

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MARCELO CAVALCANTE MARINHO

PROTEÔMICA QUANTITATIVA DO FLUIDO GENGIVAL DE PACIENTES COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E PERIODONTITE CRÔNICA

Rio de Janeiro

2016



Marcelo Cavalcante Marinho

PROTEÔMICA QUANTITATIVA DO FLUIDO GENGIVAL DE PACIENTES COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E PERIODONTITE CRÔNICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (área de concentração em Periodontia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (área de concentração em Periodontia).

Orientador: Carmelo Sansone

Coorientador: Giovani Carlo Veríssimo da Costa

Rio de Janeiro

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Marinho, Marcelo Cavalcante

Proteômica quantitativa do fluido gengival de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite crônica. / Marcelo Cavalcante Marinho –

Rio de Janeiro: UFRJ, 2016.

xii, 118 p.

Dissertação (Mestrado em Odontologia [Área de concentração em Periodontia]) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, 2016. Referências bibliográficas: f 80-85.

Orientador: Carmelo Sansone

1. Periodontite crônica 2. Fluido crevicular gengival 3. Diabetes mellitus tipo 2 4. Proteômica 5. Marcadores isobáricos – Teses. I. Sansone, Carmelo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, Pós-graduação em Odontologia (Periodontia). III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Cavalcante Marinho

PROTEÔMICA QUANTITATIVA DO FLUIDO GENGIVAL DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 E PERIODONTITE CRÔNICA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (área de concentração em Periodontia), Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (área de concentração em Periodontia).

Aprovada em _____

(Carmelo Sansone, Doutor – UFRJ)

(Eduardo Jorge Feres Filho, Doutor – UFRJ)

(Paulo Mascarello Bisch, Doutor – UFRJ)

(Leticia Miranda Lery Santos, Doutora – Fiocruz)

Dedico esse trabalho aos meus pais que sempre estiveram presentes nos bons e maus momentos da minha vida. Espero poder tê-los sempre por perto.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos professores da pós-graduação de Periodontia, Dr. Eduardo Jorge Feres Filho, Dra. Anna Thereza Thome Leão e Dra. Maria Cynésia Medeiros de Barros Torres por todos os ensinamentos dentro e fora de sala de aula, pelas discussões científicas sempre de alto nível e por todo o incentivo para continuar nessa jornada. Em especial ao meu orientador Dr. Carmelo Sansone que decidiu embarcar no meu projeto, e acreditou que na minha capacidade para fazê-lo acontecer. Obrigado por todo o seu apoio e amizade.

Ao meu coorientador Dr. Giovani Carlo Veríssimo da Costa por toda paciência e dedicação à todas as etapas do meu projeto. Conheci um pesquisador extremamente dedicado pelo seu trabalho, o que transpareceu nos resultados, que graças a ele foi possível. Apesar de todas as dificuldades que encontramos durante esse projeto, sempre foi otimista e me encorajou a seguir em frente. Muito obrigado!

Agradeço também aos meus colegas de Mestrado por me ajudarem em toda essa caminhada. Sempre trocando informações, conquistas e muitas vezes nossas frustrações. Obrigado pela amizade e companheirismo em todas as etapas nesse percurso.

À equipe do Laboratório do Dr. José Mauro Peralta que foram muito prestativos e tornaram mais agradável os dias que tive a oportunidade de conviver nesse ambiente.

À equipe da Unidade Multidisciplinar de Genômica, em especial à Dra. Ana Beatriz Furlanetto Pacheco, por toda sua dedicação com meu projeto e por abrir as portas do seu laboratório. Conheci uma pessoa admirável, de conduta notável. Foi uma honra conhecê-la e tenho muito a agradecer por toda sua participação na preparação das minhas amostras. Sem ela não teria sido possível a conclusão desse trabalho e mesmo tendo pegado o trabalho com todos os atrasos, sempre foi disponível e aberta à discussões.

À FAPERJ pela verba que possibilitou que esse trabalho fosse possível.

À CAPES que tornou viável minha moradia mais próxima à Ilha do Fundão, essencial para a conclusão desse curso.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, pois são a abertura para achar as que estão certas.” Carl Sagan

RESUMO

MARINHO, Marcelo Cavalcante. Proteômica quantitativa do fluido gengival de pacientes com diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite crônica. 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia – área de concentração em Periodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A Periodontite Crônica (PC) é considerada uma das complicações do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), podendo levar a perda dentária e diminuição da qualidade de vida. O Fluido crevicular gengival (FCG) é um exsudato inflamatório que expressa componentes dos tecidos periodontais e do soro sanguíneo. A coleta do FCG é uma técnica não invasiva, que possibilita o estudo da Doença Periodontal e sua interação com o organismo. O objetivo do presente estudo foi analisar quantitativamente as proteínas expressas no FCG de pacientes que possuem DM2 e PC. Com essa meta, foi utilizada a coleta de FCG com periopaper, preparação das amostras com marcadores isobáricos de iTRAQ, e então aplicada a técnica de Espectrometria de Massas (MS). Foram recrutados 20 pacientes para a coleta do FCG, 5 com DM2 e PC, 5 com DM2 e saúde periodontal, 5 sem DM2 e com PC e 5 sem DM2 e com saúde periodontal. Essa abordagem possibilitou a identificação de 361 proteínas e quantificação relativa de 187 delas, entre os diferentes grupos estudados. Dentre as proteínas mais abundantes nas condições de doença estão a Mieloperoxidase, Elastase de Neutrófilo, S100A9, S100A8 e classes de Igs. Nos pacientes com PC sem diabetes houve a diminuição de 65 proteínas, dentre elas actinas, histonas e classes de Igs. Enquanto nos pacientes com PC e DM2 26 proteínas estavam aumentadas, além de proteínas de resposta imune/inflamatória também estavam aumentadas histonas e proteínas relacionadas com diferenciação celular e ligante de nucleotídeos. Nos pacientes com DM2 e saúde periodontal apenas 7 se mostraram aumentadas, porém entre elas proteínas de resposta imune/inflamatória. O estudo da relação das abundâncias das proteínas na PC e a associação de fatores de risco que predispõem à doença podem esclarecer sobre como o DM2 e a PC se relacionam e levar à definição de biomarcadores que explicariam o risco elevado de desenvolver a PC nos indivíduos com o DM2.

Palavras-chave: Periodontite crônica. Fluido crevicular gengival. Diabetes mellitus tipo 2. Proteômica. Marcadores isobáricos.

ABSTRACT

MARINHO, Marcelo Cavalcante. Quantitative proteomics of gingival crevicular fluid from patients with type 2 Diabetes Mellitus and Chronic Periodontitis using isobaric tags. 2016. Dissertation (Master in Dentistry – concentration area in Periodontics) – Faculty of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Chronic periodontitis (CP) is considered one of type 2 Diabetes Mellitus (DM2) complications, that can result in dental loss and decreased quality of life. The gingival crevicular fluid (GCF) is an inflammatory exudate that expresses components of the periodontal tissues and the blood serum. The collection of GCF is a non-invasive technique, which allows the study of Periodontal Disease and its interaction with the host. The present study aims to quantitatively analyze proteins expressed in GCF obtained from patients with DM2 and CP. For this goal, we utilized periopaper strips to collect the GCF. The sample was prepared with isobaric iTRAQ tags and then subjected to Mass Spectrometry (MS) technique. 20 patients were recruited for GCF collection, 5 with DM2 e PC, 5 with DM2 and periodontal health, 5 without DM2 with PC and 5 without DM2 with periodontal health. This approach enabled the identification of 361 proteins and the relative quantitation of 187 of them, among the study groups. The most abundant proteins in disease conditions were Myeloperoxidase, Neutrophil Elastase, S100A9, S100A8 and Ig classes. Patients with diabetes and without CP had 65 protein decreased, which actins, histones and Ig classes were the most significant. While in patients with DM2 and CP, 26 proteins were increased, in addition to immune response/inflammatory proteins, also were increased histones, cell differentiation and nucleotide binding proteins. In Patients with DM2 and periodontal health only 7 were increased, however between them immune response/inflammatory proteins. The study of the relationship of abundances from proteins in the CP, with associated risk factors that predispose to disease conditions can clarify how DM2 and CP relate and lead to the definition of biomarkers that explain the higher risk of CP development in individuals with DM2.

Key words: Chronic Periodontitis. Gingival crevicular fluid. Type 2 Diabetes Mellitus. Isobaric tags.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Coleta do FCG com tira de Periopaper	31
Figura 2. Periotron 8000.....	31
Figura 3. Inserção da tira de Periopaper nos eletrodos do Periotron 8000	32
Figura 4. Esquema de preparação das amostras de proteínas do FCG para análise em espectrometria de massas LC-MS/MS.....	35
Figura 5. A) Distribuição das 187 proteínas identificadas e quantificadas em categorias de função biológica. B) Distribuição das proteínas identificadas e quantificadas em categorias de localização celular.....	54
Figura 6. Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo SP/SS.....	60
Figura 7. Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo DS/SS.	61
Figura 8. Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo DP/SS.	62
Figura 9. Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo DP/DS.	63
Figura 10. Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo DP/SP.	64
Figura 11. (continuação) Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo DP/SP.....	65
Figura 12. Razão da abundância relativa de Mieloperoxidase, Elastase de neutrófilo, Azurocidina, S100A9 e S100A8 entre as condições do estudo.....	66
Figura 13. Razão da abundância relativa de Ig kappa chain C region, Annexin 1, Glutathione S- transferase P e Cathelicidin antimicrobial peptide entre as condições do estudo.....	67
Figura 14. Razão da abundância relativa de Actin cytoplasmatic 1, Actin cytoplasmatic 2, Desmoplakin e Vitronectin entre as condições do estudo	68
Figura 15. Razão da abundância relativa de Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate, Rap Guanine nucleotide exchange fator-like 1 e Titin entre as condições do estudo.....	69

Figura 16. Distribuição das 361 proteínas detectadas em FCG no presente estudo e a comparação com bancos de dados dos estudos prévios com FCG.....	70
Figura 17. Diagrama de Venn correlacionando as proteínas detectadas por MS do estudo atual e de 2 estudos anteriores.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos da população do estudo.....	39
Tabela 2. Lista das 187 proteínas identificadas e quantificadas por marcadores de iTRAQ com sua respectiva função e localização celular, busca por UniProt/SwissProt.	41
Tabela 3. Razão das 104 proteínas detectadas e marcadas com tags de iTRAQ que tiveram diferença significativa na abundância relativa entre os grupos de doença e o grupo controle SS, divididas por função biológica.....	55

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADA – do inglês American Diabetes Association
AGE – do inglês Advanced Glycation end products
C – Complemento
DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2
DP – grupo com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite Crônica
DS – grupo com Diabetes Mellitus tipo 2 e saúde periodontal
FCG – Fluido crevicular gengival
FPG – Glicose Plasmática em jejum
FT-MS – do inglês Fourier Transform ion cyclotron
GE – Eletroforese em gel
IDF – do inglês International Diabetes Federation
IG - Imunoglobulina
IL – Interleucina
IPC– Índice Periodontal Comunitário
IRS – Receptor de Insulina
ISG – Índice de Sangramento Gengival
iTRAQ – do inglês isobaric tags for relative and absolute quantitation
LC/MS-MS – Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massas
LPS – Lipopolisacarídeo
MARCKS – do inglês Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MMP – Metaloproteinase de matriz
MS – Espectrometria de Massas
NCI – Nível Clínico de Inserção
NETs – do inglês Neutrophil Extracellular Traps
OGTT – Teste oral de tolerância à glicose
PBS – Profundidade de Bolsa à Sondagem
PC – Periodontite Crônica
PG – Glicose Plasmática
PKC – do inglês Protein Kinase C
SP – grupo sem Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite Crônica
SS – grupo sem Diabetes Mellitus tipo 2 e saúde periodontal
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TOF – do inglês Time-of-flight

Sumário

PROTEÔMICA QUANTITATIVA DO FLUIDO GENGIVAL DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 E PERIODONTITE CRÔNICA

RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	13
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Diabetes Mellitus.....	16
1.2. Doença Periodontal.....	18
1.3. A relação entre o Diabetes Mellitus tipo 2 e a Periodontite Crônica.....	20
1.4. O fluido crevicular gengival	21
1.5. Estudos em proteômica	23
1.6. O estudo do FCG em abordagens proteômicas.....	25
2. PROPOSIÇÃO.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Desenho e população do estudo.....	28
3.2. Critérios de exclusão.....	29
3.3. Exame e Tratamento Periodontal.....	29
3.4. Calibração intra-examinador	30
3.5. Coleta de amostras do fluido gengival	30
3.6. Análise Estatística.....	32
3.7. Análise Proteômica	32
3.7.1. Preparação das amostras de fluido gengival.....	33
3.7.2. Análise por LC-MS/MS	35
3.7.3. Processamento de dados e identificação de proteínas	36

3.7.4. Análise Quantitativa.....	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Dados clínicos e demográficos	38
4.2. Identificação e Quantificação de proteínas marcadas por iTRAQ ...	39
5. DISCUSSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus é definido como um grupo de doenças metabólicas que se caracterizam pela hiperglicemia causada por defeitos na secreção de insulina, da ação da insulina, ou de ambos (American Diabetes Association - ADA, 2015). A hiperglicemia crônica causada pelo Diabetes Mellitus está associada ao alto risco de complicações microvasculares como, retinopatia, neuropatia e nefropatia, além de complicações macrovasculares como, doença cardiovascular (Gorst *et al.*, 2015).

A prevalência global de indivíduos com Diabetes Mellitus vem crescendo, e nas últimas três décadas mais que duplicou (Danaei *et al.*, 2011). Em 2010, foi estimado que 285 milhões de indivíduos tivessem o Diabetes Mellitus no mundo. Essa prevalência aumentará para 439 milhões em 2030 (Shaw, Sicree e Zimmet, 2010). A epidemia global de Diabetes Mellitus é atribuída a uma combinação complexa de predisposições genéticas e epigenéticas, interagindo com uma variedade de fatores ambientais e comportamentais (Chen, Magliano e Zimmet, 2012). No Brasil, a prevalência do diabetes é de 9 milhões, o que corresponde a 6,2% da população adulta. As mulheres (7%), apresentam uma maior proporção que os homens (5,4%). Os percentuais na prevalência do diabetes por faixa etária são: 0,6% entre 18 a 29 anos, 5% de 30 a 59 anos, 14,5% entre 60 a 64 anos e 19,9% entre 65 a 74 anos. Para aqueles que tinham 75 anos ou mais de idade, o percentual foi de 19,6%, de acordo com os dados extraídos no portal Brasil, da pesquisa nacional de saúde em 2013, utilizados pelo ministério da saúde, em parceria com o IBGE.

No mundo, a faixa etária com maior número de indivíduos diagnosticados com o Diabetes Mellitus é entre 40 e 59 anos de idade (Whiting *et al.*, 2011), tendo um grande impacto na qualidade de vida desses indivíduos, incluindo o impacto psicológico de estarem cronicamente doentes, restrições alimentares, mudanças na vida social, sintomas causados pelo mau controle metabólico, complicações crônicas e dificuldades ao longo da vida (Pichon-Riviere *et al.*, 2015).

Atualmente, o Diabetes Mellitus é classificado de acordo com a etiologia da doença, tendo quatro classes clínicas principais: Diabetes Mellitus tipo 1, que é definido pela destruição das células β pancreáticas, usualmente levando a uma

deficiência total de insulina, Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), que pode variar de uma predominante resistência à insulina, com deficiência relativa de insulina, até uma deficiência predominante na secreção de insulina com resistência à insulina, Diabetes Mellitus gestacional e outros tipos específicos de diabetes, tais como defeitos genéticos na função de células- β , defeitos genéticos na ação da insulina, endocrinopatias, dentre outros (ADA, 2015). Dentre os diferentes tipos, o DM2 é o que atinge um maior número de indivíduos, mais de 90% dos casos (DeFronzo *et al.*, 2015).

O diagnóstico do DM2 pode ser realizado através de critérios estabelecidos de Hemoglobina Glicada (HbA1C) ou glicose plasmática (PG), podendo ser a glicose plasmática em jejum (FPG) ou o teste oral de tolerância à glicose (OGTT) após 2 horas de ingestão de 75g de glicose diluídas em água (2-h PG). Os valores definidos pela ADA e aceitos pela Federação Internacional de Diabetes (IDF) para o diagnóstico do diabetes são de: HbA1C $\geq 6,5\%$, FPG ≥ 126 mg/dL e 2-h PG ≥ 200 mg/dL. Em indivíduos com sintomas clássicos de hiperglicemia ou em crise hiperglicêmica, um teste comum de glicose plasmática com valor ≥ 200 mg/dL pode ser usado para o diagnóstico (ADA, 2015).

Os níveis elevados de glicose no sangue no DM2 são o resultado da falta de resposta apropriada das células à insulina, denominada resistência à insulina. Sendo assim, a capacidade das células de receber a glicose é diminuída, e há a hiperglicemia sanguínea. A secreção de insulina desses indivíduos pode ser deficiente devido a hiperglicemia prolongada. Entretanto, os indivíduos com o DM2 podem apresentar níveis de insulina normais ou elevados, pela compensação da secreção de insulina pelas células- β pancreáticas (Martin *et al.*, 1992).

Vários fatores estão relacionados com o desenvolvimento do DM2, entretanto a etiologia específica não é conhecida, não há destruição autoimune das células- β pancreáticas e os indivíduos não apresentam nenhuma das outras causas conhecidas do diabetes. Estudos clínicos e fortes evidências apontam alguns fatores como o aumento da idade, obesidade e sedentarismo, e mais recentemente, o padrão da má alimentação ocidental, através do consumo excessivo de alimentos contendo produtos finais de glicação avançada (Advanced glycation end-products - AGEs) (Vlassara e Uribarri, 2014).

Os AGEs são moléculas de proteína e/ou lipídios modificadas, com grande potencial de dano tecidual, formadas através de reações aminocarbonilo de natureza não enzimática. Estas modificações podem alterar irreversivelmente a conformação e a função de diversas proteínas e estão associados com as complicações vasculares do diabetes. A formação desses produtos ocorre também em níveis normais de glicemia, entretanto é excessiva na hiperglicemia e hiperlipidemia (Nowotny *et al.*, 2015).

Há cada vez mais evidências de que a formação de AGEs seja um fator de risco para o desenvolvimento da resistência à insulina (Tan *et al.*, 2011). Entretanto, o mecanismo molecular que leva a resistência à insulina induzida pelos AGEs ainda não é completamente compreendido. Dentre os estudos *in vitro*, podemos citar a indução da expressão do Fator de Necrose Tumoral α (TNF)- α pela presença da Albumina glicosilada (Naitoh, Kitahara e Tsuruzoe, 2001). Outro estudo *in vitro* demonstrou a Proteína C quinase α (PKC α) como alvo da Albumina glicosilada, levando a um aumento da fosforilação de serina/treonina do substrato para o receptor de insulina (IRS) 1 e 2, e a fosforilação da tirosina do IRS (Miele *et al.*, 2003). Ambos os mecanismos citados anteriormente podem ser capazes de suprimir a ação da insulina. O tratamento para a melhora da resistência a insulina inclui a terapia farmacológica e a redução de peso, com regulação na alimentação e atividade física, porém raramente é alcançado o reestabelecimento ao normal (Moller e Flier, 1991).

1.2. Doença Periodontal

As estruturas teciduais formadas ao redor dos dentes são denominadas de periodonto que é dividido em periodonto de proteção, formado pela gengiva, e periodonto de sustentação ou inserção, formado pelo cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Pelo fato dos dentes estarem no ambiente úmido da cavidade bucal e por serem superfícies duras, não descamativas, estão sujeitos à colonização bacteriana (biofilme dentário). Para combater a entrada de microorganismos no sistema, nos tecidos periodontais estão presentes células de defesa que chegam através da corrente sanguínea e se tornam mais numerosas durante o processo de inflamação gengival. A Gengivite induzida pela placa é a forma mais comum de inflamação gengival, não atingindo os tecidos de suporte,

possuindo os sinais clínicos de eritema, edema, sangramento, sensibilidade, fragilidade e aumento de volume (Mariotti, 1999).

A persistência da inflamação dos tecidos periodontais, em indivíduos susceptíveis, pode levar a migração apical do epitélio juncional e destruição dos tecidos de suporte do dente (Page *et al.*, 1997). Fatores sistêmicos e locais podem influenciar na progressão do estado inflamatório da Gengivite para o processo destrutivo da Periodontite. Dentre os fatores sistêmicos, podemos citar a deficiência na resposta imune, como no HIV, no DM2 e no uso contínuo de corticosteroides, e além da hiper-reatividade da resposta imune/inflamatória do hospedeiro, mediada principalmente pela resposta de neutrófilos (Matthews *et al.*, 2007). O gatilho que desencadeia o avanço do estado inflamatório gengival para a perda de inserção e perda óssea pode ocorrer por condições genéticas (Stabholz, Soskolne e Shapira, 2010), epigenéticas (Lavru, Venkatesan e Rao, 2015) ou ambientais, como a microbiota patogênica (Moore e Moore, 1994) e o fumo (Haber *et al.*, 1993).

A presença do biofilme dentário é necessária para iniciar e/ou exacerbar o processo inflamatório, e pode ser intensificada pela presença de certos grupos bacterianos com maior potencial de virulência. Em 1998, foi proposta a classificação das bactérias presentes no biofilme subgengival por complexos bacterianos, pelas suas características na patogênese da Doença Periodontal. Dentre os cinco complexos identificados, o denominado complexo vermelho, formado pela *Tannarella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, foi associado à maior virulência e consequente progressão da Doença Periodontal (Socransky *et al.*, 1998).

Os microorganismos periodontopatogênicos produzem toxinas, também chamados de fatores de virulência, como lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos que induzem a resposta do hospedeiro, através da produção de citocinas pró-inflamatórias. Dentre as citocinas que estão relacionadas com o processo de destruição do tecido periodontal, podemos citar a Interleucina (IL)-1, IL-6, IL-11, TNF- α e Interferon (IFN)- γ (Graves *et al.*, 2008). Nos tecidos periodontais, diversos tipos celulares são responsáveis pela liberação dessas citocinas, como macrófagos/monócitos (Charon, Toto e Gargiulo, 1981), linfócitos (Kawai *et al.*, 2006), neutrófilos e fibroblastos (Stein, Borke e Cummings, 1999; Ara *et al.*, 2009).

Sobretudo, é comprovado clinicamente que a remoção do biofilme bacteriano é necessária para a manutenção da saúde dos tecidos periodontais (Cobb, 2002).

Em estudos realizados em diversas regiões do mundo, foi avaliada a prevalência das diferentes formas de acometimento periodontal através do Índice Periodontal Comunitário (IPC), onde foi encontrado de 10 a 15% da população adulta com sinais da forma grave da doença, com Profundidade de Bolsa à Sondagem (PBS) > 6mm, enquanto a forma de acometimento periodontal mais prevalente foi o sangramento à sondagem e presença de cálculo (Petersen e Ogawa, 2012).

