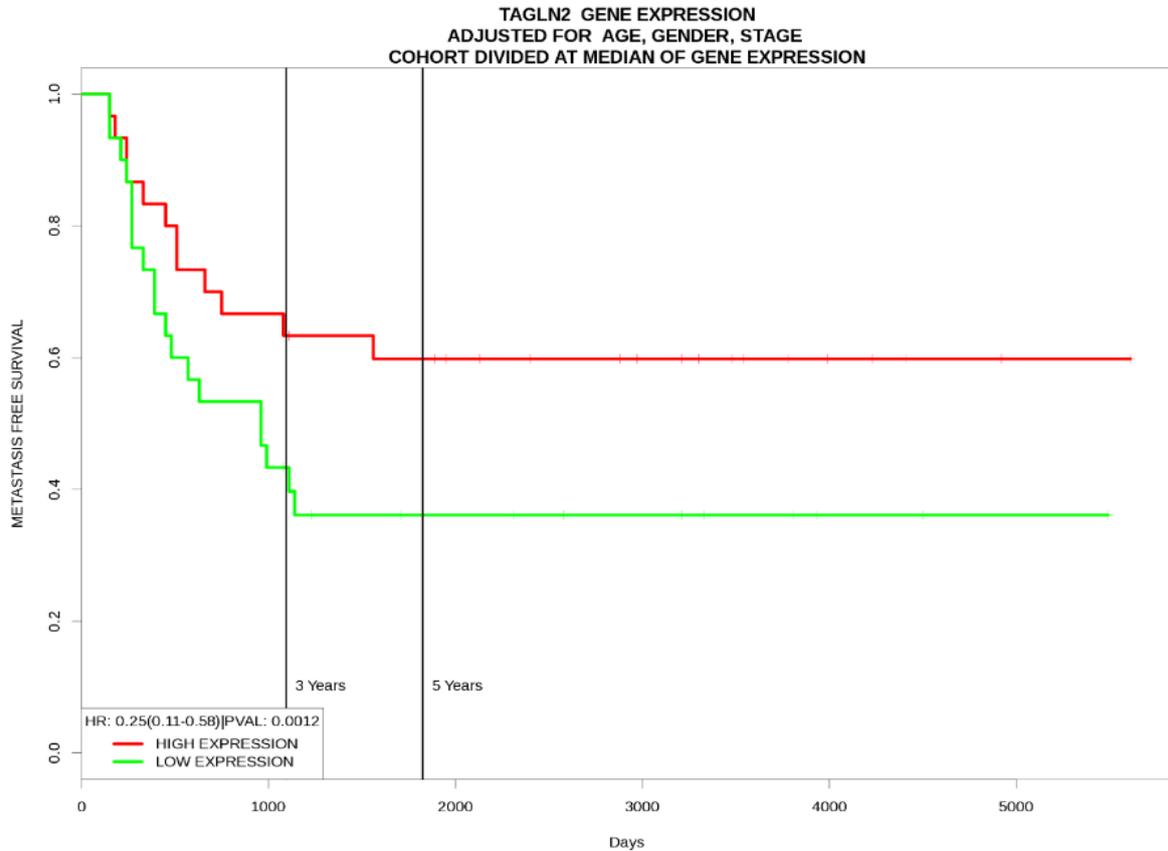
**Figura 10** - A proteína GDR1 humana (gene *ARHGDI1*) está presente em dois bancos de dados diferentes (TCGA e GSE65858). A combinação de *MSN*, *HBA1*, *HPX*, *MYH9*, *ORM1*, *ARHGDI1* (baixa expressão associada com melhor prognóstico; HR=6,49) e *CDH1*, *SLPI*, *AZGP1*, *MUC7*, *PIGR* (baixa expressão associada com um pior prognóstico; HR=0,37) resultou em associação com sobrevida com maior significância estatística.



**Figura 10** - O transcrito *MUC5B* ( $p=0,045$ ;  $HR=0,05$ ), teve a diminuição de sua expressão associada com piora na sobrevida livre de recorrências, assim como a combinação de *MSN*, *A2M* e *AGT*.







**Figura 10** - Proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos, cujos transcritos são associados com sobrevida livre de metástase. O gene presente no grupo (A) *CDH1*, ao diminuir sua expressão, tem associação com uma pior sobrevida livre de metástase; (B) no transcrito *KNG1*, a diminuição de sua expressão teve associação com uma melhor sobrevida livre de metástase. *SLPI* ( $p=0,0204$ ;  $HR=0,73$ ), *SPRR1B* ( $p=3e-04$ ;  $HR=0,77$ ), *TAGLN2* ( $p=0,0012$ ;  $HR=0,25$ ), assim como na associação de todos eles ( $p=1e-04$ ;  $HR=0,49$ ) com uma pior sobrevida livre de metástase. A expressão dos genes *CDH1*, *MSN* e *SLPI* associou-se com mais de um tipo de sobrevida.

## Anexo 5 – Relatório do Turnitin

Estudo do perfil clínico, histopatológico e busca de proteínas marcadoras associadas à progressão de Leucoplasia Verrucosa Proliferativa para Carcinoma Espinocelular

### RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

<b>19%</b> ÍNDICE DE SEMELHANÇA	<b>18%</b> FONTES DA INTERNET	<b>13%</b> PUBLICAÇÕES	<b>10%</b> DOCUMENTOS DOS ALUNOS
------------------------------------	----------------------------------	---------------------------	-------------------------------------

### FONTES PRIMÁRIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.unicamp.br</b> Fonte da Internet	<b>2%</b>
<b>2</b>	<b>onlinelibrary.wiley.com</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>repositorio.ufrn.br</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>repositorio.ufes.br</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>repositorio.ufrn.br:8080</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>www.conferencias.ulbra.br</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>7</b>	<b>www.ncbi.nlm.nih.gov</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>acervodigital.ufpr.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>

9	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	<1%
10	mdanderson.influent.utsystem.edu Fonte da Internet	<1%
11	Submitted to University of Sydney Documento do Aluno	<1%
12	www.researchgate.net Fonte da Internet	<1%
13	docplayer.com.br Fonte da Internet	<1%
14	Susan Müller. "Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology", Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 2018 Publicação	<1%
15	www.nejm.org Fonte da Internet	<1%
16	hal.univ-lorraine.fr Fonte da Internet	<1%
17	docslide.us Fonte da Internet	<1%
18	www.bv.fapesp.br Fonte da Internet	<1%

19	<a href="http://top25.sciencedirect.com">top25.sciencedirect.com</a> Fonte da Internet	<1%
20	Wei, Ying-Jie, Yin-Xia Huang, Xiao-Ling Zhang, Jun Li, Jie Huang, Hao Zhang, and Sheng-Shou Hu. "Apolipoprotein D as a novel marker in human end-stage heart failure: a preliminary study", <i>Biomarkers</i> , 2008. Publicação	<1%
21	<a href="http://www.nice.org.uk">www.nice.org.uk</a> Fonte da Internet	<1%
22	<a href="http://doaj.org">doaj.org</a> Fonte da Internet	<1%
23	<a href="http://buscatextual.cnpq.br">buscatextual.cnpq.br</a> Fonte da Internet	<1%
24	<a href="http://www.inca.gov.br">www.inca.gov.br</a> Fonte da Internet	<1%
25	<a href="http://cel.webofknowledge.com">cel.webofknowledge.com</a> Fonte da Internet	<1%
26	<a href="http://posgraduacao.odonto.ufg.br">posgraduacao.odonto.ufg.br</a> Fonte da Internet	<1%
27	Petra Hudler, Nina Kocevar, Radovan Komel. "Proteomic Approaches in Biomarker Discovery: New Perspectives in Cancer Diagnostics", <i>The Scientific World Journal</i> , 2014	<1%