A forma reconhecidamente mais frequente de manifestação da Periodontite é a Periodontite Crônica (PC). A PC é definida como uma doença infecciosa, resultando em inflamação que afeta os tecidos de suporte do dente, causando perda de inserção progressiva e perda óssea. É caracterizada pela formação de bolsa e/ou recessão gengival e pode atingir qualquer idade, porém é mais comumente detectada em adultos (Lindhe *et al.*, 1999). A destruição periodontal avançada pode levar ao comprometimento da vitalidade pulpar e é a segunda causa mais comum de perda dentária.

1.3. A relação entre o Diabetes Mellitus tipo 2 e a Periodontite Crônica

A piora do controle metabólico no DM2 promove alterações nos mecanismos da resposta do hospedeiro e no metabolismo do colágeno, que aumentam a susceptibilidade do indivíduo a desenvolver a PC. O DM2 é considerado um fator de risco à Periodontite, entretanto, o controle glicêmico é o fator determinante no aumento do risco e gravidade (Preshaw *et al.*, 2012). Estudo em larga escala nos EUA mostrou que em indivíduos entre 45 e 95 anos, com taxas de HbA1C > 9% a prevalência de PC generalizada foi de 15% , de HbA1C < 9% prevalência de 9% e em indivíduos sem diabetes prevalência de 4% (Tsai, Hayes e Taylor, 2002), mostrando que o descontrole metabólico no DM2 está associado ao aumento na prevalência de Periodontite Crônica.

A influência do DM2 e do controle glicêmico na microbiota periodontal foi muito estudada. Estudos buscaram encontrar a causa da maior prevalência de PC em indivíduos com o DM2 pela colonização de periodontopatógenos ou maior virulência dos microorganismos da placa bacteriana, porém a maior parte desses

estudos possuíam vieses que não permitiam concluir se havia alguma diferença na microbiota oral dos indivíduos com DM2. Mais recentemente foram realizados estudos bem conduzidos que comprovam que a microbiota periodontal nesses indivíduos permanece inalterada e que o controle glicêmico não altera a composição do biofilme subgengival (Taylor, Preshaw e Lalla, 2013).

Existe ainda uma plausibilidade biológica que pode conectar a PC ao desenvolvimento do DM2, piora do controle metabólico e complicações, através da resposta inflamatória crônica gerada pela reação frente a patógenos no biofilme dental. A resistência à insulina pode ocorrer nesses indivíduos pela disfunção do sistema imune, estresse oxidativo e descontrole nos níveis de citocinas próinflamatórias (Borngnakke *et al.*, 2013), mas ainda são necessários estudos para confirmar essa relação.

A associação da PC com o DM2 parece ter relação com o acúmulo de AGEs nos tecidos periodontais, e para confirmar essa relação foram comparadas amostras de gengiva de indivíduos com DM2 e PC, e foram encontrados níveis elevados de AGEs nesses indivíduos em comparação com os grupos controle (Zizzi *et al.*, 2013). Paralelamente, são encontradas elevadas taxas de metaloproteinase de matriz (MMP)-8 e MMP-9 em amostras de tecido gengival de indivíduos com diabetes, quando comparadas com indivíduos sem a Diabetes Mellitus (Kumar *et al.*, 2006). O colágeno se torna menos solúvel, é menos reabsorvido e reparado pelas ligações cruzadas, permanecendo nos tecidos por mais tempo, atrofiado e desorganizado (Niu *et al.*, 2012). Dessa maneira, o colágeno envelhece e fica mais susceptível à degradação por processos inflamatórios, como na PC.

1.4. O fluido crevicular gengival

O fluido crevicular gengival (FCG) é um fluido corporal derivado do soro sanguíneo que se forma no periodonto entre a gengiva e o dente. Sua função de lavagem e proteção da interface dento-gengival se dá pelo fluxo positivo de extravasamento através de vasos capilares da região e pela sua composição rica em produtos da resposta imune, como anticorpos e mediadores inflamatórios. O interesse em seu estudo se deriva da capacidade do FCG poder refletir a fisiopatologia do periodonto (Embery e Waddington, 1994), assim sua análise

detalhada pode contribuir para o entendimento da patogênese e da progressão da PC.

A produção de FCG tende a aumentar com a severidade da inflamação gengival (Armitage, 2004), porém não foi comprovada que seja maior em indivíduos que tem DM2, ainda que os mesmos tenham mais susceptibilidade e respostas mais severas da PC (Navarro-Sanchez, Faria-Almeida e Bascones-Martinez, 2007; Kardesler *et al.*, 2011). O FCG de indivíduos com PC e DM2 apresenta concentrações mais elevadas de IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-17, IL-23 e IFN- γ , quando comparado a de indivíduos sem DM2, com a PC (Javed, Al-Askar e Al-Hezaimi, 2012).

A coleta do FCG pode ser realizada através da técnica de absorção com tiras de papel (0,1 - 1,2 μ L) ou com tubos de vidro microcapilares (0,2 - 1,5 μ L), portanto uma pequena quantidade de fluido pode ser obtida por sítio, principalmente em indivíduos periodontalmente saudáveis, onde é possível coletar apenas de 0,1 a 0,5 μ L, tornando desafiador o estudo desse fluido corporal. Ambas as técnicas tem suas vantagens e desvantagens. A coleta com Periopaper é simples e pouco invasiva, entretanto durante a etapa de recuperação das proteínas, algumas proteínas ficam presas nas fibras do papel, levando a uma perda de amostra (Griffiths, 2003). O outro método utilizando capilares de vidro é complexo pela dificuldade de inserção do capilar no sulco gengival e pelo maior tempo de coleta e ainda assim inclui alguma perda de proteínas (Suelter e Deluca, 1983).

Em estudos que utilizam fluidos corporais, a presença de proteínas muito abundantes como albumina e imunoglobulinas (Igs), que constituem cerca de 50% do total de proteínas no soro sanguíneo (Bickel, Cimasoni e Andersen, 1985), pode atrapalhar na identificação de proteínas menos abundantes e de interesse científico. Por esse motivo, é crítico em estudos que utilizam o soro sanguíneo, por exemplo, que na preparação da amostra haja uma etapa de remoção dessas proteínas majoritárias. Dentre as proteínas encontradas no FCG, foi relatado que nos trabalhos de Ngo *et al.*, 2010 (66 proteínas), Bostanci *et al.*, 2010 (101 proteínas), Grant *et al.*, 2010 (186 proteínas) e Carneiro *et al.*, 2012 (199 proteínas), os resultados mostraram que haviam 199 proteínas em comum entre esses estudos, e em torno de 50 % dessas proteínas são compatíveis com as encontradas no plasma, enquanto as 50% demais parecem ser específicas do microambiente do sulco

gingival. Entretanto, foi relatado também que a contribuição de proteínas do soro no FCG pode aumentar de acordo com a inflamação, sendo de apenas em torno de 30% em sítios saudáveis e em torno de 70% em sítios com Periodontite (Carneiro, Nouh e Salih, 2014). Apesar dos dados mostrarem que no FCG pode haver a presença de proteínas abundantes provenientes do soro, a inclusão dessa etapa gera perda de amostra e provável ligação irreversível de proteínas à resina utilizada, tornando o processo deletério em estudos de proteômica com FCG, com as técnicas atuais de remoção de proteínas abundantes.

A busca de um biomarcador no FCG com potencial para indicar a perda de inserção e progressão da Doença Periodontal não é nova. Por conter diversos produtos da inflamação do hospedeiro e da microbiota gengival, o FCG pode ser usado como um teste diagnóstico potencial para indicar a susceptibilidade do hospedeiro a desenvolver a Periodontite (Lamster e Ahlo, 2007). Mais de 90 moléculas incluindo citocinas, enzimas proteolíticas, toxinas bacterianas e produtos de degradação tecidual foram descritas como possíveis indicadores de atividade de destruição periodontal (Taba *et al.*, 2005). Entretanto, considerando a complexidade das interações entre as proteínas, o estudo individualizado de algumas delas pode ser inconclusivo.

1.5. Estudos em proteômica

A proteômica é o estudo integrado do conjunto total de proteínas expressas por um organismo. Seu objetivo é obter uma visão global e integrada de todas as proteínas de uma célula, tecido ou fluido biológico. A técnica de Espectrometria de Massas (MS) é uma coleção de várias técnicas disciplinares e se tornou o método de escolha para a análise de amostras complexas de proteínas (Domon e Aebersold, 2006).

Basicamente, um espectrômetro de massa consiste em uma fonte ionizadora, um analisador de massa que mede a razão massa/carga (m/z) dos analitos ionizados e um detector que registra o número de íons a cada valor de m/z . Atualmente existem quatro tipos básicos de analisadores de massa usados em pesquisas proteômicas: “ion trap”, “time-of-flight” (TOF), “quadupole” e “Fourier transform ion cyclotron” (FT-MS) (Aebersold e Mann, 2003).

Em geral, as preparações para a análise de MS incluem: extração e eluição das proteínas, purificação das amostras, digestão das proteínas e cromatografia por troca catiônica ou hidrofobicidade. Os peptídeos identificados são compilados em uma “hit list” de proteínas que é o resultado final de um experimento em proteômica.

O método livre de gel, sem marcação (label-free) ou com uso de marcação de proteínas com tags de massa (iTRAQ) são abordagens mais avançadas, que embora aumentem muito a complexidade de execução, tem potencial de revelar um número maior de proteínas, sendo bem mais eficientes que o desenvolvido em gel. Destaca-se que a análise proteômica livre de gel ainda é pouco desenvolvida no Brasil e esta dissertação representa o primeiro estudo em FCG a utilizar esta abordagem.

Para possibilitar a quantificação relativa das proteínas por MS, foram desenvolvidos métodos de marcação com isótopos estáveis. Neste caso, a análise de MS envolve a comparação de intensidades de sinal ou áreas de picos dos peptídeos marcados, observados nos espectros de massa correspondentes. Tornando possível a marcação de peptídeos em diferentes amostras biológicas, como amostras representativas de saúde e doença que podem ser analisadas num único experimento de MS (Wiese *et al.*, 2007).

As amostras de proteína a serem comparadas são quantificadas e massas iguais de proteína são digeridas separadamente (em geral por tripsina), gerando uma mistura complexa de peptídeos proteolíticos. Cada digestão de peptídeos é marcada com um reagente iTRAQ (tag) diferente. Há oito tags disponíveis, que variam em função da massa do grupo repórter que carregam (m/z 113, 114, 115, 116, 117 e 118, 119 e 121). O reagente iTRAQ liga-se covalentemente em grupos amino livres no terminal N de todos os peptídeos e nas cadeias laterais com resíduos de lisina e tirosina. Os peptídeos marcados com os diferentes tags são reunidos em uma única mistura, que é analisada por Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) para identificação e quantificação. A sequência do peptídeo é determinada a partir do conjunto de íons gerados pela clivagem das ligações peptídicas. Já a quantidade relativa de um peptídeo em duas ou mais amostras é determinada a partir do processo de fragmentação dos íons precursores de peptídeos marcados. A fragmentação libera íons repórteres de baixa massa correspondentes aos tags. Comparando-se as intensidades de sinal dos íons

repórter obtém-se a quantificação relativa do peptídeo nas diversas amostras com uma análise única (Shadforth *et al.*, 2005; Schmidt e Urlaub, 2009).

Umas das vantagens desta abordagem é a redução no tempo de análise, já que as amostras depois de marcadas são combinadas e passam a formar uma única amostra, que é analisada em uma corrida no espectrômetro de massa. Em geral são realizadas múltiplas injeções em LC-MS/MS como replicatas técnicas.

1.6. O estudo do FCG em abordagens proteômicas

Ao longo do tempo, diversas técnicas foram utilizadas para a análise do FCG na busca de uma ou mais proteínas relacionadas com a Periodontite (Taba *et al.*, 2005). A abordagem proteômica possibilita o estudo integrado delas em diferentes condições periodontais. Ainda existem poucos estudos na literatura caracterizando o perfil proteico do FCG através de técnicas proteômicas abrangentes (shotgun), quando comparado à quantidade de estudos utilizando outros fluidos corporais como plasma, urina e fluido cerebroespinal (Hu *et al.*, 2006).

Devido à pequena quantidade de fluido coletado, e consequente limitação na quantidade de amostra que pode ser obtida para esse propósito, poucos estudos foram conduzidos utilizando o FCG. A abordagem da MS em combinação com separação multidimensional de proteínas possibilita uma identificação ampla e precisa de proteínas, num curto espaço de tempo, de analitos de uma amostra complexa (Aebersold e Mann, 2003).

Durante a coleta do FCG, apesar de todas as precauções para evitar contaminação por placa bacteriana, é comum que haja a identificação de proteínas não humanas, afinal no sulco gengival diversas espécies de microrganismos estão presentes, em saúde ou doença periodontal. Em alguns estudos, são detectadas proteínas provenientes de bactérias (Grant *et al.*, 2010; Baliban *et al.*, 2012), fungos (Carneiro, Nouh e Salih, 2014) e vírus (Bostanci *et al.*, 2010; Bostanci *et al.*, 2013).

Até a presente data, todos os estudos com FCG utilizando a tecnologia de MS se restringiram a caracterizar o perfil proteico das diferentes condições periodontais (saúde periodontal, Gengivite e Periodontite) (Bostanci *et al.*, 2010; Grant *et al.*, 2010; Ngo *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011; Baliban *et al.*, 2012; Bostanci *et al.*, 2012; Carneiro *et al.*, 2012; Tsuchida *et al.*, 2012; Silva-Boghossian *et al.*, 2013; Carneiro, Nouh e Salih, 2014). Nenhum estudo analisou fatores de risco para a PC, como em

pacientes com DM2, com exceção de um estudo que incluiu fumantes em sua amostra, outro fator de risco a PC, mas não dividiu em categorias diferentes (Huynh *et al.*, 2014).

2. PROPOSIÇÃO

Testar a hipótese de que há expressão diferenciada no perfil de proteínas no fluido gengival crevicular de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite Crônica em comparação com grupos controle.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho e população do estudo

Este foi um estudo clínico transversal, caso-controle, exploratório. Vinte pacientes foram selecionados para participar do presente estudo. Dez pacientes com diagnóstico de DM2 foram recrutados no ambulatório de Nutrologia do Hospital Universitário Clementino Fraga da UFRJ e dez pacientes sem DM2 ou fatores de risco para PC foram recrutados no Departamento de Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFRJ. Dentre os pacientes com DM2, cinco apresentavam PC e cinco eram saudáveis periodontalmente. Dentre os pacientes sem DM2, cinco apresentavam PC e cinco eram saudáveis periodontalmente. Em suma, os 20 pacientes recrutados foram divididos em quatro grupos, e os grupos foram denominados da seguinte forma:

- DP – 5 pacientes com DM2 e PC
- DS – 5 pacientes com DM2 e saudáveis periodontalmente
- SP – 5 pacientes sem DM2 e com PC
- SS – 5 pacientes sem DM2 e saudáveis periodontalmente

Todos os participantes foram informados sobre a natureza e objetivo do estudo, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes de entrarem no estudo (em anexo). O protocolo de tratamento e coleta dos dados foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho da UFRJ (CAAE: 30865614.6.0000.5257).

Para ser incluído no estudo, o paciente tinha que ter no mínimo 14 dentes, ter entre 45 e 65 anos e diagnóstico clínico de Periodontite Crônica ou saúde periodontal. Para serem classificados com PC, os pacientes deveriam apresentar pelo menos 4 sítios não adjacentes com PBS $\geq$ 5mm ou Nível Clínico de Inserção (NCI) $\geq$ 4mm, com sangramento à sondagem. Foram classificados com ausência de PC os pacientes com $\leq$ 10% dos sítios com sangramento à sondagem, PBS e NCI $\leq$ 3mm (Page e Eke, 2007). Os pacientes com DM2 tinham que apresentar níveis de HbA1c $\geq$ 7 ou $\leq$ 10, com exame feito no laboratório da instituição, no máximo 3 meses antes da coleta dos dados. Todos os pacientes estavam em tratamento com hipoglicemiantes orais e/ou insulina, comparecendo às consultas e seguindo as orientações dos médicos do respectivo setor.

3.2. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: realização de tratamento periodontal ou profilaxia oral 6 meses antes do exame inicial, fumo, terapia antibiótica 6 meses anteriormente ao exame inicial, uso de antiinflamatórios não esteroidais, uso de medicação imunossupressora, possuir outras doenças sistêmicas que poderiam influenciar nos parâmetros periodontais ou no perfil imunológico tais como, osteoporose, doenças autoimunes, imunodeficiência primária ou secundária, HIV positivo, gravidez, ou lactação. Não apresentar sinais e sintomas de diagnóstico de Periodontite Agressiva.

No grupo controle sem o DM2, os pacientes não poderiam apresentar nenhum fator de risco sistêmico que pudesse interferir nos resultados, portanto não entraram pacientes com relato de doenças sistêmicas tais como, hipertensão, osteoporose, HIV positivo, transplantados, doenças auto-imunes, etc.

3.3. Exame e Tratamento Periodontal

Nos indivíduos selecionados foram obtidos os parâmetros clínicos por um único examinador, em 6 sítios por dente, com uma sonda periodontal milimetrada UNC-15 (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). Os parâmetros utilizados para se determinar a condição periodontal foram a PBS, o NCI e o índice de sangramento gengival (ISG) introduzido por Ainamo e Bay (1975). Como referência foi utilizada a margem gengival para medir a PBS, a junção cimento-esmalte para o NCI, e a ausência ou presença de sangramento à sondagem para o ISG.

Os pacientes com diagnóstico de PC foram tratados com raspagem e alisamento radicular em todos os sítios doentes e encaminhados à clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFRJ para acompanhamento e manutenção.

Os pacientes receberam tratamento periodontal básico, que consiste em raspagem e alisamento radicular com instrumentos ultrassônicos (Cavitron-Dentsply) e manuais (Curetas Hu-Friedy). Para a raspagem supragengival, foram realizadas consultas de aproximadamente 1 hora em ambas as arcadas superior e inferior. Na sequência do tratamento foi realizado raspagem subgengival e alisamento radicular em sítios exibindo profundidade de bolsa ≥ 5 mm ou ≥ 4 mm com sangramento à sondagem. O tratamento foi realizado sob anestesia local, em consultas de

aproximadamente 1 hora, com o número de consultas variável com a necessidade de atenção às áreas específicas. Todo o tratamento foi conduzido pelo examinador e pesquisador principal especialista em Periodontia. Os pacientes foram orientados com técnicas de higiene oral com o uso de escova e fio dental. A escova interdental e/ou unitufo foram recomendadas a partir da necessidade individual. A instrução de higiene foi reforçada em todas as sessões de terapia periodontal.

3.4. Calibração intra-examinador

Com a finalidade de calibração do examinador, cinco indivíduos não incluídos no estudo, com diagnóstico de periodontite crônica, com sítios de gravidade moderada à grave, foram submetidos ao exame periodontal. O examinador avaliou os indivíduos em dois momentos, com pelo menos 1 hora de intervalo. O grau de confiabilidade dos valores de PBS e NCI registrados foram determinados pelo software SPSS Statistics 21 (IBM Brasil, São Paulo, SP, Brasil), onde foi encontrado como >90% no índice de correlação intraclass (ICC).

3.5. Coleta de amostras do fluido gengival

A coleta do FCG foi realizada uma semana após a realização do exame clínico periodontal. Foram coletadas quinze amostras de FCG por paciente. Foram aplicadas duas estratégias para a coleta das amostras:

- Nos pacientes com PC foram utilizados apenas os sítios com PBS $\geq$ 5mm, priorizando os sítios de maior profundidade. A coleta foi repetida nos mesmos sítios até completar 15 amostras, no caso de o paciente não ter 15 sítios doentes.
- Nos pacientes com saúde periodontal foram utilizados os sítios com PBS $\leq$ 3mm, sem sangramento, na região distal de dentes não adjacentes, 7-8 tiras da arcada superior ou inferior, divididos entre elementos anteriores e posteriores.



Figura 1. Coleta do FCG com tira de Periopaper

O FCG foi coletado utilizando tiras de Periopaper (OraFlow Inc., Amityville, NY, USA). O local da coleta foi isolado com gaze estéril, removida a placa supragengival, se presente, com uma cureta estéril, e a área secada com jato de ar da seringa tríplice. A coleta foi realizada previamente a qualquer intervenção, para evitar sangramento. As amostras visivelmente contaminadas com sangue foram descartadas. As tiras foram inseridas cerca de 1mm na entrada da bolsa/sulco durante 30s a 1 min, visando a otimização da coleta. Em seguida, o volume foi mensurado utilizando um Periotron 8000 (OraFlow Inc., Amityville, NY, USA). As amostras foram imediatamente colocadas em tubos de Eppendorff (Axygen Scientific, Inc., Union City, USA), inseridas em gelo para transporte (realizado em menos de 2 horas) até o armazenamento a - 20°C para posterior análise.



Figura 2. Periotron 8000



Figura 3. Inserção da tira de Periotron nos eletrodos do Periotron 8000

Os valores dados pelo Periotron 8000 foram transformados em volume real (μL) através da construção de uma curva padrão, pela equação polinomial de quarto grau ($y=ax^4+bx^3+cx^2+dx+e$). Para calibração do Periotron 8000 foi usada uma microseringa tipo Hamilton (volume máximo de $2\ \mu\text{L}$, com graduações de $0,02\ \mu\text{L}$) para adição de volumes conhecidos (saliva humana) a cada $0,1\ \mu\text{L}$ nas tiras de Periotron. Cada volume foi mensurado três vezes e a média desses valores foi usada para a construção da curva padrão.

3.6. Análise Estatística

Foi usado o programa estatístico SPSS Statistics 21 (IBM Brasil, São Paulo, SP, Brasil) para as análises dos resultados clínicos. A média dos parâmetros clínicos (PBS, NCI e ISG) de boca inteira de cada paciente foram utilizadas para a obtenção das médias de cada grupo. Também foi usado o volume obtido em cada tira de Periotron dos 15 sítios coletados de cada paciente para a obtenção das médias do volume de FCG de cada grupo. Diferenças significativas nos parâmetros clínicos e demográficos entre os grupos de estudo foram determinadas através dos testes Kruskal- Wallis e MannWhitney.

3.7. Análise Proteômica

A análise proteômica foi realizada na Unidade Multidisciplinar de Genômica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, e na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, no Instituto de Bioquímica Médica, ambas unidades da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A análise proteômica incluiu etapas de extração de proteínas, digestão das proteínas e espectrometria de massas para identificação e análise quantitativa das

proteínas. O método utilizado foi livre de gel, por marcação com “tags” isobáricos. O método, denominado iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) - (Ross *et al.*, 2004) permite marcar peptídeos de diferentes amostras com reagentes isótopos estáveis, possibilitando a quantificação relativa de proteínas em diversas amostras num só experimento. Para a preparação das amostras foi utilizado o kit 4plex de reagentes iTRAQ para proteínas (Applied Biosystem, Carlsbad, CA - USA).

3.7.1. Preparação das amostras de fluido gengival

Para a eluição das proteínas, as tiras de Periopaper de cada paciente (n=15) foram eluídas em 150 µL de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 100mM e, em seguida, sonicadas durante um minuto. Para a remoção de possíveis restos celulares e restos do papel, as amostras foram centrifugadas (12000g, 5 min). O sobrenadante de cada amostra foi combinado de acordo com a condição, totalizando 4 tubos, com em torno de 500 µL. As tiras que restaram no tubo foram estocadas.

A concentração de proteína de cada grupo de amostras foi quantificada usando o kit de ensaio proteico (Bio-Rad®), de acordo com as instruções do fabricante. Foram retiradas alíquotas correspondendo a 200ug de proteína solúvel total de cada amostra. As amostras foram evaporadas em *Speed-Vac* até o volume de em torno 30 a 40uL de amostra de proteína. Em seguida, em cada um dos quatro tubos, foram realizadas as etapas usando os reagentes do kit iTRAQ desnaturação, redução de pontes de enxofre, bloqueio das cisteínas e digestão das proteínas:

- Desnaturação e redução das proteínas: Foram adicionados 2µL do reagente “Denaturant” do kit iTRAQ (SDS 2%), 4µL do reagente “Reducing Reagent” do kit iTRAQ (tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 50mM) seguido de incubação por 60 minutos a 60°C.
- Alquilação das cisteínas: Foram adicionados 2µL do reagente “Cysteine-Blocking Reagent” do kit iTRAQ (metil metanetilsulfonato (MMTS) 200mM em isopropanol) seguido de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente.
- Digestão das proteínas com tripsina: Foram adicionados 8µL de tripsina (1µg/µL) (Promega Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, reconstituída em bicarbonato de amônio 25mM pH 8, conforme instruções do fabricante), para uma proporção de tripsina:proteína total = 1:25 (w/w) e incubou-se durante 16 horas a 37°C.

Com o objetivo de purificar os peptídeos para a marcação e eliminar o bicarbonato de amônio por sua incompatibilidade com os marcadores do iTRAQ, os produtos de cada digestão foram purificados em uma coluna de fase reversa (C18, Oasis HLB Cartridge, Waters). As amostras foram primeiramente acidificadas pela adição de ácido fórmico, na concentração final de 2%. Verificado o pH em torno de 3-4, as amostras foram centrifugadas (12.000 g , 15 min). A coluna foi condicionada com 1 mL de metanol, e equilibrada com 1 mL de H₂O. A amostra foi aplicada na coluna, e esta foi lavada com 1mL de metanol 5% + TFA 0,1%. Os peptídeos foram eluídos com 1mL de metanol 99,9% + TFA 0,1%. O eluato foi seco a vácuo, em *Speed-Vac*.

As misturas de peptídeos foram ressuspensas em 30 µL “Dissolution Buffer” (kit iTRAQ) e foi verificado o pH<7. A marcação foi feita de acordo com as instruções do fabricante do kit iTRAQ (iTRAQ™ Reagents Methods Development Kit). Utilizamos os reagentes iTRAQ 114, 115, 116 e 117, sendo os isóbaros: (A) 114 DP; (B) 115 DS; (C) 116 SP e (D) 117 SS. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 60 minutos. Após a marcação, as amostras foram então combinadas em um novo tubo.

Seguiu-se uma etapa de purificação de peptídeos para remover detergentes, utilizando coluna Pierce® Detergent Removal Spin Columns (Thermo Cientific, Rockford, IL, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente o pH das amostras foi acidificado para pH 3,0 por adição de 20 volumes de KH₂PO₄ 10 mM /acetonitrila 25% pH 3,0 (tampão de carregamento). A coluna foi condicionada com este mesmo tampão, centrifugando-se a 2000 g por 5 min. A amostra foi aplicada, repetindo-se a etapa de centrifugação. Em seguida foi feita a lavagem adicionando-se 400 µL de tampão de carregamento seguido de centrifugação. Finalmente os peptídeos foram eluídos por adição de 400 µL de KH₂PO₄ 10mM /acetonitrila 25%/ KCl 1 M pH 3,0 e centrifugação. Com o objetivo de remover os outros reagentes, como tags de massa não incorporados e sais, a amostra foi em seguida passada em uma coluna de fase reversa Oasis HLB Cartridge (Waters Corp., Millford, MA, USA), como descrito anteriormente. O eluato com os peptídeos foi seco a vácuo, em *Speed-Vac*. O resumo da preparação de amostras pode ser visualizada na figura 5.

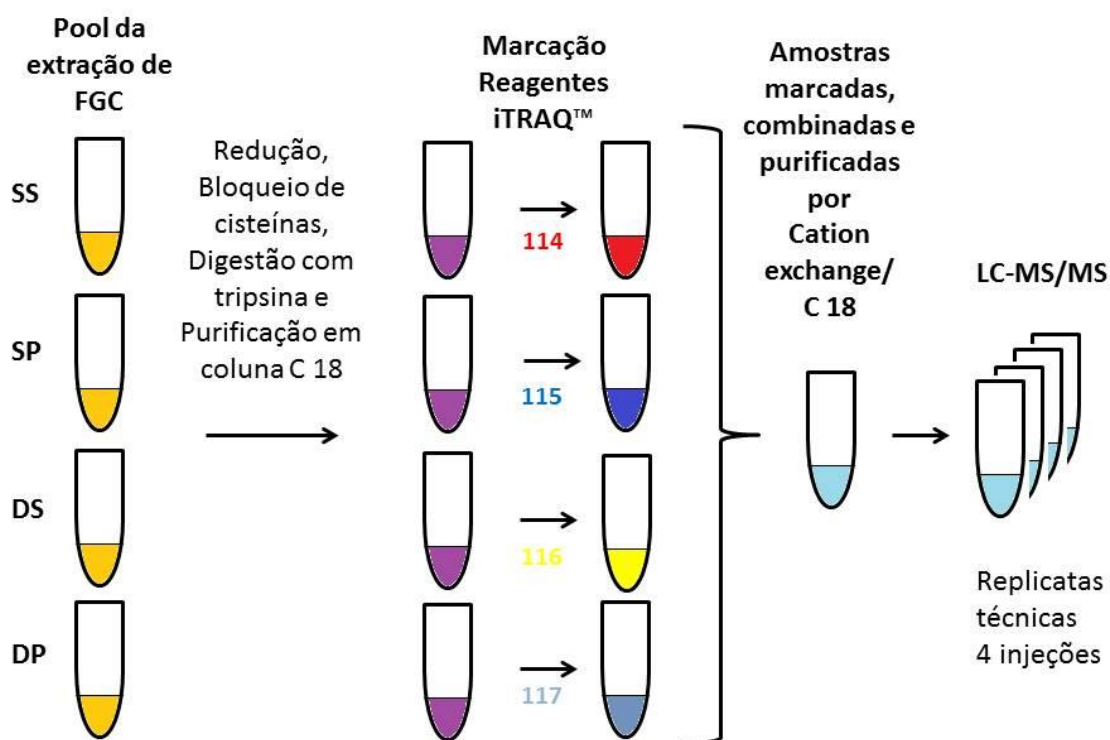


Figura 4. Esquema de preparação das amostras de proteínas do FGC para análise em espectrometria de massas LC-MS/MS.

3.7.2. Análise por LC-MS/MS

A amostra foi ressuspensa em 200 μ L de formiato de amônio 5 mM, acetonitrila 5% pH 3,2, misturada em vortex e centrifugada a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi recuperado e 10 μ L desta solução foi injetada em LC-MS/MS. A análise foi feita em sistema LC-MS/MS no equipamento QUADRUPOLO-ORBITRAP Q-Exactive Plus (Thermo Cientific, Rockford, IL, EUA) no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem, Instituto de Química (UFRJ). O instrumento estava acoplado a sistema nanoLC Easy (Thermo Cientific, Rockford, IL, EUA). A configuração da cromatografia foi baseada no método de Liu et al. (2006), com algumas modificações. Consistiu em uma cromatografia líquida que incluiu uma pré coluna fase reversa (nanoACQUITY BEH130 C18, Waters) e uma coluna analítica C18 (Thermo Cientific, Rockford, IL, EUA).

Os peptídeos eluídos da pré coluna foram separados na coluna analítica de fase reversa usando um gradiente linear de 0,1% de ácido fórmico em água (fase móvel A) e 0,1% ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B) durante 60 minutos executados pela bomba binária. O gradiente consistiu de 5 minutos em 95% de A e 5% de B, em seguida, 5-25 minutos, 60% de A e 40% de B, 25-30 minutos, 15% de A e 85% de B, 30-40 minutos, 15% de A e 85% de B, 40- 42,5 minutos, 95 de A e 5% de B, seguido por reequilíbrio da coluna (95% de A e 5% de B) de 42,5-60 minutos a uma taxa de fluxo de 300 nL/min. A mistura de peptídeos foi injetada e analisada quatro vezes, compondo as réplicas técnicas.

Os espectros de massas foram adquiridos em íon positivo. O analisador Quadrupolo foi calibrado com os íons fragmentos de MS/MS [GLU1]-fibrinopeptídeo B (SigmaAldrich, St. Louis, MO) (GFP, 100 fmol/μL em 50:50:1, metanol: H₂O: ácido acético) de 50 a 2000 m/z. O íon precursor GFP m/z 785.8426 com dupla carga foi utilizado como correção de massa de bloqueio para medições precisas de aquisição de pós MS. Foi utilizada aquisição de DDAMS² “Data Dependent Acquisition” sendo escolhidos os 20 ions precursores mais intensos (Top 20) para a fragmentação. O capilar e cone tensão foram fixados em 3700 V, respectivamente. O tempo de varredura foi fixado em 1 segundo e o intervalo de varredura de pesquisa de MS foi 150-2000 Da. O número máximo de íons precursores selecionados para a fragmentação (MS/MS) foi três íons de carga 2, 3 ou 4, detectados a partir de uma varredura única de MS. O MS/MS foi obtido a uma taxa de varredura de 1 segundo, adquiridos ao longo da faixa de 50 a 2000Da. A energia normalizada de colisão foi elevada de acordo com a m/z e estado de carga iônica do precursor a 30 NCE. O controle do equipamento, a aquisição e análise de dados, visualização dos espectros de massa e armazenamento dos dados foram feitas através do software TraceFinder Forensics 2.3 e Xcalibur (ThermoScientific).

3.7.3. Processamento de dados e identificação de proteínas

Os espectros MS/MS foram armazenados em arquivos .raw, e processados utilizando o programa Peaks 7.0 (Bioinformatic Solutions). Foram usados como parâmetros, falha na clivagem por tripsina, 1; modificação fixa, carbamidometilação de cisteína; modificação variável, oxidação de metionina. Quantificação iTRAQ 4 plex. Para busca foi usado o banco de dados *homo sapiens* 2015 presente no

UNIPROT. As identificações de proteínas foram estabelecidas pela detecção de peptídeos únicos e valor de FDR < 1%.

3.7.4. Análise Quantitativa

A quantificação relativa de proteínas foi obtida utilizando o programa PEAKS 7.0 (Bioinformatic Solutions). O programa apresenta o valor de confiança de cada proteína identificada através do valor de $-10 \cdot \log_{10}$ (valor de p) ($-10\lg P$) do peptídeo. Para determinar o valor de confiança do peptídeo, o programa PEAKS 7.0 usa uma função discriminativa linear para mensurar a qualidade do espectro do peptídeo correspondente e o valor é convertido para um valor de p. Posteriormente, o valor de P é convertido para $-10\lg P$, sendo assim, quanto maior for o valor de $-10\lg P$, maior a significância da correspondência com a proteína. O peptídeo de suporte foi considerado de alta confiança se o valor de $-10\lg P$ foi maior do que 20, ou seja, se o valor de p foi menor de 1%.

Em seguida, foram excluídas as entradas duplicadas e as identificações de vírus, resultando assim uma “hit list” de proteínas de alta confiança com identificações apenas de proteínas humanas. Das proteínas identificadas, foram consideradas para a análise apenas as que tiveram a quantificação em todos os grupos do estudo. As proteínas quantificadas foram classificadas por categoria funcional e localização celular de acordo com informações do banco de dados Uniprot e links associados.

Foram registradas as razões entre os marcadores 114:115, 114:116 e 114:117 (comparação entre o grupo sem DM2 e com saúde periodontal (SS), com os grupos de doença (SP, DS, DP)). As razões entre os marcadores foram então exportados para Microsoft Office Excel e foi feita a comparação entre os marcadores 115:117 e 116:117 (comparação entre o grupo com DM2 e PC (DP), com o grupo sem DM2 e com PC (SP), e o grupo com DM2 e saúde periodontal (DS)).

Apenas foram consideradas como diferencialmente expressas as proteínas cujas mudanças na razão apresentavam valores maiores que 1,25 ou menores que 0,75 e um valor de p < 0,05. A partir deste ponto foram analisadas separadamente as comparações: 114:115, 114:116, 114:117, 115:117 e 116:117.

4. RESULTADOS

4.1. Dados clínicos e demográficos

Os dados clínicos e demográficos da população de estudo estão demonstrados na tabela 1. Os grupos dessa população apresentaram características compatíveis em idade e ausências dentárias ($p>0,05$, teste de Kruskal-Wallis).

O exame clínico periodontal mostrou média significativamente mais alta na PBS e NCI nos grupos DP e SP que nos grupos DS e SS ($p<0,01$, teste de Mann-Whitney). A média de % de sítios com ISG foi significativamente mais alta nos grupos DP e DS, que nos grupos DS e SS ($p<0,01$, teste de Mann-Whitney). Os grupos de PC, DP e SP não tiveram diferença significativa entre si, com média na PBS $3,49\pm1,36$ e $3,34\pm1,46$, média no NCI $3,84\pm1,63$ e $4,09\pm1,78$, e no ISG 32% e 28%, respectivamente. Os grupos de saúde periodontal, DS e SS não tiveram diferença significativa entre si, com média na PBS $2,28\pm0,76$ e $2,21\pm0,79$, e média no NCI $2,31\pm0,77$ e $2,31\pm0,77$, e no ISG 5% e 3%, respectivamente.

Dentre os sítios coletados, as médias de PBS, NCI e % de ISG dos grupos DP e SP foi significativamente maior que nos grupos DS e SS ($p<0,01$, teste de Mann-Whitney). Os grupos de PC, DP e SP não tiveram diferença significativa entre si, com média na PBS $5,86\pm1,13$ e $6,55\pm1,57$, média no NCI $6,26\pm1,48$ e $7,20\pm1,69$, e no ISG 81% e 72%, respectivamente. Os grupos de saúde periodontal, DS e SS não tiveram diferença significativa entre si, com média na PBS $2,75\pm0,54$ e $2,74\pm0,56$, e média no NCI $2,79\pm0,59$ e $2,81\pm0,62$, respectivamente. Nos grupos de saúde periodontal não foram coletados sítios com presença de sangramento à sondagem.

O volume de fluido gengival coletado por tira de periopaper foi diferente entre os grupos, sendo significativamente mais alto dos grupos DP e SP, que nos grupos DS e SS ($p<0,01$, teste de Mann-Whitney). Foram compatíveis entre si, não havendo diferença significativa entre os grupos com PC, com $0,75\pm0,22$ (DP) e $0,72\pm0,21$ (SP) por tira, respectivamente, e entre os grupos com saúde periodontal, com $0,58\pm0,21$ (DS) e $0,58\pm0,26$ (SS) por tira, respectivamente.

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos da população do estudo.

VARIÁVEIS	GRUPOS			
	DP	DS	SP	SS
Idade (anos)	58,2±6,90	54,6±8,01	51,4±5,59	58,0±6,12
Gênero (F)	2	3	3	3
(M)	3	2	2	2
Dentes ausentes (%)	7,0±5,56	6,8±2,68	6,4± 3,05	5,8±5,63
<i>Todos os sítios</i>				
PBS (mm)	3,49±1,36*	2,28±0,76	3,34±1,46*	2,21±0,79
NCI (mm)	3,84±1,63*	2,31±0,77	4,09±1,78*	2,29±0,81
ISG (%)	32*	5	28*	3
<i>Sítios coletados</i>				
PBS (mm)	5,86±1,13*	2,75±0,54	6,55±1,57*	2,74±0,56
NCI (mm)	6,26±1,48*	2,79±0,59	7,20±1,69*	2,81±0,62
ISG (%)	81*	0	72*	0
Volume de fluido coletado (µL)	0,75±0,22*	0,58±0,21	0,72±0,21*	0,58±0,26

PBS, Profundidade de bolsa à sondagem; NCI, Nível de inserção clínico; ISG, Índice de sangramento à sondagem; SS, sem diabetes e saudável periodontalmente; SP, sem diabetes e periodontite; DS, diabetes e saudável periodontalmente; DP, diabetes e periodontite.

O asterisco indica diferença estatisticamente significativa referente ao grupo saudável (SS) (Teste de Mann-Whitney, Teste-U, $p < 0,01$).

4.2. Identificação e Quantificação de proteínas marcadas por iTRAQ

No presente estudo as proteínas extraídas das tiras de papel foram marcadas utilizando tags isobáricos de iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) para identificar proteínas diferencialmente expressas nas amostras de diferentes condições. Posteriormente as amostras foram combinadas, para serem submetidas à análise de LC-MS/MS. Foram realizadas 4 replicatas técnicas.

No total, 361 proteínas humanas foram identificadas com alto grau de confiança (valor $p > 0,01$) (Anexo 1). A maior parte delas não foi marcada pelos tags de iTRAQ, portanto não foi possível fazer a quantificação das mesmas. Um total de 187 proteínas humanas foram identificadas e marcadas por iTRAQ nas quatro

condições de estudo (Tabela 2), e foram identificadas diferenças significativas nas concentrações em 104 delas (Tabela 3). Dentre elas, 49 foram relacionadas à inflamação/resposta imune, 47 à estrutura/adesão celular, 26 ao metabolismo, 19 ao transporte, 20 à diferenciação celular/ligante de nucleotídeos, 13 à regulação de enzimas/proteínas e 13 pertencentes a outras categorias. A distribuição das proteínas por função biológica e localização celular nas amostras de estudo está demonstrada na figura 6.

Tabela 2. Lista das 187 proteínas identificadas e quantificadas por marcadores de iTRAQ com sua respectiva função e localização celular, busca por UniProt/SwissProt.

Accesso	-10lgP	Cober- tura (%)	#Peptí- deos	#Único	Massa Média (Da)	Descrição	Função	Localização celular
sp P52209 6PGD_HUMAN	98.78	13	5	5	53140	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Metabolismo / Enzima Hidrolítica	Citoplasma
sp P60709 ACTB_HUMAN	315.69	60	39	6	41737	Actin, cytoplasmic 1	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp P63261 ACTG_HUMAN	315.69	60	39	6	41793	Actin, cytoplasmic 2	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp Q6JQN1 ACD10_HUMAN	26.81	2	2	1	11883 4	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	Metabolismo	Mitocôndria
sp Q01518 CAP1_HUMAN	73.35	6	3	3	51902	Adenylyl cyclase-associated protein 1	Estrutura do citoesqueleto/Polaridade de celular	Membrana
sp P02763 A1AG1_HUMAN	215.12	34	11	8	23512	Alpha-1-acid glycoprotein 1	Transporte/Resposta imune	Extracelular
sp P19652 A1AG2_HUMAN	146.88	26	6	3	23603	Alpha-1-acid glycoprotein 2	Transporte Resposta imune	Extracelular
sp P01009 A1AT_HUMAN	245.93	47	18	18	46737	Alpha-1-antitrypsin	Inibidor de protease/Resposta de fase aguda	Extracelular
sp P04217 A1BG_HUMAN	124.08	16	8	8	54254	Alpha-1B-glycoprotein	Não conhecida	Extracelular
sp P08697 A2AP_HUMAN	48.07	6	4	3	54566	Alpha-2-antiplasmin	Inibidor de protease/Resposta de fase aguda	Extracelular
sp P02765 FETUA_HUMAN	118.82	17	7	5	39325	Alpha-2-HS-glycoprotein	Resposta de fase aguda/Metabolismo	Extracelular

sp P01023 A2MG_HUMAN	339.87	37	57	52	163290	Alpha-2-macroglobulin	óseeo Inibidor de proteases/coagulação sanguínea	Extracelular
sp P12814 ACTN1_HUMAN	30.10	4	3	3	103058	Alpha-actinin-1	Organização celular	Citoplasma/Membrana
sp P04745 AMY1_HUMAN	144.80	12	5	5	57768	Alpha-amylase 1	Ligante de íons	Extracelular
sp P06733 ENOA_HUMAN	233.27	46	20	13	47169	Alpha-enolase	Resposta imune/Crescimento celular	Extracelular/Núcleo
sp P04920 B3A2_HUMAN	21.92	3	2	2	137009	Anion exchange protein 2	Transporte intracelular	Membrana
sp P04083 ANXA1_HUMAN	72.23	12	3	3	38714	Annexin A1	Resposta imune/Ligante ao cálcio/ Antiapoptose	Extracelular/Membrana/Núcleo/Citoplasma
sp P02647 APOA1_HUMAN	236.00	63	21	17	30778	Apolipoprotein A-I	Metabolismo/transporte de lipídeos	Extracelular
sp Q7Z591 AKNA_HUMAN	30.75	2	4	4	155139	AT-hook-containing transcription factor	Fator de transcrição	Núcleo
sp P20160 CAP7_HUMAN	57.66	8	2	2	26886	Azurocidin	Resposta imune	Extracelular/Citoplasma
sp Q5T4J0 GCNT6_HUMAN	28.51	4	2	1	44527	Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 6	Metabolismo/Glicosilação de proteínas	Citoplasma/Golgi
sp P02749 APOH_HUMAN	33.14	3	1	1	38298	Beta-2-glycoprotein 1	Transporte/Coagulação	Extracelular
sp Q9UIF8 BAZ2B_HUMAN	39.20	1	4	2	240457	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B	Fator de transcrição	Núcleo
sp P62158 CALM_HUMAN	78.95	11	2	1	16838	Calmodulin	Regulador de enzimas/ Tradução de sinal	Citoplasma
sp P27482 CALL3_HUMAN	62.36	19	3	2	16891	Calmodulin-like protein	Ligante de cálcio	Extracelular