Publicação		
28	Submitted to The University of Manchester Documento do Aluno	<1%
29	nera.cineca.it Fonte da Internet	<1%
30	staffpubs.fccc.edu Fonte da Internet	<1%
31	www.physiology.org Fonte da Internet	<1%
32	www.sciencenews.org Fonte da Internet	<1%
33	repositorio.ufpa.br Fonte da Internet	<1%
34	link.springer.com Fonte da Internet	<1%
35	Jinhui Liu, Sipei Nie, Mei Gao, Yi Jiang, Yicong Wan, Xiaoling Ma, Shulin Zhou, Wenjun Cheng. "Identification of EPHX2 and RMI2 as two novel key genes in cervical squamous cell carcinoma by an integrated bioinformatic analysis", Journal of Cellular Physiology, 2019 Publicação	<1%
36	Ching-Yu Yen. "Detection of EBV Infection and Gene Expression in Oral Cancer from Patients in Taiwan by Microarray Analysis", Journal of	<1%

## Biomedicine and Biotechnology, 2009

Publicação

<b>37</b>	<b>Submitted to University of Birmingham</b> Documento do Aluno	<1%
<b>38</b>	<b>Submitted to University of Sunderland</b> Documento do Aluno	<1%
<b>39</b>	<b>repositorio.ufpel.edu.br:8080</b> Fonte da Internet	<1%
<b>40</b>	<b>www.oncotarget.com</b> Fonte da Internet	<1%
<b>41</b>	<b>Submitted to Sheffield Hallam University</b> Documento do Aluno	<1%
<b>42</b>	<b>"Cetuximab : Acute respiratory distress syndrome secondary to interstitial pneumonia flare-up: case report", Reactions Weekly, 2016.</b> Publicação	<1%
<b>43</b>	<b>Giuseppe Lucarelli, Davide Loizzo, Rossana Franzin, Stefano Battaglia et al. "Metabolomic insights into pathophysiological mechanisms and biomarker discovery in clear cell renal cell carcinoma", Expert Review of Molecular Diagnostics, 2019</b> Publicação	<1%
<b>44</b>	<b>www.cambridge.org</b> Fonte da Internet	<1%

45	Lin Ge. "Case report of rapidly progressive proliferative verrucous leukoplakia and a proposal for aetiology in mainland China", <i>World Journal of Surgical Oncology</i> , 2011 Publicação	<1%
46	Submitted to University of Western Australia Documento do Aluno	<1%
47	Submitted to Santa Clara University Documento do Aluno	<1%
48	repositorio.ufu.br Fonte da Internet	<1%
49	Submitted to University of Iowa Documento do Aluno	<1%
50	hal.upmc.fr Fonte da Internet	<1%
51	publications.ub.uni-mainz.de Fonte da Internet	<1%
52	Jing Shan, Zhida Sun, Jingjing Yang, Juanyong Xu, Wei Shi, You Wu, Yuan Fan, Huaiqi Li. "Discovery and preclinical validation of proteomic biomarkers in saliva for early detection of oral squamous cell carcinomas", <i>Oral Diseases</i> , 2018 Publicação	<1%
53	Alejandro I. Lorenzo-Pouso, Mario Pérez-	

	<b>Sayáns, Susana B. Bravo, Pía López-Jornet et al. "Protein-Based Salivary Profiles as Novel Biomarkers for Oral Diseases", Disease Markers, 2018</b> Publicação	<1%
54	<b>www.mcponline.org</b> Fonte da Internet	<1%
55	<b>ri.ufs.br</b> Fonte da Internet	<1%
56	<b>Submitted to University of South Florida</b> Documento do Aluno	<1%
57	<b>bv.fapesp.br</b> Fonte da Internet	<1%
58	<b>www.vision.ime.usp.br</b> Fonte da Internet	<1%
59	<b>uthealth.influent.utsystem.edu</b> Fonte da Internet	<1%
60	<b>www.biomedexperts.com</b> Fonte da Internet	<1%
61	<b>Submitted to Florida State University</b> Documento do Aluno	<1%
62	<b>tede.ufam.edu.br</b> Fonte da Internet	<1%
63	<b>jpmcp.com</b> Fonte da Internet	<1%