UMAN						3		
sp P27797 CALR_HUMAN	75.36	10	4	4	48142	Calreticulin	Síntese de Proteínas/Regulador de tradução	Citoplasma/RE
sp Q9UDT6 CLIP2_HUMAN	24.05	2	3	1	115837	CAP-Gly domain-containing linker protein 2	Liga microtúbulos ao corpo lamelar dendrítico	Citoplasma
sp P04040 CATA_HUMAN	72.32	7	3	3	59756	Catalase	Metabolismo/Proteção celular	Citoplasma/Peroxisoma
sp P49913 CAMP_HUMAN	60.97	12	2	2	19301	Cathelicidin antimicrobial peptide	Resposta imune	Extracelular
sp P08311 CATG_HUMAN	47.57	11	3	2	28837	Cathepsin G	Resposta imune/Proteólise	Membrana/Extracelular
sp citoes CD2AP_HUMAN	22.07	1	1	1	71451	CD2-associated protein	Estrutura do citoesqueleto/Divisão celular	Citoplasma
sp O43264 ZW10_HUMAN	33.41	2	2	1	88830	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	Divisão celular	Citoplasma
sp P00450 CERU_HUMAN	152.78	10	8	8	122205	Ceruloplasmin	Transporte de íons	Extracelular
sp P53621 COPA_HUMAN	33.41	3	4	4	138345	Coatomer subunit alpha	Metabolismo/Transporte intracelular	Citoplasma
sp P23528 COF1_HUMAN	107.11	21	3	3	18502	Cofilin-1	Estrutura do citoesqueleto	Membrana/Núcleo/Citoplasma
sp A6NC98 CC88B_HUMAN	29.81	1	1	1	164808	Coiled-coil domain-containing protein 88B	Não conhecida	Membrana
sp Q01955 CO4A3_HUMAN	33.90	4	6	5	161812	Collagen alpha-3(IV) chain	Organização Celular	Extracelular
sp P01024 CO3_HUMAN	333.88	35	59	57	187147	Complement C3	Resposta imune	Extracelular
sp P0C0L4 CO4A_HUMAN	145.26	7	13	11	192784	Complement C4-A	Resposta imune/Ativação do complemento	Extracelular
sp P0C0L5 CO4B_HUMAN	145.26	7	13	11	192750	Complement C4-B	Resposta imune/Ativação do	Extracelular

sp P00751 CFAB_HUMAN	142.58	6	4	4	85533	Complement factor B	complemento Resposta imune/Ativação do complemento	Extracelular
sp P31146 COR1A_HUMAN	124.25	15	8	8	51026	Coronin-1A	Resposta imune/Organização celular	Membrana/Citoplasma
sp P08185 CBG_HUMAN	22.66	7	2	2	45141	Corticosteroid-binding globulin	Transporte	Extracelular
sp P01040 CYTA_HUMAN	208.65	90	9	8	11006	Cystatin-A	Inibidor de protease	Citoplasma
sp P04080 CYTB_HUMAN	190.39	88	10	9	11140	Cystatin-B	Inibidor de protease	Citoplasma/Núcleo
sp P54108 CRIS3_HUMAN	27.26	3	1	1	27630	Cysteine-rich secretory protein 3	Resposta imune	Extracelular
sp Q8NEU8 DP13B_HUMAN	23.06	5	2	2	74493	DCC-interacting protein 13-beta	Proliferação celular	Núcleo/Citoplasma
sp Q6UWP2 DHR11_HUMAN	25.58	5	1	1	28308	Dehydrogenase/reductase SDR family member 11	Atividade de oxidoreductase	Extracelular
sp P15924 DESP_HUMAN	37.31	1	4	1	331774	Desmoplakin	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp Q5KSL6 DGKK_HUMAN	28.80	1	1	1	141829	Diacylglycerol kinase kappa	Metabolismo/Coagulação	Membrana/Citoplasma
sp P78527 PRKDC_HUMAN	54.06	2	9	3	469093	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	Fator de transcrição/Resposta imune	Núcleo
sp Q8NG06 TRI58_HUMAN	24.05	1	1	1	54766	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM58	Regulação de proteínas	Citoplasma
sp Q9Y6C2 EMIL1_HUMAN	21.91	1	1	1	106667	EMILIN-1	Adesão celular	Extracelular
sp Q01469 FABP5_HUMAN	91.10	28	4	4	15164	Fatty acid-binding protein, epidermal	Metabolismo/Transporte	Citoplasma
sp P02671 FIBA_HUMAN	100.02	8	9	7	94973	Fibrinogen alpha chain	Coagulação/Tradução de sinal	Extracelular

sp P02675 FIBB_HUMAN	166.08	26	12	10	55928	Fibrinogen beta chain	Coagulação	Extracelular
sp P02751 FINC_HUMAN	92.15	3	6	5	262622	Fibronectin	Adesão celular/Resposta de fase aguda	Extracelular
sp Q5CZC0 FSIP2_HUMAN	35.00	2	13	9	780624	Fibrous sheath-interacting protein 2	Metabolismo	Citoplasma/Mitocôndria
sp P21333 FLNA_HUMAN	21.21	3	6	4	280737	Filamin-A	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp P04075 ALDOA_HUMAN	123.08	15	6	6	39420	Fructose-bisphosphate aldolase A	Metabolismo/Glicólise	Extracelular/ Citoplasma
sp P06396 GELS_HUMAN	242.59	29	23	20	85697	Gelsolin	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp P06744 G6PI_HUMAN	145.15	12	7	7	63147	Glucose-6-phosphate isomerase	Enzima glicolítica/Motilidade endotelial	Extracelular/Citoplasma
sp P09211 GSTP1_HUMAN	157.02	33	7	6	23356	Glutathione S-transferase P	Resposta imune/Apoptose	Citoplasma/Núcleo
sp P04406 G3P_HUMAN	174.37	40	17	14	36053	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Metabolismo/Glicólise	Membrana/Núcleo/Citoplasma
sp P00738 HPT_HUMAN	245.59	34	18	17	45205	Haptoglobin	Metabolismo/Resposta de fase aguda	Extracelular
sp P08107 HSP71_HUMAN (P0DMV8 e P0DMV9)	171.44	25	17	11	70052	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	Metabolismo	Citoplasma
sp P11142 HSP7C_HUMAN	141.02	18	12	6	70898	Heat shock cognate 71 kDa protein	Resposta imune/Transcrição de sinal	Citoplasma/Núcleo
sp P04792 HSPB1_HUMAN	52.40	9	2	2	22783	Heat shock protein beta-1	Ativação de actina/Resistência à estresse	Núcleo/Citoplasma
sp P69905 HBA_HUMAN	230.67	62	11	11	15258	Hemoglobin subunit	Transporte de oxigênio	Citoplasma

MAN						alpha		
sp P68871 HBB_HUMAN	257.68	73	12	12	15998	Hemoglobin subunit beta	Transporte	Extracelular
MAN						alpha		
sp P02790 HEMO_HUMAN	164.84	20	10	9	51676	Hemopexin	Transporte do heme	Extracelular
MAN						alpha		
sp O60812 HNRC1_HUMAN	26.07	3	2	1	32142	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	Ligante de nucleotídeo	Núcleo
MAN						alpha		
sp B2RXH8 HNRC2_HUMAN	26.07	3	2	1	32072	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 2	Ligante de nucleotídeo	Núcleo
MAN						alpha		
sp Q02539 H11_HUMAN	33.12	8	2	2	21842	Histone H1.1	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp P16403 H12_HUMAN	33.12	7	2	1	21365	Histone H1.2	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp P16402 H13_HUMAN	33.12	4	1	1	22350	Histone H1.3	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp P10412 H14_HUMAN	33.12	4	1	1	21865	Histone H1.4	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp P22492 H1T_HUMAN	33.12	4	1	1	22019	Histone H1t	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp P33778 H2B1B_HUMAN	181.57	53	13	1	13950	Histone H2B type 1-B	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp P06899 H2B1J_HUMAN	181.57	53	13	1	13904	Histone H2B type 1-J	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp P23527 H2B1O_HUMAN	181.57	53	13	1	13906	Histone H2B type 1-O	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp Q16778 H2B2E_HUMAN	181.57	53	13	1	13920	Histone H2B type 2-E	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp Q5QNW6 H2B2F_HUMAN	189.90	59	14	2	13920	Histone H2B type 2-F	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp P68431 H31_HUMAN	56.46	21	4	4	15404	Histone H3.1	Organização celular	Núcleo
MAN						alpha		
sp Q16695 H31T_HUMAN	56.46	21	4	4	15508	Histone H3.1t	Organização celular	Núcleo

sp Q71DI3 H32_HUMAN	56.46	21	4	4	15388	Histone H3.2	Organização celular	Núcleo
sp P62805 H4_HUMAN	190.36	57	12	12	11367	Histone H4	Organização celular	Núcleo
sp O14686 KMT2D_HUMAN	37.69	1	6	2	593399	Histone-lysine N-methyltransferase 2D	Proliferação celular/Regulação de transcrição	Núcleo
sp Q4G0P3 HYDIN_HUMAN	20.49	1	6	4	575900	Hydrocephalus-inducing protein homolog	Motilidade ciliar	Membrana/Cílio
sp P01876 IGHA1_HUMAN	253.87	37	21	8	37655	Ig alpha-1 chain C region	Resposta imune	Extracelular
sp P01857 IGHG1_HUMAN	343.64	68	45	10	36106	Ig gamma-1 chain C region	Resposta imune	Extracelular
sp P01859 IGHG2_HUMAN	306.74	57	35	6	35901	Ig gamma-2 chain C region	Resposta imune	Extracelular
sp P01860 IGHG3_HUMAN	268.00	42	28	3	41287	Ig gamma-3 chain C region	Resposta imune	Extracelular
sp P01861 IGHG4_HUMAN	310.66	61	34	8	35941	Ig gamma-4 chain C region	Resposta imune	Extracelular
sp P01742 HV101_HUMAN	35.57	8	1	1	12472	Ig heavy chain V-I region EU	Resposta imune	Extracelular
sp P01743 HV102_HUMAN	35.57	8	1	1	12946	Ig heavy chain V-I region HG3	Resposta imune	Extracelular
sp P06326 HV107_HUMAN	35.57	7	1	1	13579	Ig heavy chain V-I region Mot	Resposta imune	Extracelular
sp P01761 HV106_HUMAN	35.57	7	1	1	13732	Ig heavy chain V-I region SIE	Resposta imune	Extracelular
sp P23083 HV103_HUMAN	35.57	18	2	2	13009	Ig heavy chain V-I region V35	Resposta imune	Extracelular
sp P01814 HV201_HUMAN	23.95	6	1	1	14276	Ig heavy chain V-II region OU	Resposta imune	Extracelular
sp P01834 IGKC_HUMAN	333.44	74	22	21	11609	Ig kappa chain C region	Resposta imune	Extracelular
sp P01599 KV107_HUMAN	112.81	26	2	1	11814	Ig kappa chain V-I region Gal	Resposta imune	Extracelular

sp P01614 KV201_H UMAN	137.25	23	5	1	12676	Ig kappa chain V-II region Cum	Resposta imune	Extracelular
sp P06309 KV205_H UMAN	137.25	23	5	1	12664	Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment)	Resposta imune	Extracelular
sp P06310 KV206_H UMAN	138.37	20	5	1	14707	Ig kappa chain V-II region RPMI 6410	Resposta imune	Extracelular
sp P01621 KV303_H UMAN	110.10	58	8	2	10729	Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment)	Resposta imune	Extracelular
sp P04433 KV309_H UMAN	88.55	37	6	3	12575	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	Resposta imune	Extracelular
sp P06314 KV404_H UMAN	121.85	31	4	3	14966	Ig kappa chain V-IV region B17	Resposta imune	Extracelular
sp P0CG05 LAC2_H UMAN	230.89	71	11	2	11294	Ig lambda-2 chain C regions	Resposta imune	Extracelular
sp P01871 IGHM_H UMAN	202.21	24	11	3	49307	Ig mu chain C region	Resposta imune	Extracelular
sp P04220 MUCB_H UMAN	151.83	21	9	1	43057	Ig mu heavy chain disease protein	Resposta imune/Ligante de antígeno	Extracelular
sp B9A064 IGLL5_H UMAN	220.12	39	12	4	23063	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	Resposta imune	Extracelular
sp P12268 IMDH2_H UMAN	22.28	3	1	1	55805	Inosine-5'- monophosphate dehydrogenase 2	Diferenciação celular	Citoplasma/Núcleo
sp O14654 IRS4_HU MAN	30.62	3	3	3	13376 7	Insulin receptor substrate 4	Tradução de sinal	Membrana
sp Q14624 ITIH4_H UMAN	75.57	4	5	5	10335 7	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Resposta de fase aguda	Extracelular
sp P02533 K1C14_H UMAN	134.54	14	10	1	51562	Keratin, type I cytoskeletal 14	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp P19012 K1C15_H UMAN	101.51	20	11	5	49212	Keratin, type I cytoskeletal 15	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp P04264 K2C1_HU	74.74	9	7	4	66039	Keratin, type II	Estrutura do	Citoplasma

MAN						cytoskeletal 1	citoesqueleto	
sp Q01546 K22O_HUMAN	52.11	12	8	3	65841	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp P13647 K2C5_HUMAN	182.00	23	18	5	62378	Keratin, type II cytoskeletal 5	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp P02538 K2C6A_HUMAN	219.06	29	22	2	60045	Keratin, type II cytoskeletal 6A	Estrutura do citoesqueleto/Proliferação celular	Citoplasma
sp P48668 K2C6C_HUMAN	218.59	27	21	1	60025	Keratin, type II cytoskeletal 6C	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp O95678 K2C75_HUMAN	122.57	17	13	3	59560	Keratin, type II cytoskeletal 75	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp P01042 KNG1_HUMAN	113.01	9	6	6	71957	Kininogen-1	Inibidor de protease/Coagulação	Extracelular
sp P02788 TRFL_HUMAN	311.04	36	29	24	78182	Lactotransferrin	Transporte/Resposta Imune	Extracelular/Citoplasma
sp P30740 ILEU_HUMAN	156.59	24	9	8	42742	Leukocyte elastase inhibitor	Resposta imune/Inibidor de protease	Extracelular/Citoplasma
sp Q8WWI1 LMO7_HUMAN	29.25	2	4	3	192694	LIM domain only protein 7	Degradação de proteínas	Citoplasma/Núcleo
sp Q5T7N2 LITD1_HUMAN	28.99	1	1	1	98849	LINE-1 type transposase domain-containing protein 1	Não conhecida	Não conhecida
sp Q7LBC6 KDM3B_HUMAN	40.27	2	4	2	191580	Lysine-specific demethylase 3B	Organização celular	Núcleo
sp P61626 LYSC_HUMAN	92.58	18	4	4	16537	Lysozyme C	Resposta imune	Extracelular
sp P14780 MMP9_HUMAN	139.54	13	10	9	78458	Matrix metalloproteinase-9	Degradação de colágeno/Resposta imune	Extracelular
sp P08582 TRFM_HUMAN	76.59	4	5	3	80215	Melanotransferrin	Transporte de ferro	Membrana
sp P27816 MAP4_HUMAN	24.21	1	1	1	12100	Microtubule-associated	Estrutura do	Citoplasma

UMAN					5	protein 4	citoesqueleto	
sp P26038 MOES_HUMAN	66.53	6	4	3	67820	Moesin	Estrutura do citoesqueleto	Citoplasma
sp Q8WXI7 MUC16_HUMAN	33.99	1	13	8	2E+06	Mucin-16	Resposta imune inata	Membrana/Extracelular
sp P24158 PRTN3_HUMAN	162.90	30	7	7	27807	Myeloblastin	Protease de serina	Extracelular/Membrana/Citoplasma
sp P05164 PERM_HUMAN	219.84	32	26	24	83869	Myeloperoxidase	Resposta imune/Antiapoptose	Extracelular/Núcleo/Lisossomo
sp P35579 MYH9_HUMAN	35.90	2	4	2	226530	Myosin-9	Estrutura do citoesqueleto/Organização celular	Citoplasma
sp P29966 MARCS_HUMAN	20.38	5	1	1	31555	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Metabolismo/Substrato da proteína quinase C	Citoplasma/Membrana
sp Q8IVL1 NAV2_HUMAN	25.18	5	11	8	268165	Neuron navigator 2	Desenvolvimento neuronal	Núcleo
sp P08246 ELNE_HUMAN	104.91	21	6	6	28518	Neutrophil elastase	Resposta imune/Protease de serina	Membrana/Extracelular
sp P80188 NGAL_HUMAN	201.06	39	9	8	22588	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	Transporte	Extracelular
sp Q6KC79 NIPBL_HUMAN	20.52	1	4	3	316051	Nipped-B-like protein	Diferenciação celular	Núcleo
sp Q16625 OCLN_HUMAN	20.29	2	1	1	59144	Occludin	Organização celular/Adesão	Membrana
sp P62937 PPIA_HUMAN	99.06	26	5	3	18012	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Dobramento de proteínas	Citoplasma/Extracelular
sp Q06830 PRDX1_HUMAN	97.56	25	5	5	22110	Peroxiredoxin-1	Metabolismo/Regulação redox	Citoplasma/Melanossoma
sp Q9BY49 PECR_HUMAN	31.24	5	2	1	32544	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	Metabolismo/Alongamento de ácidos graxos	Citoplasma/Peroxisoma
sp P13796 PLSL_HUMAN	197.69	27	18	13	70289	Plastin-2	Estrutura do citoesqueleto/Ligante	Citoplasma

sp P0CG47 UBB_HUMAN	138.33	26	7	6	25762	Polyubiquitin-B	da actina Regulação de proteínas	Citoplasma/Núcleo
sp P0CG48 UBC_HUMAN	138.33	9	7	6	77039	Polyubiquitin-C	Regulação de proteínas	Citoplasma/Núcleo
sp P07737 PROF1_HUMAN	218.07	50	9	7	15054	Profilin-1	Estrutura do citoesqueleto/Ligante da actina	Citoplasma
sp Q9UPA5 BSN_HUMAN	29.12	1	5	4	416475	Protein bassoon	Proliferação celular/Resposta à estresse	Núcleo
sp Q13948 CASP_HUMAN	23.31	1	1	1	77455	Protein CASP	Transporte	Citoplasma/Golgi
sp Q9P219 DAPLE_HUMAN	21.40	2	4	3	228228	Protein Daple	Diferenciação celular	Citoplasma
sp Q7Z589 EMSY_HUMAN	22.57	1	2	2	141467	Protein EMSY	Diferenciação celular	Núcleo
sp Q9Y6V0 PCLO_HUMAN	28.49	1	6	3	553285	Protein piccolo	Organização celular	Junção celular/sinapse
sp P80511 S10AC_HUMAN	62.72	14	3	2	10575	Protein S100-A12	Resposta imune/Antimicrobiana	Extracelular/Citoplasma/Membrana
sp P05109 S10A8_HUMAN	160.55	55	8	6	10835	Protein S100-A8	Resposta imune/Antimicrobiana	Extracelular/Membrana/Citoplasma
sp P06702 S10A9_HUMAN	273.11	84	18	18	13242	Protein S100-A9	Resposta imune	Extracelular/Citoplasma/Núcleo/Membrana
sp P25815 S100P_HUMAN	78.18	34	3	3	10400	Protein S100-P	Transporte/proliferação celular	Citoplasma/Núcleo
sp Q8TF72 SHRM3_HUMAN	24.54	1	3	2	216856	Protein Shroom3	Organização celular	Citoplasma
sp A6NJS3 IV1U1_HUMAN	35.57	8	1	1	13370	Putative V-set and immunoglobulin domain-containing-like protein IGHV1OR21-1	Resposta imune	Extracelular
sp P14618 KPYM_HUMAN	190.95	34	23	19	57937	Pyruvate kinase PKM	Metabolismo/Glicólise /Apoptose	Membrana/Núcleo/Citoplasma

sp Q9UHV5 RPGFL_HUMAN	23.54	1	1	1	73265	Rap guanine nucleotide exchange factor-like 1	Diferenciação celular	Membrana/Citoplasma/Núcleo
sp P52566 GDIR2_HUMAN	154.73	41	9	8	22988	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Metabolismo	Citoplasma
sp P21817 RYR1_HUMAN	23.13	3	12	9	565184	Ryanodine receptor 1	Metabolismo/Ligante de cálcio	Citoplasma/Membrana
sp Q9UQ35 SRRM2_HUMAN	23.22	2	4	4	299616	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	Diferenciação celular	Núcleo
sp P02787 TRFE_HUMAN	296.82	38	34	27	77064	Serotransferrin	Transporte	Extracelular
sp P02768 ALBU_HUMAN	437.81	62	142	132	69367	Serum albumin	Transporte	Extracelular
sp Q9UBC9 SPRR3_HUMAN	51.39	20	4	4	18154	Small proline-rich protein 3	Organização celular	Citoplasma
sp Q9P0W2 HM20B_HUMAN	35.89	7	2	2	35813	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1-related	Diferenciação celular	Núcleo
sp P10599 THIO_HUMAN	86.03	21	2	2	11737	Thioredoxin	Metabolismo	Núcleo/Citoplasma/Extracelular
sp Q86V81 THOC4_HUMAN	29.22	9	3	1	26888	THO complex subunit 4	Diferenciação celular	Núcleo
sp Q8WZ42 TITIN_HUMAN	79.16	2	73	64	4E+06	Titin	Diferenciação celular	Núcleo
sp P37837 TALDO_HUMAN	106.33	17	5	5	37540	Transaldolase	Metabolismo	Citoplasma
sp P29401 TKT_HUMAN	207.95	26	18	17	67878	Transketolase	Metabolismo	Extracelular/Citoplasma/Núcleo
sp P60174 TPIS_HUMAN	114.78	19	5	5	30791	Triosephosphate isomerase	Metabolismo/Glicogênese	Citoplasma/Núcleo
sp Q86T03 TM55B_HUMAN	21.61	2	1	1	29470	Type 1 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 4-	Metabolismo	Citoplasma/Lisossoma

sp Q9H3Y6 SRMS_HUMAN	21.90	2	1	1	54507	phosphatase Tyrosine-protein kinase Srms	Metabolismo/Diferenciação celular	Citoplasma
sp P62979 RS27A_HUMAN	138.33	33	6	5	17965	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	Regulação de proteínas	Citoplasma/Núcleo
sp P62987 RL40_HUMAN	138.33	41	6	5	14728	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	Regulação de proteínas	Citoplasma/Núcleo
sp B2RTY4 MYO9A_HUMAN	21.93	2	3	2	292704	Unconventional myosin-IXa	Organização celular	Membrana
sp P08670 VIME_HUMAN	25.55	2	1	1	53652	Vimentin	Organização celular	Citoplasma
sp P02774 VTDB_HUMAN	97.36	12	6	6	52964	Vitamin D-binding protein	Transporte/Resposta imune	Extracelular
sp P04004 VTNC_HUMAN	34.99	3	1	1	54306	Vitronectin	Adesão celular/Resposta imune	Extracelular
sp Q01668 CAC1D_HUMAN	32.54	3	6	4	245139	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1D	Transporte	Membrana
sp Q5GH77 XKR3_HUMAN	20.24	3	1	1	53448	XK-related protein 3	Não conhecida	Membrana

Acesso: O número de acesso da proteína como na base de dados FASTA.

-10lgP: Pontuação de confiança da proteína.

Cobertura: Porcentagem da sequência da proteína coberta pelos peptídeos de suporte.

#Peptídeos: Número de peptídeos de suporte de alta confiança.

#Único: Número de peptídeos de suporte de alta confiança que são unicamente mapeados ao grupo de proteínas.

Massa média (Da): Massa da proteína calculada pela massa média.

Descrição: Nome da proteína como na base de dados FASTA.

Função: Principal função ou função no local onde foi encontrada.

Localização celular: localização celular mais comumente encontrada.

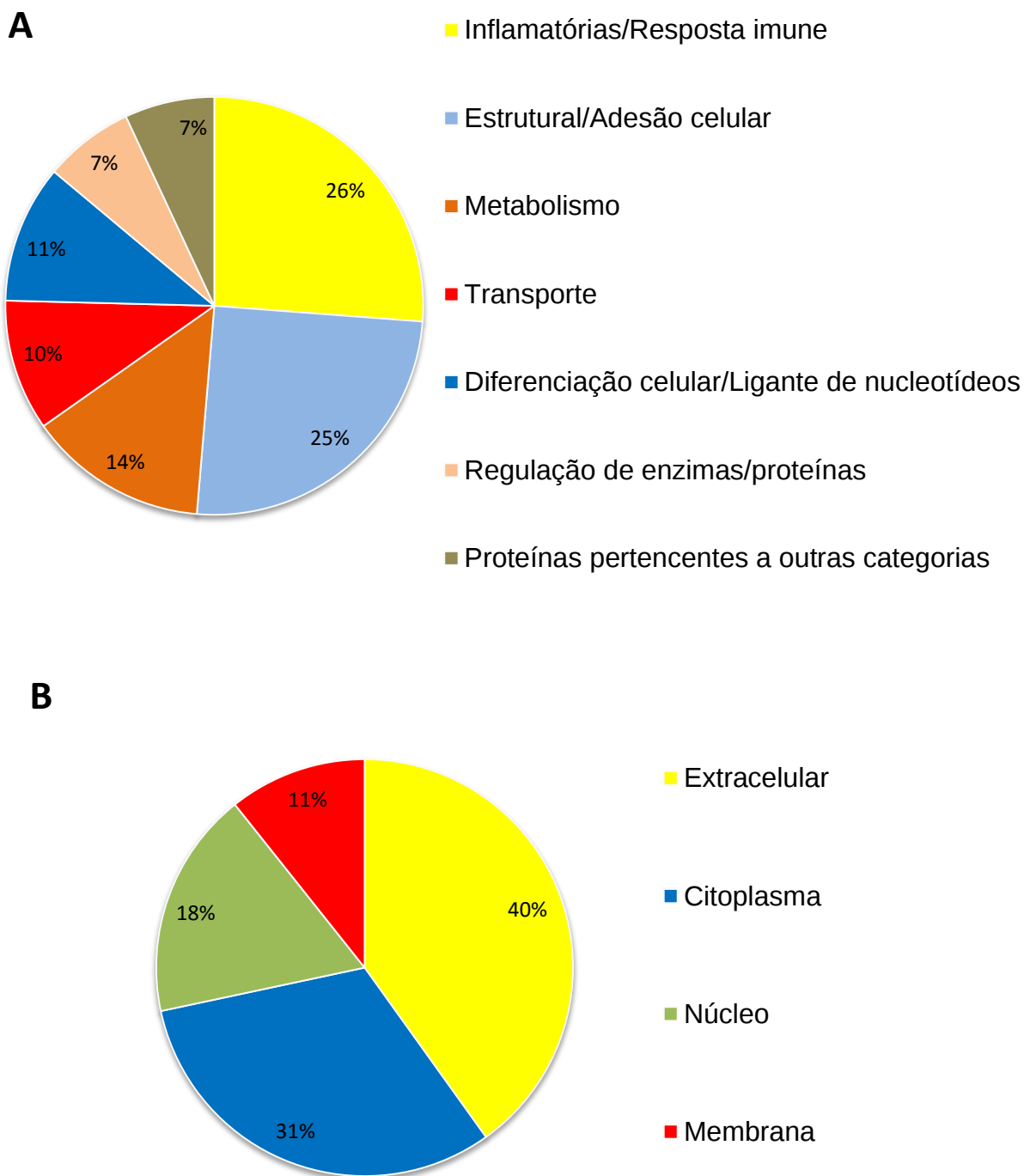


Figura 5. A) Distribuição das 187 proteínas identificadas e quantificadas em categorias de função biológica. B) Distribuição das proteínas identificadas e quantificadas em categorias de localização celular.

A abundância relativa das proteínas detectadas nas amostras de FCG dos grupos de estudo está exposta na Tabela 3. O grupo controle SS foi usado como referência para comparação com os demais grupos. Foram detectadas 104

proteínas com diferença na abundância relativa em comparação com o grupo SS. Foi considerada significativa a variação de abundância de proteína pela diminuição na razão $<0,75$, pelo aumento na razão $>1,25$ e valor de $p < 0,05$.

Tabela 3. Razão das 104 proteínas detectadas e marcadas com tags de iTRAQ que tiveram diferença significativa na abundância relativa entre os grupos de doença e o grupo controle SS, divididas por função biológica.

Accesso	Descrição	Razão SS/SS	Razão SP/SS	Razão DS/SS	Razão DP/SS
<i>Inflamatórias/Resposta imune</i>					
sp P02765 FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	1	0,684	-	-
sp P06733 ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	1	0,609	-	-
sp P04083 ANXA1_HUMAN	Annexin A1	1	-	0,492	0,531
sp P20160 CAP7_HUMAN	Azurocidin	1	-	-	1,297
sp P49913 CAMP_HUMAN	Cathelicidin antimicrobial peptide	1	0,499	-	0,536
sp P31146 COR1A_HUMAN	Coronin-1A	1	0,676	-	-
sp P09211 GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	1	0,513	0,652	0,720
sp P01876 IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	1	0,617	-	-
sp P01857 IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	1	0,625	-	-
sp P01859 IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region	1	-	-	1,391
sp P01860 IGHG3_HUMAN	Ig gamma-3 chain C region	1	1,300	-	1,299
sp P01814 HV201_HUMAN	Ig heavy chain V-II region OU	1	-	-	1,263
sp P01834 IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	1	1,517	1,373	1,425
sp P01614 KV201_HUMAN	Ig kappa chain V-II region Cum	1	0,732	-	-
sp P06309 KV205_HUMAN	Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment)	1	0,732	-	-
sp P06310 KV206_HUMAN	Ig kappa chain V-II region RPMI 6410	1	-	1,321	-
sp P04433 KV309_HUMAN	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	1	0,657	-	-
sp P0CG05 LAC2_HUMAN	Ig lambda-2 chain C regions	1	-	-	1,340
sp P01871 IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	1	-	-	0,571
sp P04220 MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein	1	1,253	-	-
sp B9A064 IGLL5_HUMAN	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	1	0,541	-	-
sp Q14624 ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	1	0,731	-	-
sp P61626 LYSC_HUMAN	Lysozyme C	1	0,702	-	-
sp Q8WX17 MUC16_HUMAN	Mucin-16	1	0,505	0,629	-
sp P05164 PERM_HUMAN	Myeloperoxidase	1	-	-	1,475
sp P08246 ELNE_HUMAN	Neutrophil elastase	1	-	-	1,269
sp P05109 S10A8_HUMAN	Protein S100-A8	1	1,830	1,800	2,500
sp P06702 S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	1	2,322	2,220	3,497
<i>Estrutural/Adesão celular</i>					
sp P60709 ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	1	0,429	0,589	0,564

sp P63261 ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	1	0,429	0,589	0,564
sp Q01518 CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	1	0,687	-	0,737
sp P12814 ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1	1	0,665	0,723	-
sp Q9Y5K6 CD2AP_HUMAN	CD2-associated protein	1	0,537	-	0,733
sp P23528 COF1_HUMAN	Cofilin-1	1	0,672	-	-
sp Q01955 CO4A3_HUMAN	Collagen alpha-3(IV) chain	1	0,617	-	-
sp P15924 DESP_HUMAN	Desmoplakin	1	0,501	0,517	-
sp Q02539 H11_HUMAN	Histone H1.1	1	0,691	-	-
sp P16403 H12_HUMAN	Histone H1.2	1	0,691	-	-
sp P16402 H13_HUMAN	Histone H1.3	1	0,691	-	-
sp P10412 H14_HUMAN	Histone H1.4	1	0,691	-	-
sp P22492 H1T_HUMAN	Histone H1t	1	0,691	-	-
sp P33778 H2B1B_HUMAN	Histone H2B type 1-B	1	-	-	1,321
sp P06899 H2B1J_HUMAN	Histone H2B type 1-J	1	-	-	1,321
sp P23527 H2B1O_HUMAN	Histone H2B type 1-O	1	-	-	1,321
sp Q16778 H2B2E_HUMAN	Histone H2B type 2-E	1	-	-	1,321
sp P68431 H31_HUMAN	Histone H3.1	1	0,661	-	-
sp Q16695 H31T_HUMAN	Histone H3.1t	1	0,661	-	-
sp Q71DI3 H32_HUMAN	Histone H3.2	1	0,661	-	-
sp P62805 H4_HUMAN	Histone H4	1	0,658	-	-
sp P19012 K1C15_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 15	1	-	0,721	-
sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	1	0,606	0,614	0,641
sp P13647 K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	1	1,510	-	-
sp P48668 K2C6C_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6C	1	-	0,713	-
sp O95678 K2C75_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 75	1	1,450	-	-
sp P27816 MAP4_HUMAN	Microtubule-associated protein 4	1	0,613	-	-
sp P26038 MOES_HUMAN	Moesin	1	0,667	-	-
sp P13796 PLSL_HUMAN	Plastin-2	1	0,626	-	-
sp P07737 PROF1_HUMAN	Profilin-1	1	0,639	-	-
sp Q9Y6V0 PCLO_HUMAN	Protein piccolo	1	-	-	1,370
sp P04004 VTNC_HUMAN	Vitronectin	1	0,531	0,649	-
<i>Metabolismo</i>					
sp P52209 6PGD_HUMAN	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	1	0,602	-	-
sp Q6JQN1 ACD10_HUMAN	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	1	1,271	-	-
sp Q01469 FABP5_HUMAN	Fatty acid-binding protein, epidermal	1	0,706	-	0,749
sp Q5CZC0 FSIP2_HUMAN	Fibrous sheath-interacting protein 2	1	0,602	-	0,491
sp P04075 ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A	1	0,645	-	-
sp P04406 G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	0,583	0,711	0,639
sp P29966 MARCS_HUMAN	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	1	0,305	0,582	0,330
sp Q06830 PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	1	0,703	-	-
sp Q9BY49 PECR_HUMAN	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	1	0,610	-	-
sp P14618 KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM	1	0,611	-	-

sp P52566 GDIR2_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	1	0,702	-	-
sp P21817 RYR1_HUMAN	Ryanodine receptor 1	1	-	-	1,302
sp P10599 THIO_HUMAN	Thioredoxin	1	0,598	0,744	0,708
sp P60174 TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase	1	0,678	-	-
sp Q86T03 TM55B_HUMAN	Type 1 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 4-phosphatase	1	-	-	1,479
sp Q9H3Y6 SRMS_HUMAN	Tyrosine-protein kinase Srms	1	0,631	-	-
<i>Transporte</i>					
sp P19652 A1AG2_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 2	1	0,549	-	0,750
sp P04745 AMY1_HUMAN	Alpha-amylase 1	1	0,637	-	-
sp P27482 CALL3_HUMAN	Calmodulin-like protein 3	1	0,671	-	-
sp P69905 HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha	1	0,672	0,599	-
sp P68871 HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	1	0,653	0,615	-
sp P02790 HEMO_HUMAN	Hemopexin	1	0,707	-	-
sp Q13948 CASP_HUMAN	Protein CASP	1	-	-	1,292
<i>Diferenciação celular/Ligante de Nucleotídeos</i>					
sp Q7Z591 AKNA_HUMAN	AT-hook-containing transcription factor	1	-	1,295	-
sp O43264 ZW10_HUMAN	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	1	0,610	-	-
sp O60812 HNRC1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	1	-	-	1,267
sp B2RXH8 HNRC2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 2	1	-	-	1,267
sp P12268 IMDH2_HUMAN	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	1	0,628	0,622	-
sp Q6KC79 NIPBL_HUMAN	Nipped-B-like protein	1	-	-	1,255
sp Q9UPA5 BSN_HUMAN	Protein bassoon	1	-	-	1,361
sp Q9P219 DAPLE_HUMAN	Protein Daple	1	1,278	-	-
sp Q9UHV5 RPGFL_HUMAN	Rap guanine nucleotide exchange factor-like 1	1	1,644	1,290	1,379
sp Q9UQ35 SRRM2_HUMAN	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	1	0,722	0,645	-
sp Q86V81 THOC4_HUMAN	THO complex subunit 4	1	0,643	0,730	-
sp Q8WZ42 TITIN_HUMAN	Titin	1	-	-	1,898
<i>Regulação de enzimas/proteínas</i>					
sp P01009 A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	1	-	-	1,508
sp P01023 A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	1	-	-	1,471
sp P24158 PRTN3_HUMAN	Myeloblastin	1	0,677	-	-
<i>Proteínas pertencentes a outras categorias</i>					
sp Q6UWP2 DHR11_HUMAN	Dehydrogenase/reductase SDR family member 11	1	0,640	-	-
sp P04792 HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	1	0,692	-	-
sp Q4G0P3 HYDIN_HUMAN	Hydrocephalus-inducing protein homolog	1	1,277	-	-
sp Q8WWI1 LMO7_HUMAN	LINE-1 type transposase domain-containing protein 1	1	-	1,301	-
sp Q5T7N2 LITD1_HUMAN	Neuron navigator 2	1	0,731	0,746	-

sp P62937 PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1	0,621	-	-
----------------------	---------------------------------------	---	-------	---	---

A quantificação relativa de cada proteína em relação ao grupo SS foi considerada significativa quando os valores foram <0,75 para diminuição, >1,25 para aumento e valor de p <0,05. SS, sem DM2 e saudável periodontalmente; SP, sem DM2 e com PC; DS, DM2 e saudável periodontalmente; DP, DM2 e PC.

Na razão entre a abundância das proteínas do grupo SP/SS foram encontradas 65 proteínas significativamente diminuídas, 14 relacionadas à inflamação/resposta imune, 23 à estrutura/adesão celular, 13 ao metabolismo, 6 ao transporte, 4 à diferenciação celular/ligante de nucleotídeos, 1 à regulação de enzimas/proteínas e 4 proteínas pertencentes a outras categorias. Foram encontradas 11 proteínas significativamente aumentadas, 5 relacionadas com inflamação/resposta imune, 2 à estrutura/adesão celular, 1 ao metabolismo, 2 à diferenciação celular/ligante de nucleotídeo e 1 proteína pertencente a outra categoria (Fig. 7).

Na razão entre a abundância das proteínas do grupo DS/SS foram encontradas 20 proteínas significativamente diminuídas, 3 relacionadas à inflamação/resposta imune, 8 à estrutura/adesão celular, 3 ao metabolismo, 2 ao transporte, 3 à diferenciação celular/ligante de nucleotídeos e 1 proteína pertencente a outra categoria. Foram encontradas 7 proteínas significativamente aumentadas, 4 relacionadas com inflamação/resposta imune, 2 à diferenciação celular/ligante de nucleotídeo e 1 proteína pertencente a outra categoria (Fig. 8).

Na razão entre a abundância das proteínas do grupo DP/SS foram encontradas 15 proteínas significativamente diminuídas, 4 relacionadas à inflamação/resposta imune, 5 à estrutura/adesão celular, 5 ao metabolismo e 1 ao transporte. Foram encontradas significativamente aumentadas 26 proteínas, 10 relacionadas com inflamação/resposta imune, 5 à estrutura/adesão celular, 2 ao metabolismo, 1 ao transporte, 6 à diferenciação celular/ligante de nucleotídeo e 2 à regulação de enzimas/proteínas (Fig. 9).

Na razão entre a abundância das proteínas do grupo DP/DS foram encontradas 3 proteínas significativamente diminuídas, 1 relacionada à inflamação/resposta imune e 2 ao transporte. Foram encontradas 43 proteínas significativamente aumentadas, 13 relacionadas à inflamação/resposta imune, 11 à estrutura/adesão celular, 3 ao metabolismo, 5 ao transporte, 8 à diferenciação

celular/ligante de nucleotídeo, 1 à regulação de enzimas/proteínas e 2 proteínas pertencentes a outras categorias (Fig. 10).

Na razão entre a abundância das proteínas do grupo DP/SP foram encontradas 3 proteínas significativamente diminuídas, 2 relacionadas à inflamação/resposta imune e 1 à estrutura/adesão celular. Foram encontradas 83 proteínas significativamente aumentadas, 30 relacionadas à inflamação/resposta imune, 22 à estrutura/adesão celular, 11 ao metabolismo, 8 ao transporte, 5 à diferenciação celular/ligante de nucleotídeo, 6 à regulação de enzimas/proteínas e 4 proteína pertencente a outra categoria (Fig. 11 e 12).

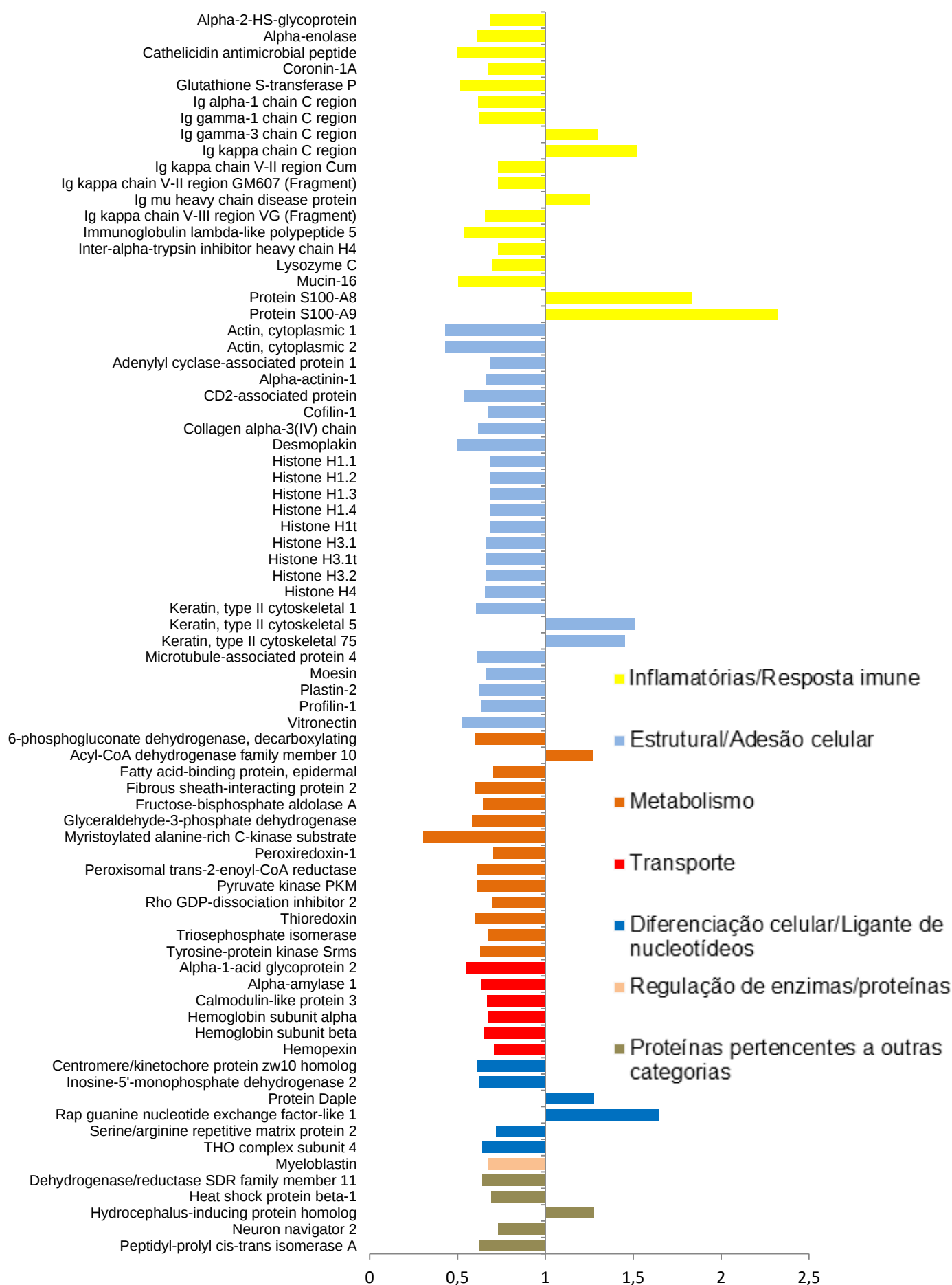


Figura 6. Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo SP/SS

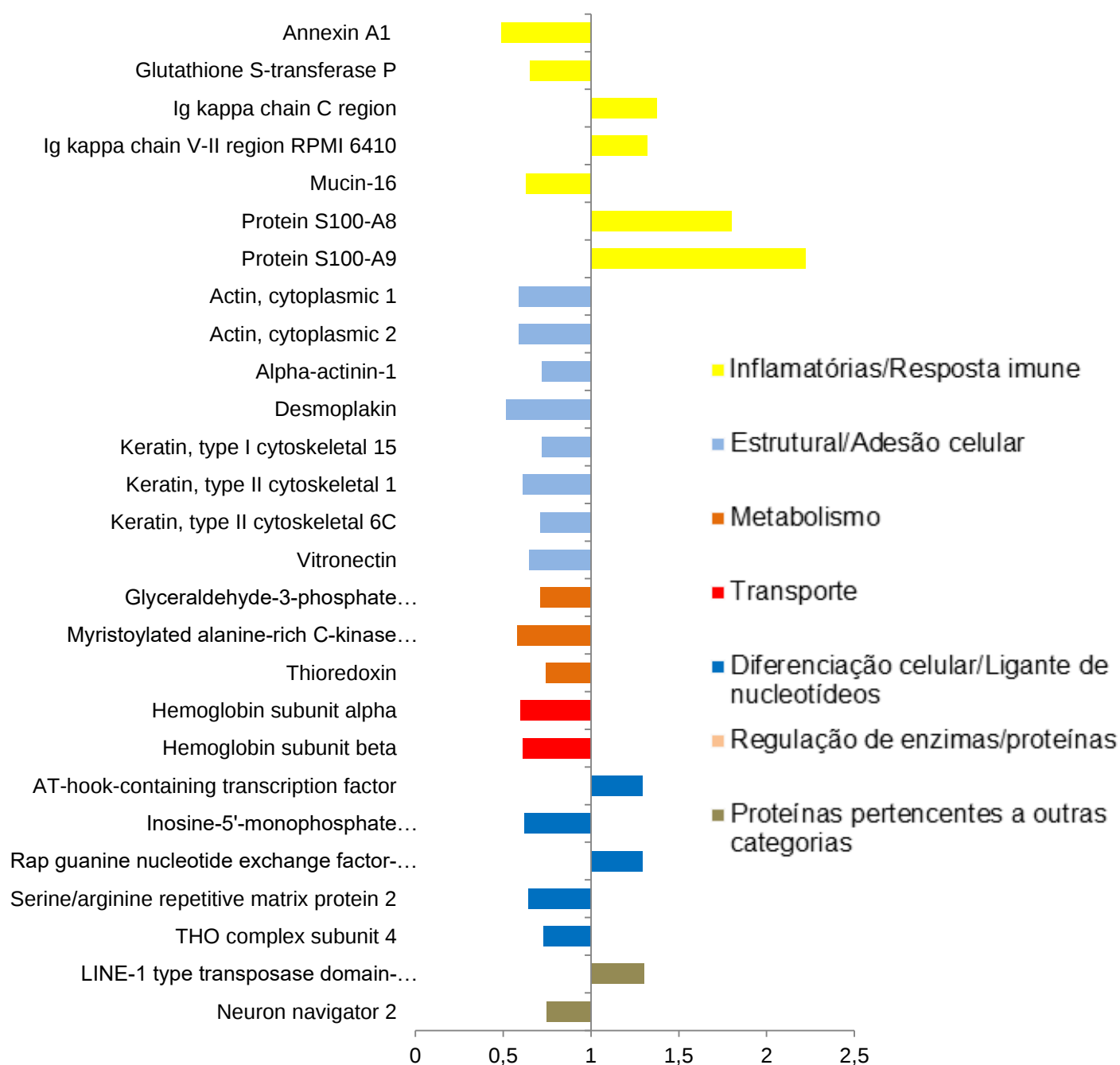


Figura 7. Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo DS/SS.