64	<a href="http://d-nb.info">d-nb.info</a> Fonte da Internet	<1%
65	<a href="http://www.apcd.org.br">www.apcd.org.br</a> Fonte da Internet	<1%
66	<a href="http://www.bjorl.org">www.bjorl.org</a> Fonte da Internet	<1%
67	<a href="http://ro.ecu.edu.au">ro.ecu.edu.au</a> Fonte da Internet	<1%
68	<a href="http://www.chinasciencejournal.com">www.chinasciencejournal.com</a> Fonte da Internet	<1%
69	<a href="http://www.liebertpub.com">www.liebertpub.com</a> Fonte da Internet	<1%
70	<a href="http://www.nature.com">www.nature.com</a> Fonte da Internet	<1%
71	<a href="http://core.ac.uk">core.ac.uk</a> Fonte da Internet	<1%
72	<a href="http://www.econicon.com">www.econicon.com</a> Fonte da Internet	<1%
73	<a href="http://www.intechopen.com">www.intechopen.com</a> Fonte da Internet	<1%
74	<a href="http://roderic.uv.es">roderic.uv.es</a> Fonte da Internet	<1%

Davide Bartolomeo Gissi, Andrea Gabusi,

75	Achille Tarsitano, Laura Luccarini, Luca Morandi, Lucio Montebugnoli. "Podoplanin expression as a predictive marker of dysplasia in oral leukoplakia", Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2018 Publicação	<1%
76	vdocuments.site Fonte da Internet	<1%
77	hurevista.ufjf.emnuvens.com.br Fonte da Internet	<1%
78	www.repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	<1%
79	"IV Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health", Springer Nature, 2008 Publicação	<1%
80	guaiaca.ufpel.edu.br:8080 Fonte da Internet	<1%
81	pubs.acs.org Fonte da Internet	<1%
82	Submitted to Trinity College Dublin Documento do Aluno	<1%
83	www.spandidos-publications.com Fonte da Internet	<1%
84	Rêgo, Daniela Fortunato(Guerra, Eliete Neves	

	da Silva). "Avaliação do efeito da metformina em carcinoma de cabeça e pescoço", RIUnB, 2014. Publicação	<1%
85	<a href="http://pesquisa.bvsalud.org">pesquisa.bvsalud.org</a> Fonte da Internet	<1%
86	<a href="http://mafiadoc.com">mafiadoc.com</a> Fonte da Internet	<1%
87	<a href="http://btd.biblioteca.ufpb.br">btd.biblioteca.ufpb.br</a> Fonte da Internet	<1%
88	<a href="http://serintegralefuncional.blogspot.com">serintegralefuncional.blogspot.com</a> Fonte da Internet	<1%
89	<a href="http://www.ufsj.edu.br">www.ufsj.edu.br</a> Fonte da Internet	<1%
90	<a href="http://www.fup.org.br">www.fup.org.br</a> Fonte da Internet	<1%
91	Submitted to Universidade do Porto Documento do Aluno	<1%
92	"Contemporary Oral Medicine", Springer Nature, 2019 Publicação	<1%
93	<a href="http://etheses.whiterose.ac.uk">etheses.whiterose.ac.uk</a> Fonte da Internet	<1%
94	Erika Antônia dos Anjos Ramos, Fernando	<1%

Amorim Mendonça Alves, Cesar Angelo  
 Lascala, Andre Antonio James et al. "Efficacy  
 of MRI in the differential diagnosis of  
 odontogenic keratocyst: literature review",  
 Clinical and Laboratorial Research in Dentistry,  
 2018

Publicação

95	<a href="https://febs.onlinelibrary.wiley.com">febs.onlinelibrary.wiley.com</a> Fonte da Internet	<1%
96	<a href="http://www.sbfte.org.br">www.sbfte.org.br</a> Fonte da Internet	<1%
97	"Synaptosomes", Springer Nature America, Inc, 2018 Publicação	<1%
98	<a href="http://www.cromatografialiquida.com.br">www.cromatografialiquida.com.br</a> Fonte da Internet	<1%
99	<a href="http://posstrictosensu.iptsp.ufg.br">posstrictosensu.iptsp.ufg.br</a> Fonte da Internet	<1%
100	<a href="http://www.contempclindent.org">www.contempclindent.org</a> Fonte da Internet	<1%
101	<a href="http://www.ilapeo.com.br">www.ilapeo.com.br</a> Fonte da Internet	<1%
102	<a href="https://biorxiv.org">biorxiv.org</a> Fonte da Internet	<1%
103	<a href="http://livrozilla.com">livrozilla.com</a>	