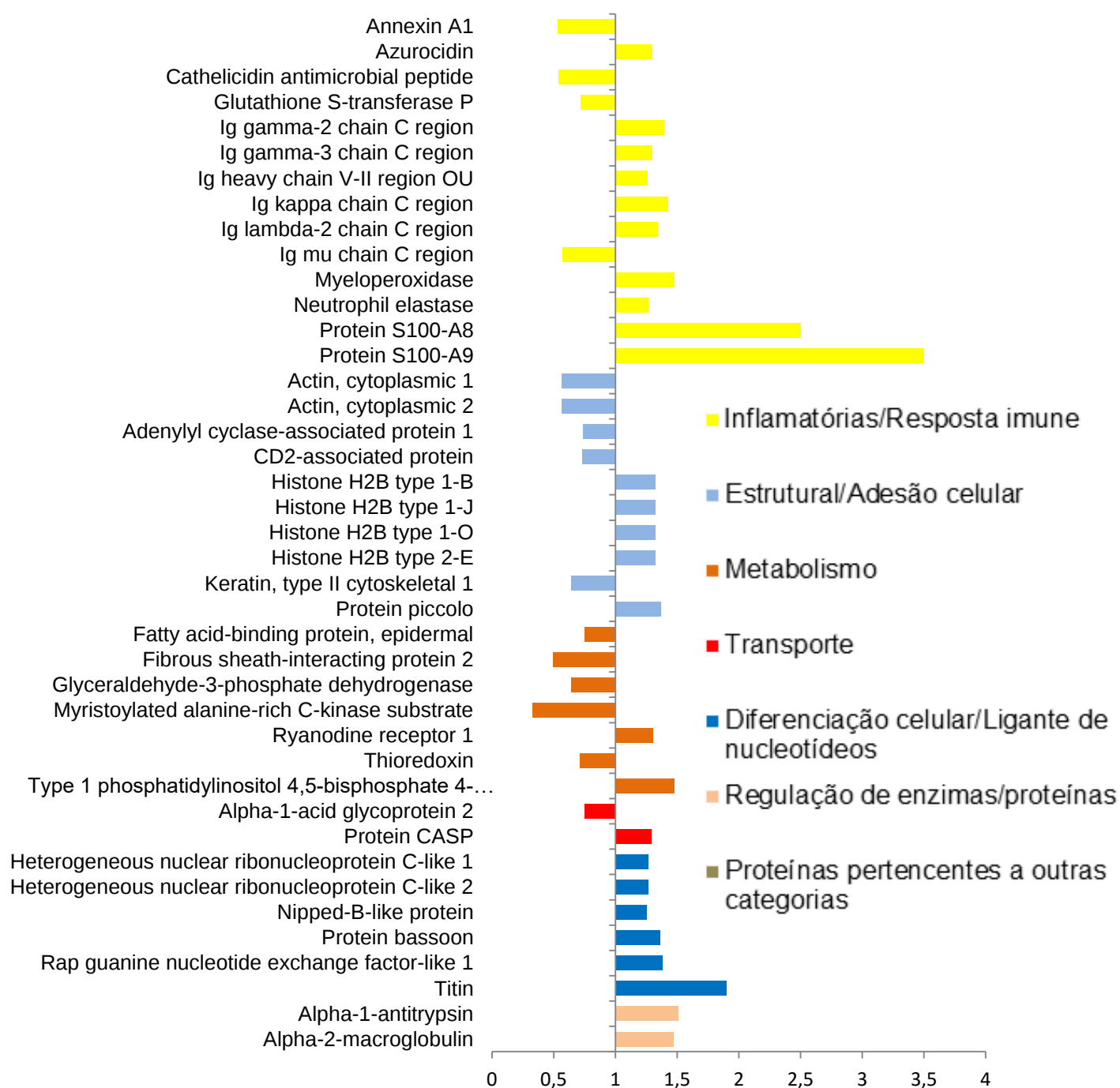


Figura 8. Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo DP/SS.

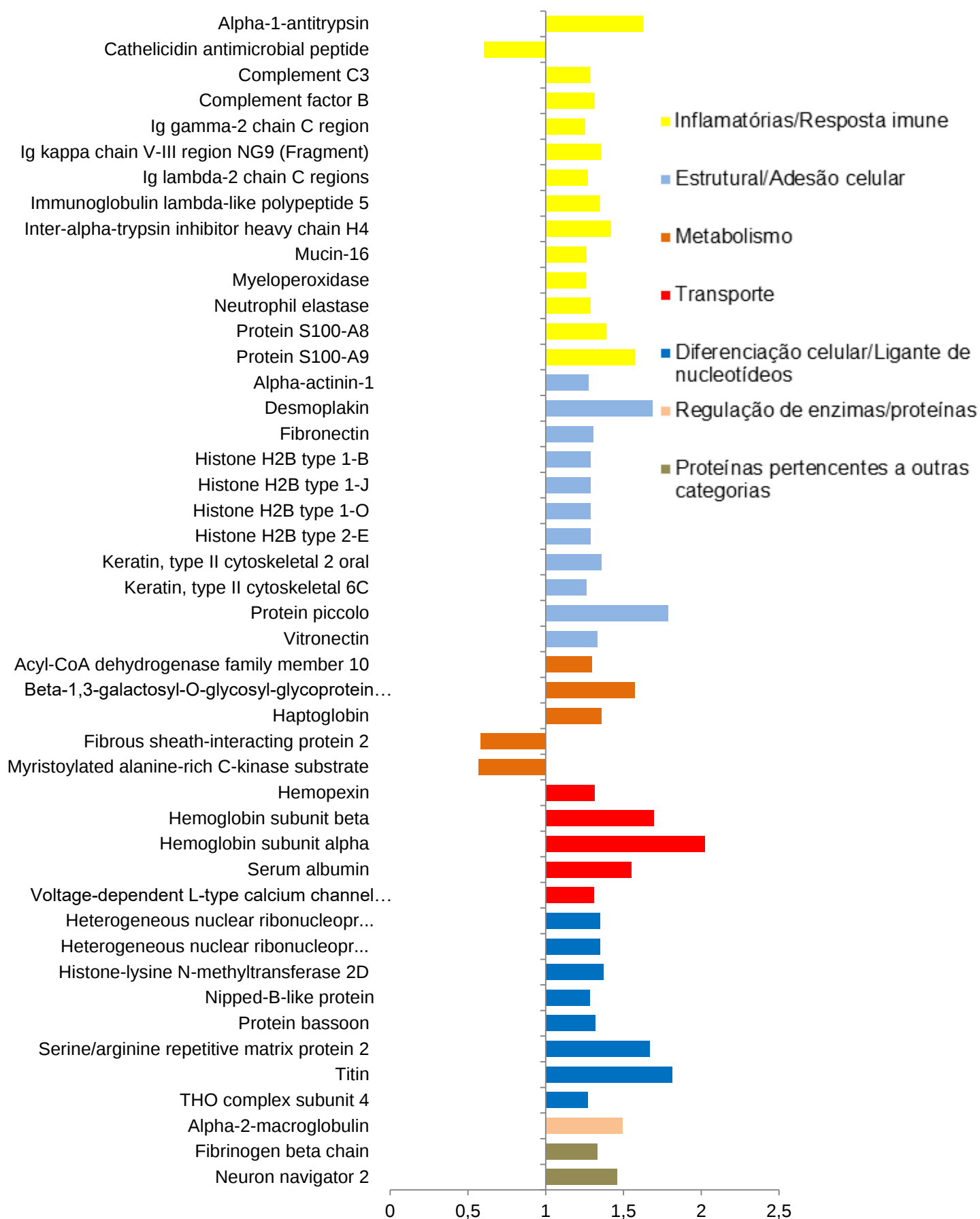


Figura 9. Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo DP/DS.

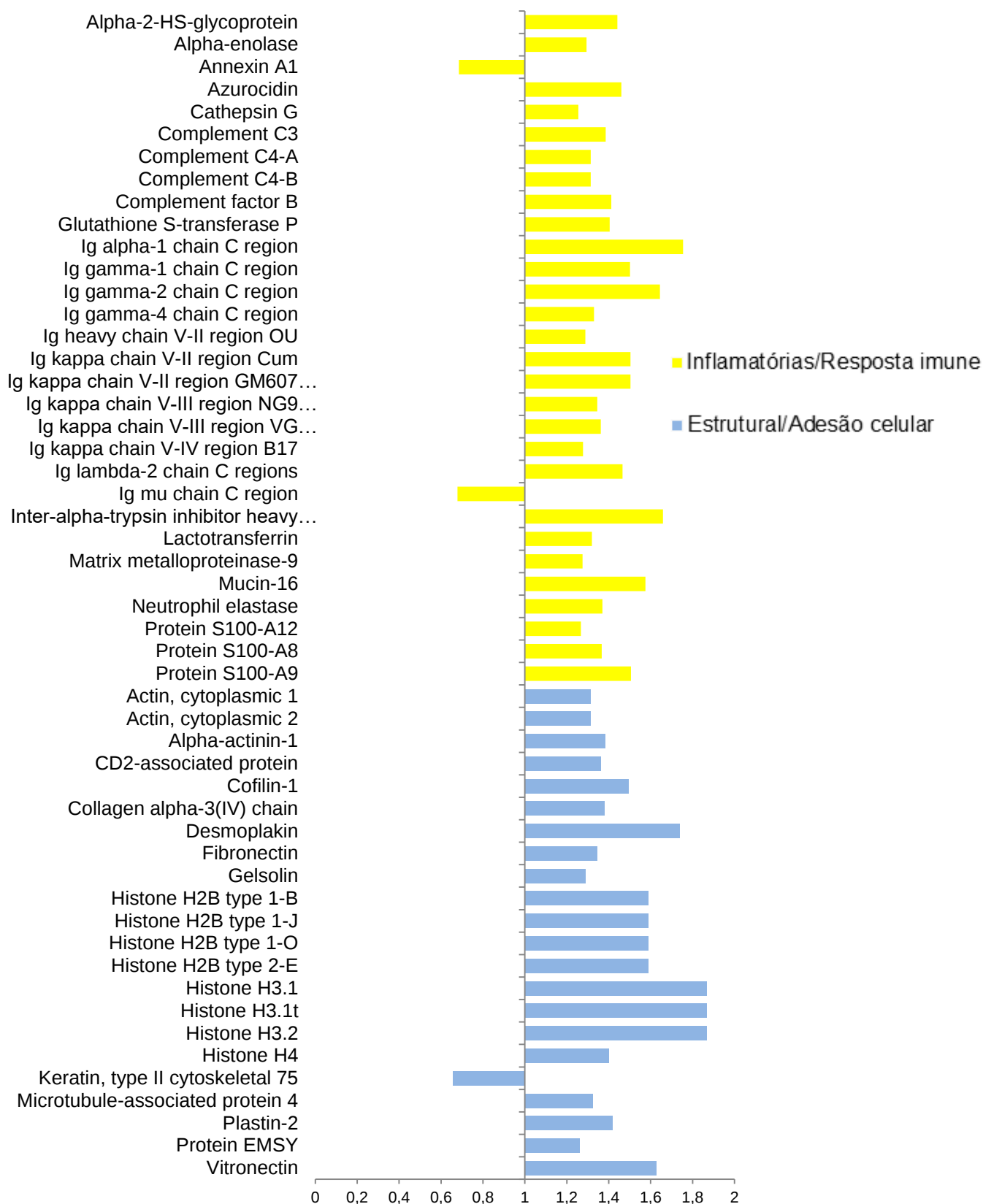


Figura 10. Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo DP/SP.

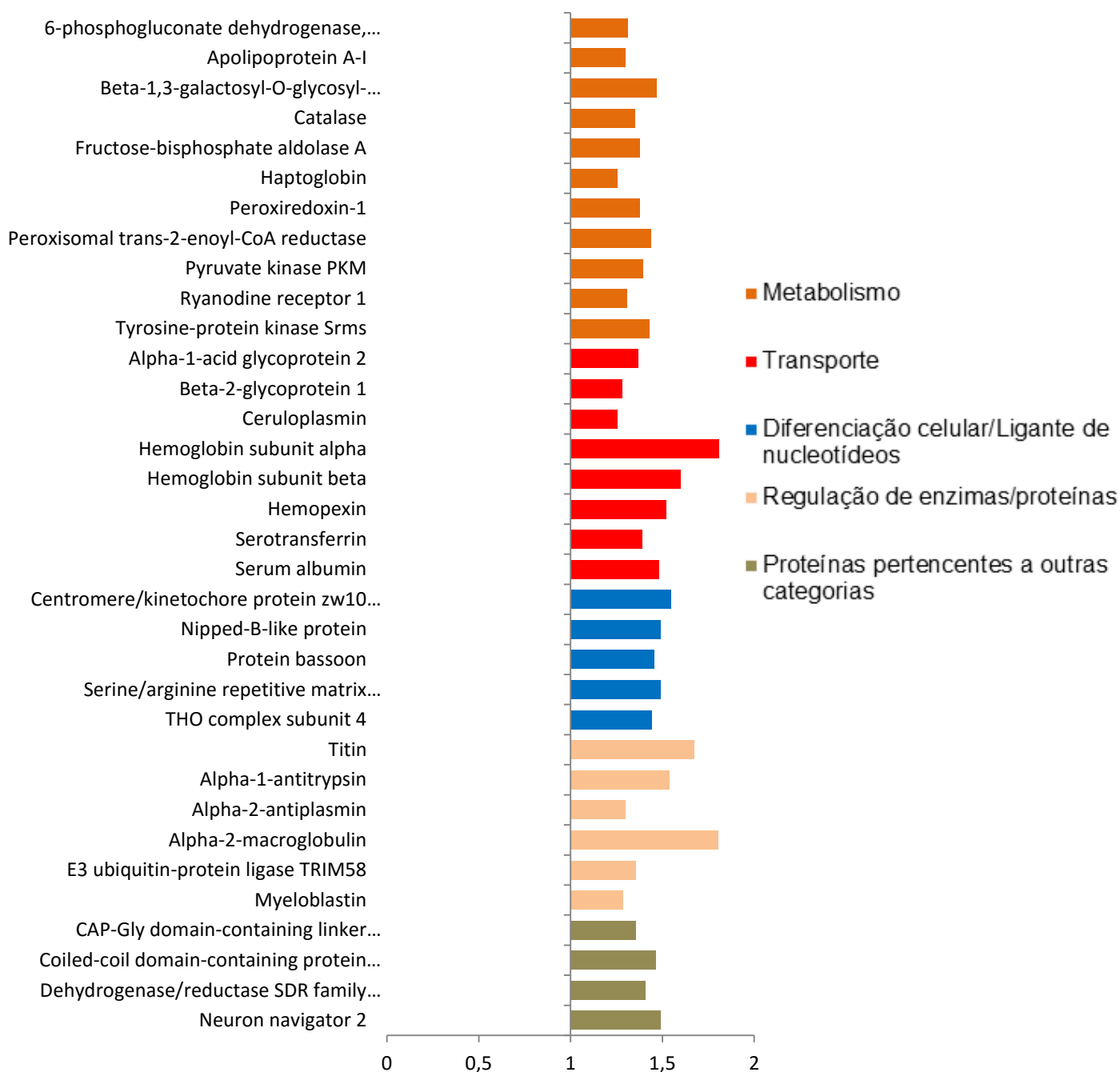


Figura 11. (continuação) Razão das abundâncias relativas das proteínas diferencialmente expressas do grupo DP/SP.

As proteínas com diferença na abundância relativa mais expressiva entre os grupos estão representadas pelos gráficos à seguir. Nas figuras 13 e 14 estão demonstradas as proteínas relacionadas com a resposta imune/inflamatória. Dentre elas, conforme descrito na figura 13, a S100A9 e S100A8 foram as que tiveram maior aumento nas condições de doença quando comparadas aos outros grupos, seguidas pela Mieloperoxidase, Elastase de Neutrófilo e Azurocidina, que tiveram aumento no grupo DP em relação aos outros grupos.

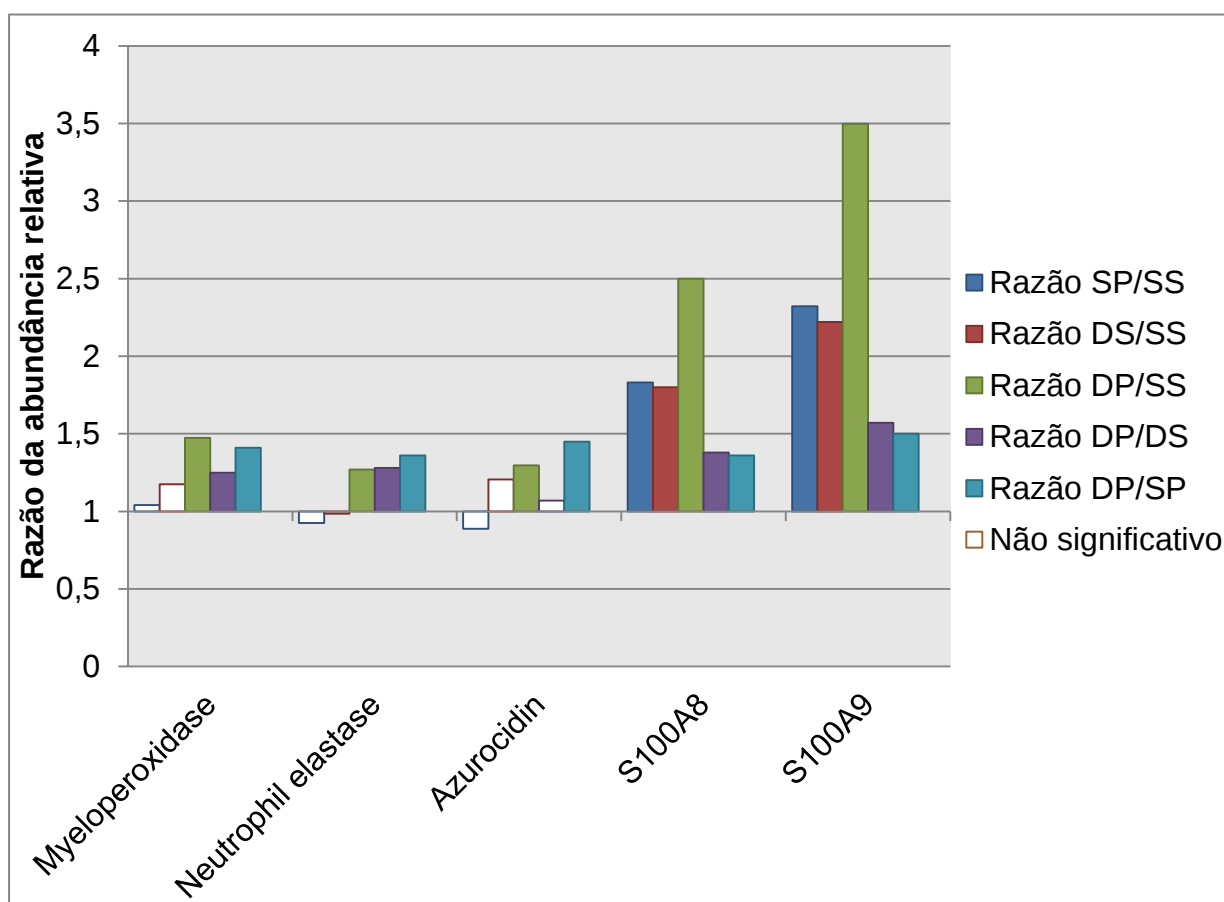


Figura 12. Razão da abundância relativa de Mieloperoxidase, Elastase de neutrófilo, Azurocidina, S100A9 e S100A8 entre as condições do estudo. SS, sem diabetes e saudável periodontalmente; SP, sem diabetes e periodontite; DS, diabetes e saudável periodontalmente; DP, diabetes e periodontite.

Na figura 14, a Ig Kappa região C teve aumento significativo nos grupos de doença (SP, DS e DP) quando comparadas ao grupo SS, assim como outras proteínas da família das Igs. A Anexina A1 e Glutathione S Transferase P teve diminuição nas condições de doença (SP, DS, DP), quando comparadas ao grupo SS, enquanto a Anexina A1 teve diminuição, e a Glutathione S Transferase P teve aumento na relação DP/SP. O Peptídeo Antimicrobiano Catelicidina se mostrou diminuído apenas nas condições de PC quando comparadas com saúde periodontal (SP/SS, DP/SS e DP/DS) e nas relações entre saúde/saúde periodontal e PC/PC não houve diferença (DS/SS e DP/SP).

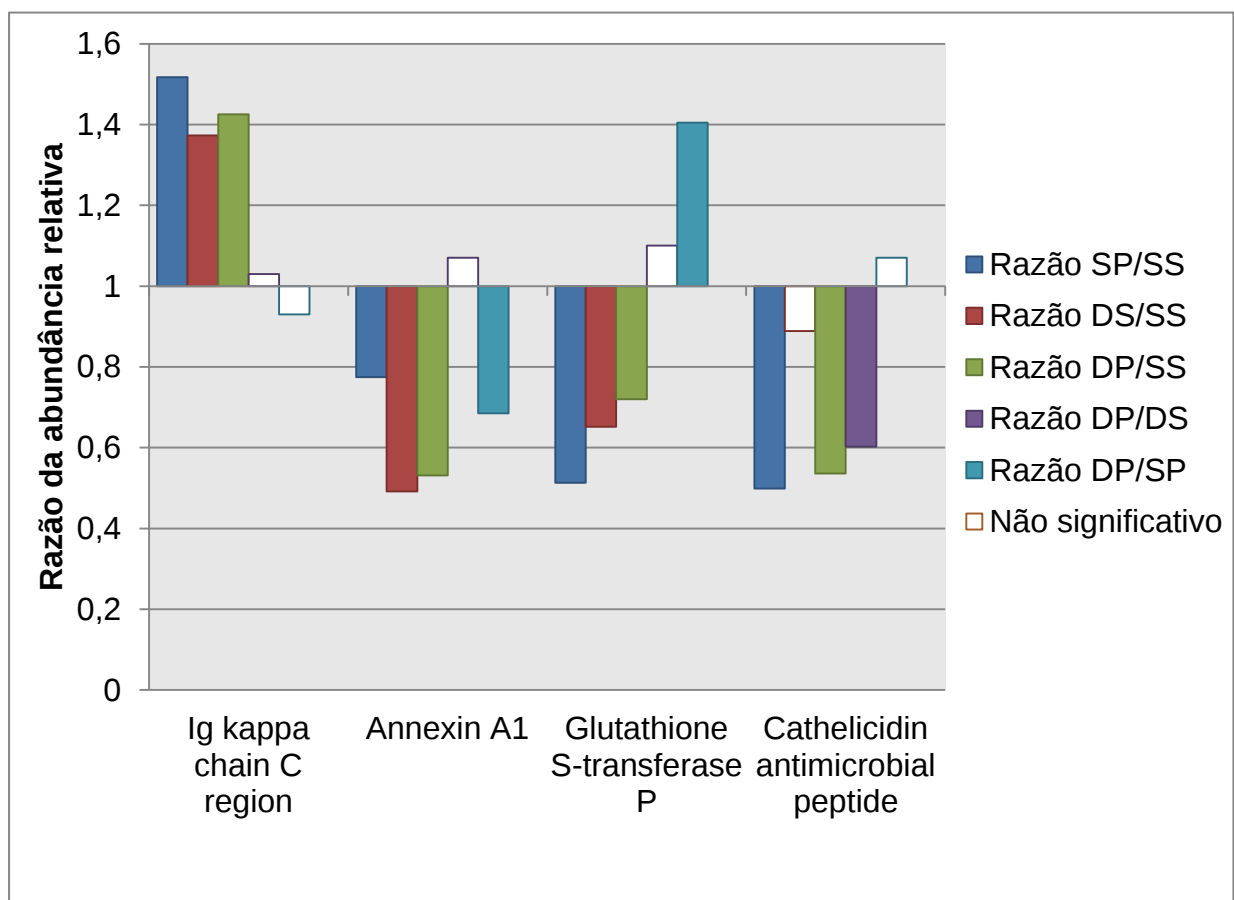


Figura 13. Razão da abundância relativa de Ig kappa chain C region, Annexin 1, Glutathione S-transferase P e Cathelicidin antimicrobial peptide entre as condições do estudo. SS, sem diabetes e saudável periodontalmente; SP, sem diabetes e periodontite; DS, diabetes e saudável periodontalmente; DP, diabetes e periodontite.

Na figura 15 estão demonstradas proteínas relacionadas com a estrutura/adesão celular. As Actinas A1 e A2 citoplasmáticas tiveram diminuição significativa em todas as condições de doença (SP, DS, DP), quando comparadas ao grupo SS e aumento na relação DP/SP. A Desmoplaquina e Vitronectina tiveram diminuição significativa apenas nos grupos SP e DS, quando comparadas ao grupo SS, e aumento nas relações entre DP/DS e DP/SP.

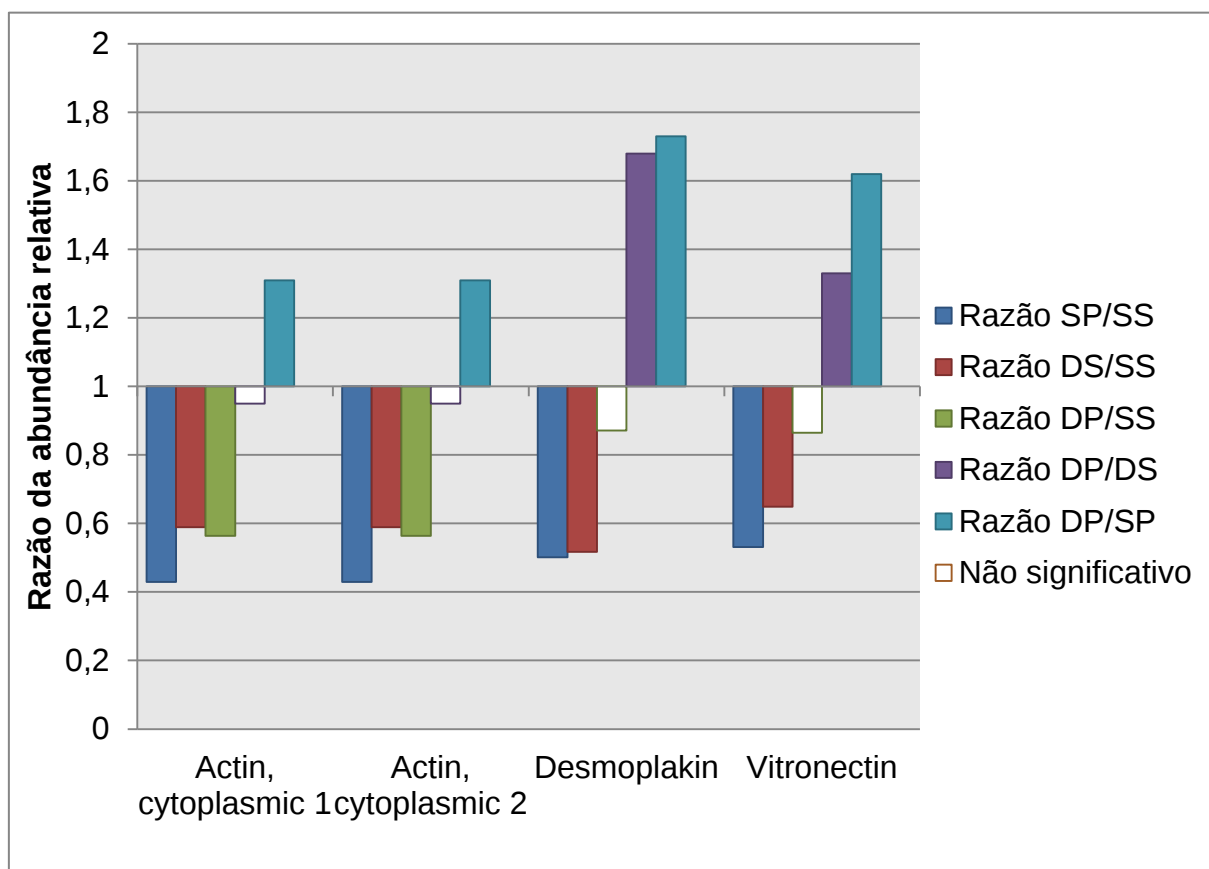


Figura 14. Razão da abundância relativa de Actin cytoplasmic 1, Actin cytoplasmic 2, Desmoplakin e Vitronectin entre as condições do estudo. SS, sem diabetes e saudável periodontalmente; SP, sem diabetes e periodontite; DS, diabetes e saudável periodontalmente; DP, diabetes e periodontite.

Na figura 16 estão demonstradas proteínas relacionadas com metabolismo e diferenciação celular. O Substrato C-quinase Rico em Alanina Miristoilada (MARCKS) apareceu diminuído em todas as comparações, com exceção da relação DP/SP. O Fator de troca de nucleotídeo rap guanina 1 se mostrou levemente elevado nas condições de doença SP, DS e SP, em comparação com o grupo SS, enquanto a Titina apareceu elevada apenas na comparação do grupo DP com os demais grupos.

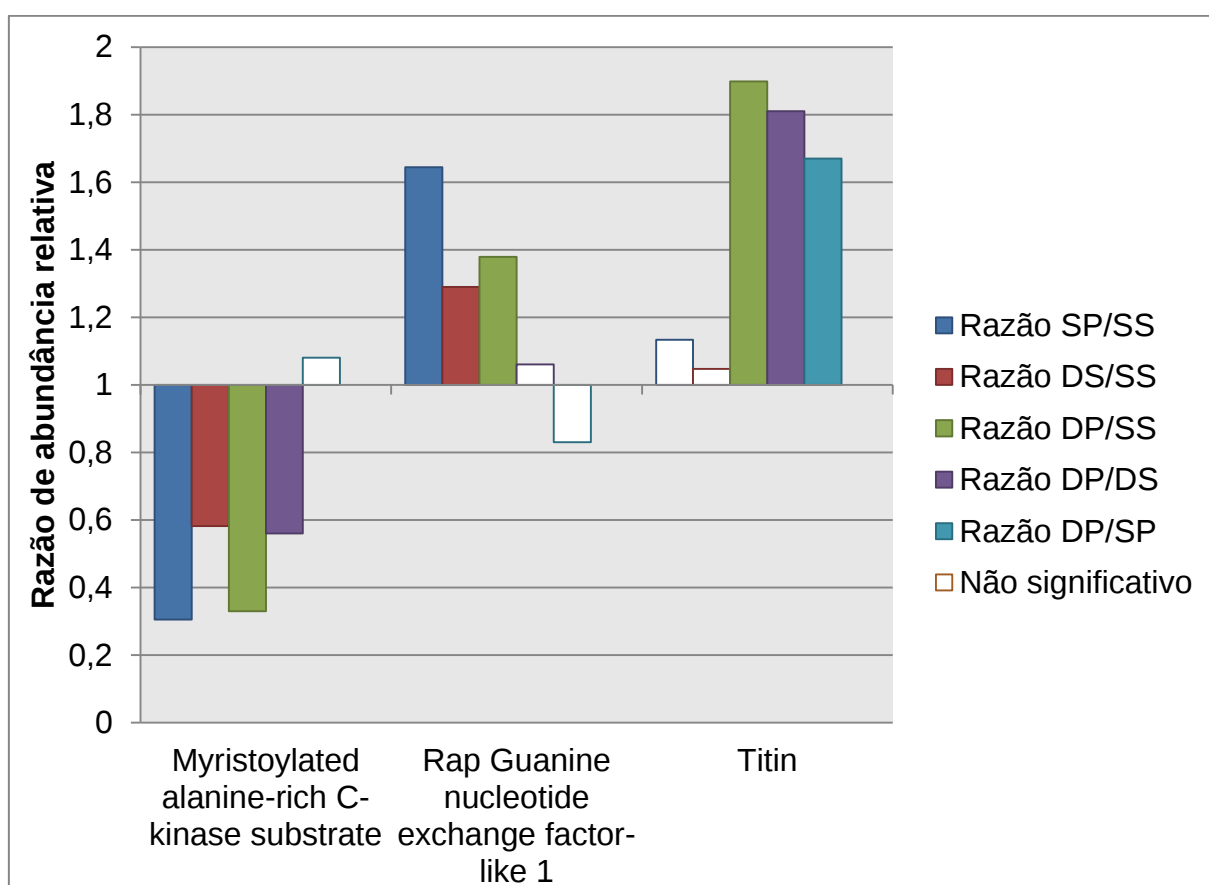


Figura 15. Razão da abundância relativa de Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate, Rap Guanine nucleotide exchange fator-like 1 e Titin entre as condições do estudo. SS, sem diabetes e saudável periodontalmente; SP, sem diabetes e periodontite; DS, diabetes e saudável periodontalmente; DP, diabetes e periodontite.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo demonstramos variações quantitativas no perfil proteico do FCG de indivíduos com DM2 e PC, utilizando os respectivos grupos controles entre essas condições. Através de abordagem proteômica, foram identificadas 361 proteínas com alto nível de confiança ($p < 0,01$). Foram quantificadas 187 proteínas nos diversos grupos em que foram coletadas amostras de FCG e, dessas proteínas, 104 mostraram diferenças significativas de abundância.

O presente estudo foi o primeiro a comparar o perfil proteico do FCG de indivíduos com DM2, um fator de risco para a PC, através da técnica proteômica. As 361 proteínas identificadas no presente estudo foram correlacionadas com os estudos em proteômica em FCG encontrados na literatura (Bostanci *et al.*, 2010; Grant *et al.*, 2010; Ngo *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011; Baliban *et al.*, 2012; Bostanci *et al.*, 2013). Dentre elas, 183 proteínas ainda não haviam sido relatadas como presentes no FCG. Destas, 178 proteínas foram detectadas também por outros autores e relacionadas como presentes em estados de saúde ou inflamação periodontal (154), ou apenas na PC (1), gengivite (10) ou saúde periodontal (13) (Fig. 17).

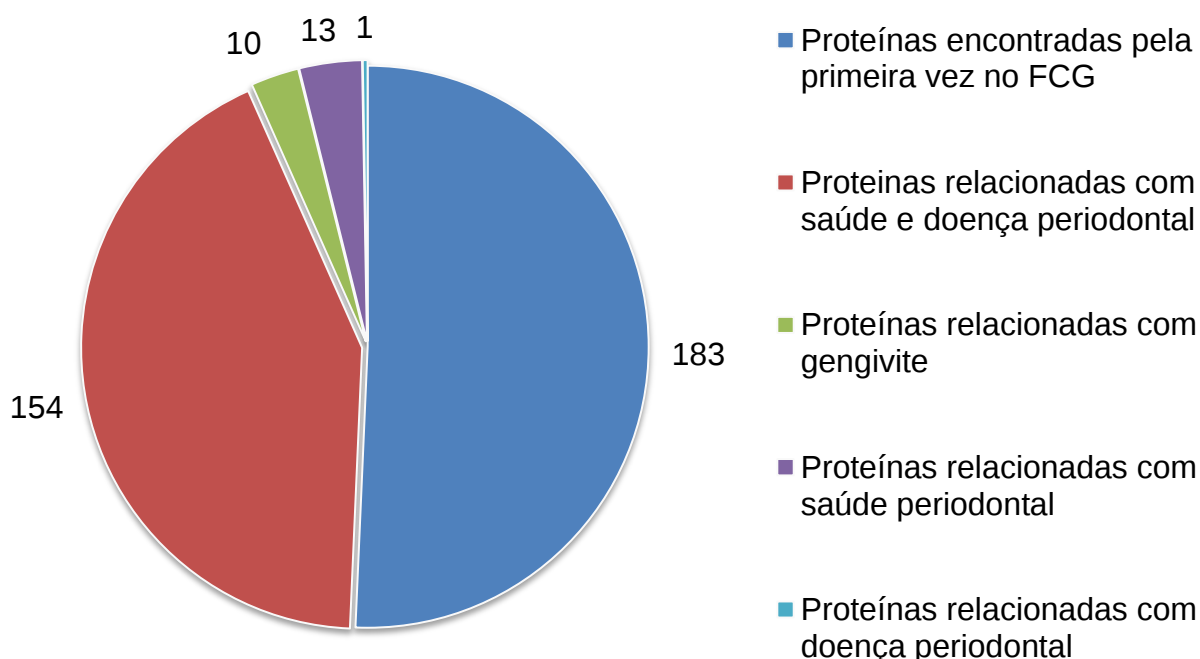


Figura 16. Distribuição das 361 proteínas detectadas em FCG no presente estudo e a comparação com bancos de dados dos estudos prévios com FCG.

A análise proteômica de fluidos corporais humanos é desafiadora devido ao grande número de proteínas que podem ser identificadas e pela modificação que elas podem sofrer quando estão atuando nos tecidos. Como por exemplo, ligando-se a outras proteínas para exercerem sua função ou tendo uma ação diferente quando encontradas no FCG que não a função já reconhecida dessa proteína. Quando comparamos as identificações de proteínas pelos estudos em FCG, percebemos que um grande número de proteínas foram identificadas, entretanto devido as diferentes metodologias utilizadas, as identificações de proteínas podem apresentar muita variabilidade.

A variação individual na expressão de proteínas pelos indivíduos pode ser minimizada com o aumento do número de amostras. Entretanto, sabemos que a variedade de proteínas detectadas se deve a algumas variáveis que podem interferir no resultado como as diferentes técnicas de coleta, preparação de amostras e manejo, pré-fracionamento das proteínas, depleção por afinidade de proteínas mais abundantes, separação por cromatografia multidimensional, quantificação de proteínas, análise de dados e critérios de busca em bancos de dados (Hu, Loo e Wong, 2006).

Para a definição de biomarcadores que possam servir de diagnóstico ou de prognóstico da perda de inserção, é preciso que haja a definição do “baseline” de saúde periodontal e devido a essa grande variação de proteínas identificadas é difícil definir o que seria esse “baseline”. Portanto, além da nossa investigação principal, analisando os estados de doença comparando com os estados de saúde, encontramos proteínas no FCG em saúde periodontal que ainda não haviam sido identificadas. Então podemos afirmar que, nosso estudo acrescentou novas proteínas identificadas ao banco de dados de FCG em saúde periodontal (187 proteínas).

Para a coleta de amostras do FCG, com o objetivo de se obter um volume suficiente de amostra, foi tomada a decisão de fazer um pool de amostras, assim como foi utilizado em outros estudos publicados na literatura (Grant *et al.*, 2010; Bostanci *et al.*, 2010; Baliban *et al.*, 2012), sacrificando o detalhamento de cada sítio no intuito de uma obtenção de um maior volume de amostra que fosse representativa de cada grupo, gerando assim um maior número de proteínas identificadas, especialmente aquelas de menor abundância (Kido *et al.*, 2012).

Similarmente, o pool de amostras de sítios aleatórios, ao invés da inclusão de todos os sítios, tem efeitos deletérios, podendo potencialmente subestimar ou superestimar a abundância das proteínas identificadas. Acreditamos que a estratégia de coleta utilizadas no atual estudo, para atingir um maior número de sítios, representativos de saúde e doença periodontal, tenha superado esses problemas.

No desenvolvimento do protocolo de preparação das amostras, a inclusão da etapa de depleção do excesso de albumina se mostrou deletéria, pois houve perda na quantidade de proteínas identificadas e, ainda assim, a albumina foi detectada pela MS (dados não apresentados). A albumina do soro tem função de transporte de diversas outras proteínas como hormônios, citocinas e lipoproteínas (Dea *et al.*, 2002). O efeito deletério dessa etapa também foi demonstrado por estudo recente, onde a resina usada após a depleção do excesso de albumina foi submetida à LC-MS e foram identificadas 37 proteínas que permaneceram aderidas no processo (Carneiro *et al.*, 2012).

Dentre os resultados encontrados na literatura em relação ao volume de FCG coletado através da técnica com o periopaper, podemos dizer que no presente estudo o volume coletado de $0,72 \pm 0,21$ em indivíduos com PC foi compatível com os resultados encontrados por Carneiro, Nouh e Salih (2014) ($0,73 \pm 0,19$), Silva-Boghossian *et al.* (2013) ($0,30 \pm 0,06$) e Bostanci *et al.* (2010) ($0,58 \pm 0,30$). O volume coletado de indivíduos com saúde periodontal ($0,58 \pm 0,26$) foi maior que no estudo do Carneiro, Nouh e Salih (2014) ($0,49 \pm 0,12$), Silva-Boghossian *et al.* (2013) ($0,10 \pm 0,03$), Bostanci *et al.* (2010) ($0,16 \pm 0,09$) e Bostanci *et al.* (2013) ($0,25 \pm 0,14$). O resultado de maior volume coletado em pacientes saudáveis se deve a técnica de coleta, onde em pacientes saudáveis utilizamos um tempo maior de inserção da tira no sulco gengival, com o objetivo de otimizar a coleta e ter uma quantidade de proteínas satisfatória para conduzir o experimento. A otimização da coleta do FCG foi possível pois o objetivo do estudo não foi comparar o volume ou o fluxo de FCG entre esses grupos.

A média da concentração de proteínas por tira de periopaper em pacientes com saúde periodontal do presente estudo ($\sim 22 \mu\text{g/mL}$) foi menor que no estudo de Carneiro, Nouh e Salih (2014) ($\sim 49 \mu\text{g/mL}$) e de Bostanci *et al.* (2013) ($\sim 56 \mu\text{g/mL}$). A média da concentração de proteínas por tira de periopaper em pacientes com PC

também foi menor (~31 µg/mL) em comparação com o estudo do Carneiro, Nouh e Salih (2014) (~56 µg/mL).

A recuperação das proteínas das tiras de periopaper foi menor em nosso estudo (62%) em comparação ao estudo do Carneiro, Nouh e Salih (2014) (80%), entretanto não foi possível a comparação com mais estudos pois os mesmos não apresentam esses dados. Essa diferença se deve à técnica utilizada para eluição das proteínas do papel, onde utilizamos a eluição simples em NH_4HCO_3 , enquanto o estudo do Carneiro, Nouh e Salih (2014) utilizou a eletroeluição em gel, e outros estudos utilizando FCG através da proteômica utilizaram PBS ou solução de acetonitrila ou uréia. Pela incompatibilidade do NH_4HCO_3 usado na eluição das tiras de papel com os reagentes de iTRAQ, foi necessária a introdução de uma etapa de remoção desse eluente, através do uso de uma coluna de troca catiônica C-18, podendo assim ter gerado alguma perda de amostra. Porém, a vantagem foi que a inclusão dessa etapa nos gerou uma marcação mais “purificada”, onde fomos capazes de marcar principalmente peptídeos, pois as proteínas não digeridas ou digeridas parcialmente, não foram levadas para a etapa de marcação. Outro método eficaz de eluição é o uso da eletroforese em gel (GE) de SDS-PAGE, que “força” as proteínas a saírem do papel e são separadas pela sua massa (Da), tornando possível a análise separada das diversas bandas formadas, diminuindo assim a complexidade das amostras a serem analisadas por MS (Carneiro *et al.*, 2012; Carneiro, Nouh e Salih, 2014). Em contrapartida, além de aumentar a complexidade da técnica e o tempo de execução, a GE pode limitar a detecção de peptídeos de menor tamanho (Pisano *et al.*, 2005).

Dentre os estudos comparados na literatura, dois tiveram maior concordância com as proteínas identificadas do presente estudo, e nestes foram encontradas 94 proteínas convergentes (Fig. 18). Nos estudos seguintes, foram coletadas amostras de sítios com PC e saúde periodontal (Baliban *et al.*, 2012) e apenas de saúde periodontal (Tsuchida *et al.*, 2012).