	Fonte da Internet	<1%
104	Sibylle Pfammatter, Eric Bonneil, Francis P. McManus, Satendra Prasad et al. "A Novel Differential Ion Mobility Device Expands the Depth of Proteome Coverage and the Sensitivity of Multiplex Proteomic Measurements", Molecular & Cellular Proteomics, 2018 Publicação	<1%
105	<a href="http://www.repositorio.ufop.br">www.repositorio.ufop.br</a> Fonte da Internet	<1%
106	<a href="http://search.scielo.org">search.scielo.org</a> Fonte da Internet	<1%
107	<a href="http://www.repositorio.ufrn.br:8080">www.repositorio.ufrn.br:8080</a> Fonte da Internet	<1%
108	<a href="http://posnf.sites.uff.br">posnf.sites.uff.br</a> Fonte da Internet	<1%
109	<a href="http://biologia.ufes.br">biologia.ufes.br</a> Fonte da Internet	<1%
110	<a href="http://hal.archives-ouvertes.fr">hal.archives-ouvertes.fr</a> Fonte da Internet	<1%
111	<a href="http://tede.mackenzie.br">tede.mackenzie.br</a> Fonte da Internet	<1%

112	Louis S. Hansen, James A. Olson, Sol Silverman. "Proliferative verrucous leukoplakia", Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1985 Publicação	<1%
113	Machado, Luis Eduardo Silva, João Renato Rebello Pinho, Roberta Sitnik, Nair Hideko Muto, Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso, Roberta Cardoso Petroni, and Paulo Vidal Campregher. "Detecção de mutações no gene KIT em leucemia mieloide aguda", Einstein (São Paulo), 2012. Publicação	<1%
114	<a href="http://www.locus.ufv.br">www.locus.ufv.br</a> Fonte da Internet	<1%
115	<a href="http://www.uftm.edu.br">www.uftm.edu.br</a> Fonte da Internet	<1%
116	<a href="http://www.odontorevista.hpg.ig.com.br">www.odontorevista.hpg.ig.com.br</a> Fonte da Internet	<1%
117	<a href="http://arca.icict.fiocruz.br">arca.icict.fiocruz.br</a> Fonte da Internet	<1%
118	Avelar, Rander Pereira, Bottino, Marco Antônio, Hilgert, Edson and Pretti, Mariana. "Evaluation of the shear bond strength of the union between two CoCr-alloys and a dental ceramic", Faculdade De Odontologia De Bauru	<1%

- USP, 2013.

Publicação

<b>119</b>	<b>cnpem.br</b> Fonte da Internet	<1 %
<b>120</b>	<b>www.scielo.cl</b> Fonte da Internet	<1 %
<b>121</b>	<b>eprints.ucm.es</b> Fonte da Internet	<1 %
<b>122</b>	<b>www.sipmo.it</b> Fonte da Internet	<1 %
<b>123</b>	<b>www.escavador.com</b> Fonte da Internet	<1 %
<b>124</b>	<b>revista.grupointegrado.br</b> Fonte da Internet	<1 %
<b>125</b>	<b>ologypress.com</b> Fonte da Internet	<1 %
<b>126</b>	J Bagan. "Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update", Oral Diseases, 05/2010 Publicação	<1 %
<b>127</b>	Dorothee Lebert, Mathilde Louwagie, Sandra Goetze, Guillaume Picard et al. " : A Universal Quality Standard for the Control of Bottom-Up Proteomics Experiments ", Journal of Proteome Research, 2014 Publicação	<1 %

- 128** Juliana da Silva Moro, Marília Cunha Maroneze, Thiago Machado Ardenghi, Luisa Machado Barin, Cristiane Cademartori Danesi. "Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis", Einstein (São Paulo), 2018  
Publicação <1%
- 
- 129** "Premalignant Conditions of the Oral Cavity", Springer Nature, 2019  
Publicação <1%
- 

Excluir citações

Desligado

Excluir

Desligado

Excluir bibliografia

Desligado

correspondências