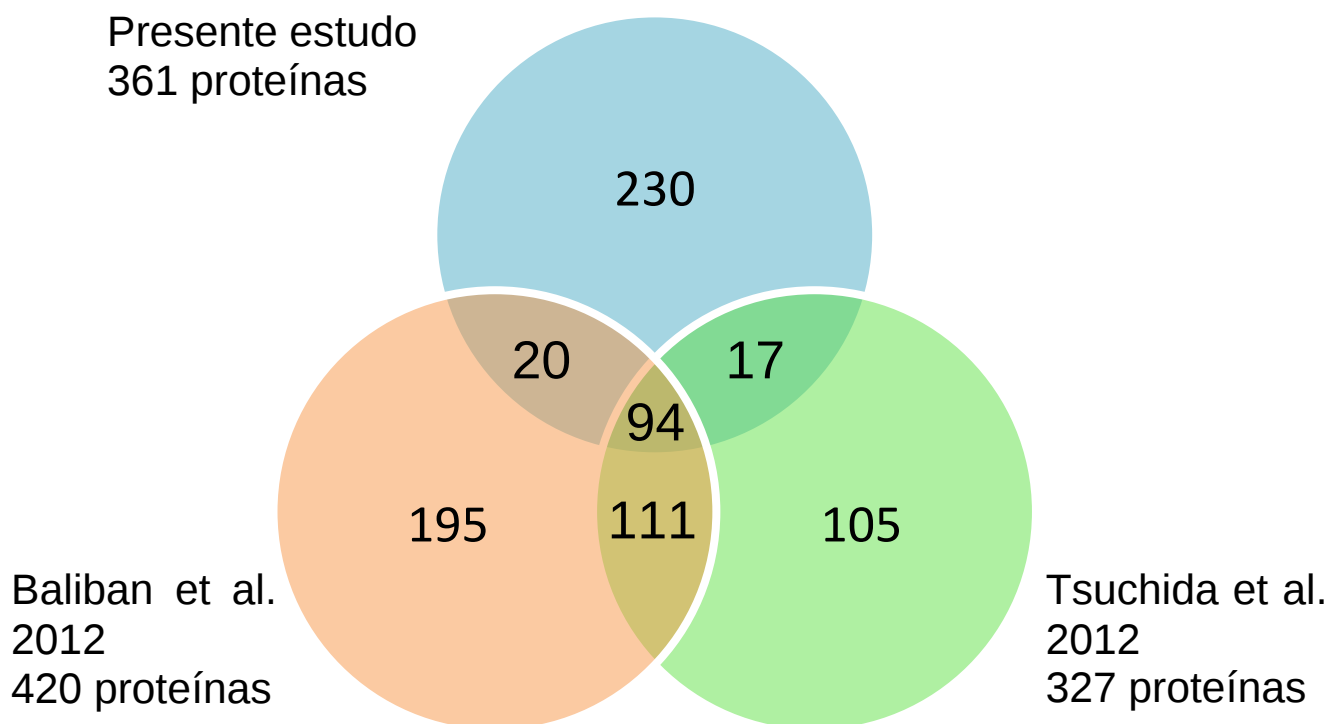


Figura 17. Diagrama de Venn correlacionando as proteínas detectadas por MS do estudo atual e de 2 estudos anteriores (Baliban *et al.*, 2012; Tsuchida *et al.*, 2012).

Parte dos estudos de proteômica baseados em MS apresentou somente uma análise qualitativa (Ngo *et al.*, 2010; Baliban *et al.*, 2012; Carneiro *et al.*, 2012; Tsuchida *et al.*, 2012) ou incluiu análise quantitativa em modelo de gengivite induzida de 21 dias (Grant *et al.*, 2010; Bostanci *et al.*, 2013). Em indivíduos com Periodontite foram desenvolvidas análises quantitativas “label-free” (Choi *et al.*, 2011; Silva-Boghossian *et al.*, 2013; Huynh *et al.*, 2014) e quantitativa com marcadores (Tsuchida *et al.*, 2013; Carneiro, Nouh e Salih, 2014). A utilização de marcadores para proteômica tem suas desvantagens como a perda de amostra nas etapas necessárias para se livrar das substâncias que interferem na marcação, na limpeza dos próprios reagentes da marcação, e a “dependência” da qualidade da

marcação para a quantificação relativa, que pode diminuir o número de proteínas identificadas e quantificadas. No presente estudo não houve a quantificação absoluta de proteínas, apenas a quantificação relativa entre as condições do estudo. Essa limitação não nos permite afirmar quais as proteínas mais abundantes ou menos abundantes no FCG, ou buscar proteínas que estejam expressas em apenas uma ou mais condições. As proteínas quantificadas estavam presentes em todas as condições de estudo.

Grande parte dos estudos nessa área (proteômica “label-free”) buscam proteínas que estão presentes exclusivamente em saúde periodontal, Gengivite ou Periodontite. Mesmo em tecidos periodontais saudáveis podemos encontrar proteínas relacionadas com a inflamação, em menores quantidades que tecidos inflamados, afinal histologicamente encontramos células inflamatórias em tecido periodontal clinicamente saudável. Os tecidos periodontais estão em constante remodelamento e enfrentando a formação de placa bacteriana local. É possível que estejam expressos produtos de degradação tecidual e de resposta inflamatória do hospedeiro em tecidos periodontais saudáveis e que técnicas de MS com maior sensibilidade possam ser capazes de detectá-las. No atual estudo, foi possível detectar e quantificar proteínas como o Complemento C-4 A e B, Angiotensinogênio, Miosina-11 e algumas classes de Igs em todas as condições, enquanto em outros estudos essas proteínas foram expressas apenas por indivíduos com saúde periodontal. Portanto, o caminho para a detecção de estados preditivos para a Periodontite pode não ser apenas a identificação de biomarcadores, mas a sua quantificação acurada.

A principal limitação do presente estudo foi o número de indivíduos por grupo de amostra (5 por grupo, 20 no total) que faz com que a variação individual na composição do FCG possa ser capaz de ter alterado a representatividade do determinado grupo em relação à população de indivíduos com o DM2. Entretanto, como ponto forte, podemos destacar a homogeneidade na característica da população e as delimitações estritas nos critérios de inclusão e exclusão. Todos os indivíduos incluídos no presente estudo apresentavam faixa etária próxima (entre 45 e 65 anos), mesmo padrão de doença/saúde periodontal entre os grupos com e sem DM2, indivíduos com dificuldade de controle do DM2 (níveis de HbA1C $\geq 7\%$ e $\leq 10\%$), e não inclusão de indivíduos com fatores de risco locais e sistêmicos para a

PC nos grupos de saúde periodontal, tais como o fumo, doenças genéticas, autoimunes ou usando medicamentos imunossupressores. Outros pesquisadores incluíram fumantes em sua amostra (Huynh *et al.*, 2014) ou não especificaram a sua inclusão (Bostanci *et al.*, 2010; Kido *et al.*, 2012).

Mais de 50% das proteínas quantificadas tem a função de resposta inflamatória/imune (26%) ou estrutura/adesão celular (25%), mostrando a característica desse fluido corporal, de expressar proteínas de resposta inata, pela presença de conteúdo de PMNs, adquirida, pela presença de Igs e componentes resultantes de degradação celular, como queratinas e histonas.

No presente estudo as proteínas S100A8 e S100A9 se mostraram elevadas em todas as condições de doença, em comparação com o grupo controle SS. Surpreendentemente, estavam cerca de 2 vezes mais elevadas no grupo saudável periodontalmente com DM2 (DS), em comparação com o grupo controle SS. No grupo com diabetes e periodontite (DP), a S100-A8 apareceu 2,5 vezes mais elevada e a S100-A9 3,5 vezes mais elevada. Essas proteínas são secretadas por neutrófilos, monócitos e queratinócitos e possuem a capacidade de inibir o crescimento bacteriano e estão relacionadas com eventos inflamatórios (Kojima *et al.*, 2000), entretanto como podemos ver no presente estudo também estão expressas em menores quantidades no FCG de indivíduos saudáveis (SS).

A presença de proteínas circulantes da família S100 tem sido associada com condições inflamatórias como obesidade, artrite reumatoide e doenças cardiovasculares (Chen *et al.*, 2009). No DM2, seu efeito na sensibilidade à insulina em humanos ainda precisa ser investigado, mas em modelos animais já foram demonstradas algumas relações (Ortega *et al.*, 2013). No FCG, elas estão associadas com a inflamação, fazendo parte da resposta imune inata.

As proteínas S100-A8 e S100-A9 são ligantes de íons metálicos, como cálcio e zinco, e já foram relatadas como aumentadas no FCG de indivíduos com periodontite (Bostanci *et al.*, 2013; Carneiro, Nouh e Salih, 2014). Elas são capazes de se associar formando um complexo chamado Calprotectina que é encontrado em grande quantidade no citoplasma de neutrófilos, as primeiras células na linha de defesa nos tecidos periodontais. Quando ligada ao cálcio, possui a capacidade de sequestrar os íons essenciais zinco e manganês de bactérias e fungos, o que confere sua capacidade antimicrobiana. A calprotectina já foi relatada no

soro/plasma (Sander *et al.*, 1984; Muller *et al.*, 1994; Golden *et al.*, 1996) e em outros fluidos corporais, como no fluido cerebrospinal (Dunlop *et al.*, 1991), fluido sinovial (Berntzen *et al.*, 1991), urina (Holt, Fagerhol e Dale, 1983), fezes (Roseth, Schmidt e Fagerhol, 1999) e saliva (Cuida *et al.*, 1995). No FCG esse complexo foi relatado como aumentado em alguns indivíduos na fase inicial de inflamação gengival em gengivite experimental (Que, Andersen e Mombelli, 2004).

Estudos mostram que a expressão de Queratinas no FCG pode ser maior em pacientes com Gengivite e PC do que em pacientes com saúde periodontal (McLaughlin *et al.*, 1996). Assim como em estudos prévios (Silva-Boghossian *et al.*, 2013), no presente estudo foram identificadas diversas classes de queratina, porém poucas estavam diferencialmente expressas nas condições de PC, como aumento mais expressivo na razão entre SP/SS, onde a Queratina II, citoesqueleto 5 e 75 estavam 1,5 vezes aumentada.

Diversas classes de Histonas foram identificadas no presente estudo, concordando com estudos prévios (Ngo *et al.*, 2010; Carneiro *et al.*, 2012; Silva-Boghossian *et al.*, 2013). Na comparação da abundância relativa, as Histonas 1, 3 e 4 se encontraram diminuídas na relação SP/SS, enquanto na relação DP/SS, apenas as Histonas 2 se mostraram aumentadas. As histonas fazem parte da estrutura altamente complexa da cromatina, fazendo a organização do material genético. No FCG, foram relatadas como sendo componentes da resposta imune inata de Neutrófilos, conhecidos como “Neutrophil Extracellular Traps” (NETs) com função antimicrobiana, se ligando à microorganismos, levando a sua neutralização e degradação (Vitkov *et al.*, 2009).

O MARCKS, principal substrato para a proteína quinase C e responsável pela regulação de outras proteínas através da fosforilação de grupos hidroxilo de resíduos de aminoácidos serina e treonina, se mostrou diminuído nas condições de doença (DS, SP e DP). Dentre outras funções, estudos sugerem que ela pode ser responsável pela mediação da resposta imune, regulando a migração e adesão de neutrófilos (Eckert *et al.*, 2010) e sugerem que a inibição do MARCKS poderia causar a diminuição de uma resposta inflamatória exacerbada (Damera *et al.*, 2010), sendo conflitante com o resultado do atual estudo.

Na comparação entre o grupo sem o DM2 e com PC e o grupo sem o DM2 e saúde periodontal (SP/SS), foram identificadas 76 proteínas com diferença

significativa na abundância relativa e 85% se encontraram diminuídas. O padrão de variação da abundância nessa comparação fugiu a regra em relação as demais comparações entre os grupos, onde os pacientes com PC apresentaram uma quantidade maior de proteínas aumentadas, especialmente as inflamatórias. Entretanto, as proteínas S100A8 e S100A9 se mostraram aumentadas assim como nos demais grupos, quando comparamos com o grupo SS, mostrando compatibilidade com o resultado esperado de aumento dessas proteínas inflamatórias. Dentre as proteínas que se apresentaram aumentadas podemos destacar a IgG-3, S100A8, S100A9, Queratina tipo II citoesqueleto 5 e 75, e Fator de troca de nucleotídeo rap guanina 1.

Das diversas proteínas que se encontraram diminuídas na comparação SP/SS, encontramos proteínas inflamatórias e prováveis produtos de degradação celular, como a Mucina-16, Histonas, Igs e Actina 1 e 2. A actina é uma das proteínas mais abundantemente detectadas no FCG (Grant *et al.*, 2010; Ngo *et al.*, 2010; Baliban *et al.*, 2012) e foi relatada sua função na regulação da reabsorção óssea por osteoclastos através de podossomos e zonas de selamento de actina. A presença de actina e ligantes da Actina (Gelsolina, Profilina e Cofilina) em altos níveis foi relatada no FCG de indivíduos com Periodontite (Kido *et al.*, 2012), podendo estar relacionada com o processo inflamatório devido a destruição celular e consequente liberação de produtos intracelulares. Entretanto, no presente estudo a actina-1 e -2 foram encontradas em níveis mais baixos nos grupos SP, DS e DD que no grupo SS. Enquanto a profilina-1 e cofilina-1 foram mais baixas apenas na comparação entre SP/SS.

A comparação entre o grupo com o DM2 e saúde periodontal, e o grupo sem o DM2 e saúde periodontal (DS/SS) poderia demonstrar uma expressão similar na quantificação de proteínas, afinal ambos grupos apresentavam saúde periodontal, sem a presença de inflamação gengival. Entretanto, no nosso estudo encontramos algumas diferenças na expressão proteica entre esses grupos. Foram encontradas apenas 27 proteínas com diferença significativa e 75% delas se apresentaram diminuídas. Sete se mostraram aumentadas e dentre elas, a S100A8 e S100A9, se mostraram aumentadas na mesma proporção que na comparação entre os grupos SP/SS.

A Anexina A1 se mostrou diminuída na comparação DS/SS, corroborando com resultados de estudos prévios, onde foi relacionada com a condição de saúde periodontal (Bostanci *et al.*, 2010) e parecendo não se alterar com desenvolvimento de inflamação no processo de gengivite (Grant *et al.*, 2010). As anexinas são um grupo de proteínas ligantes de Ca^{2+} , estão presentes na superfície de algumas células, como leucócitos e células epiteliais, e podem ser liberadas frente à inflamação tecidual. Seu mecanismo anti-inflamatório pode vir da sua capacidade de se ligar diretamente a endotoxinas bacterianas, suprimindo a resposta inflamatória celular e sistêmica (Eberhard e Vandenberg, 1998). Em modelos animais, a ausência da Anexina A1 está associada com o aumento da inflamação de fase aguda e de citocinas (Yang, Hutchinson e Morand, 1999; Damazo *et al.*, 2005). Também se mostrou diminuída nesse grupo a Mucina 16, que foi demonstrado ter efeito protetor no epitélio de outros órgãos como, no ouvido médio (Kerschner, 2007) e no epitélio da superfície ocular (Hori *et al.*, 2004), e foi detectada também no FCG de indivíduos com saúde periodontal (Carneiro *et al.*, 2012). Alguns componentes estruturais se mostraram diminuídos, como a Actina 1 e 2, e componentes da matriz extracelular como a Desmoplaquina e a Vitronectina.

Sabemos que indivíduos com DM2 e ótimo controle glicêmico ($\text{HbA1C} < 7\%$) tem a prevalência de PC de indivíduos sem o diabetes. Como esperado de um fluido que tem contribuição na sua composição de componentes do soro, o resultado encontrado sugere que o DM2, quando mal controlado, possa alterar a composição do FCG mesmo em indivíduos com saúde periodontal. Visto que os indivíduos incluídos no presente estudo apresentavam a glicemia alterada ($\text{HbA1C} \geq 7\%$), os resultados do presente estudo sugerem que o descontrole metabólico poderia ser capaz de alterar a expressão de proteínas presentes no FCG, alterando assim a resposta imune e inflamatória local, podendo levar esses indivíduos a estar mais vulneráveis a uma mudança da microbiota local, o que pode resultar em aumento do risco em desenvolver a inflamação gengival e a perda de inserção. Porém, são necessários mais estudos para esclarecer a contribuição da alteração do nível glicêmico na composição de proteínas no FCG, em indivíduos com o DM2.

Na comparação entre o grupo com o DM2 e PC e o grupo sem o DM2 e saúde periodontal (DP/SS), como esperado das duas condições mais distintas entre os grupos de estudo, podemos observar as diferenças mais expressivas na

quantificação de proteínas, principalmente nas proteínas inflamatórias, como a S100A8, S100A9, Azurocidina, Elastase de neutrófilo, Mieloperoxidase e diversas classes de Igs. A Elastase de neutrófilo e a Mieloperoxidase foram previamente relatadas como elevadas em indivíduos com PC (Choi *et al.*, 2011) e são encontradas em grânulos azurófilos, lisossomas especializados de neutrófilos, especialmente durante a fase de diferenciação celular (Zimmer *et al.*, 1992).

A Azurocidina foi indicada como um biomarcador potencial da Periodontite pelo aumento da sua expressão no FCG de pacientes com PC (Choi *et al.*, 2011). Entretanto, os resultados do presente estudo não confirmam esse achado, pois tivemos o aumento da Azurocidina apenas na comparação de DP/SS, e em nenhuma das outras comparações da condição de PC com a saúde periodontal. O maior aumento que tivemos da Azurocidina foi na relação DP/SP, onde ambas as condições são de PC.

Assim como na comparação do grupo DP/DS, na relação DP/SS a proteína Titina também se mostrou elevada cerca de 2 vezes mais nesse grupo de PC, com relação aos grupos de saúde periodontal. É normalmente encontrada em células do tecido muscular, entretanto em células não-musculares parece ter a função de condensação e segregação dos cromossomos durante a fase de mitose celular (Mayans *et al.*, 1998).

Outra proteína que se mostrou aumentada na comparação DP/DS foi a Alfa 2 macroglobulina, que é sintetizada por fibroblastos na gengiva, e com o aumento da inflamação pode ser secretada por macrófagos e linfócitos (Giannopoulou *et al.*, 1990). Essa proteína é capaz de inibir as quatro classes de proteases através de sítio de ligação de clivagem específico para cada protease, e seu aumento no tecido periodontal parece indicar um consumo desse inibidor pelas proteases e um “clearance” de proteases (Lah *et al.*, 1993). Os níveis dessa proteína podem aumentar com a idade e com a presença de inflamação gengival, em gengivite experimental (Fransson *et al.*, 1999).

Dentre as proteínas que se encontraram diminuídas na comparação DP/DS podemos destacar algumas proteínas ligadas a inflamação/resposta imune e estrutura celular, como a Anexina A1, Actinas e proteínas relacionadas com metabolismo celular.

A comparação entre o grupo com o DM2 e PC, e o grupo com o DM2 e saúde periodontal (DP/DS) evidencia a influência da PC no perfil proteico do FCG de pacientes com DM2, sob as mesmas condições de hiperglicemia. Comparando as alterações do grupo DP/DS com as alterações do grupo SP/SS, que também tem a PC como variável, não foi observado o mesmo perfil de variação de abundância das proteínas, afinal o grupo SP mostrou muitas proteínas diminuídas em relação ao grupo SS

Na comparação DP/DS podemos observar a diminuição de apenas 3 proteínas, enquanto 38 se encontraram aumentadas. Dentre as que tiveram aumento mais expressivo, podemos destacar proteínas relacionadas ao transporte celular, provenientes do soro sanguíneo, como a Hemoglobina α e β , Albumina do soro e Hemopexina. A presença dessas proteínas sanguíneas de transporte celular poderia nos levar a considerar a hipótese de contaminação com sangue durante a coleta, especialmente nos grupos de PC, onde há inflamação gengival e o risco de contaminação é maior que nos paciente com saúde periodontal. Entretanto, no grupo SP, onde os sítios coletados possuíam o mesmo grau de inflamação gengival que do grupo DP, foi encontrado a diminuição das mesmas proteínas.

Ainda na comparação entre DP/DS, além do inibidor de proteases Alfa 2 macroglobulina, tivemos também o aumento de um inibidor de proteases de serina, a Alfa 1 antitripsina, que é capaz de inibir a degradação de elastina, especialmente através da inibição da Elastase de Neutrófilo (Dau *et al.*, 2015). Entretanto, em estudo utilizando o FCG foi detectado que menos de 10% da Elastase de neutrófilo livre estava ligada a Alfa 1 antitripsina, que formam o complexo Alfa 1 antitripsina-Elastase de neutrófilo, e mesmo sob as condições de excesso de Elastase de Neutrófilo, a Alfa 1 antitripsina parece inativar outras proteases, além da Elastase de Neutrófilo, em sítios saudáveis e com Periodontite (Smith, Wang e Sim, 1994). Em outro estudo com FCG, foram quantificados os níveis da Alfa 1 antitripsina em diferentes graus de inflamação (Gengivite e Periodontite em bolsas rasas e profundas) não foi demonstrada alteração entre essas diferentes condições periodontais, porém não foram utilizados sítios saudáveis como controle (Figueredo *et al.*, 1999).

A comparação entre o grupo com o DM2 e PC, e o grupo sem o DM2 e PC (DP/SP) foi a que mostrou o maior número de proteínas diferencialmente expressas,

86 proteínas, com 96% delas aumentadas. Sendo a diferença entre esses grupos a presença ou ausência do DM2, podemos sugerir que existam alterações na expressão de proteínas dos tecidos periodontais, provocadas pela hiperglicemia prologada do DM2, que se refletem no FCG. Cerca de 60% das proteínas diferencialmente expressas nessa razão pertencem a proteínas inflamatórias/resposta imune (34%) e estruturais/adesão celular (26%). Dentre as inflamatórias/resposta imune estão proteínas do Complemento (C)-3 e -4, Igs, MMP-9, Lactotransferrina, Azurocidina e Elastase de neutrófilo.

As proteínas C-3 e C-4, que se mostram aumentadas na comparação DP/SP, são ativadas pela presença de microorganismos, e desencadeiam eventos da resposta imune, que incluem a opsonização e apoptose bacteriana, liberação de agentes pró-inflamatórios e modulação de outros mecanismos da resposta imune. Estudos recentes em ratos e primatas não humanos indicam que o Complemento está relacionado com a desregulação da microbiota e da resposta inflamatória do hospedeiro, podendo resultar na destruição periodontal (Hajishengallis *et al.*, 2011; Maekawa *et al.*, 2014). Outros estudos já mostraram a relação do aumento do C-3 e C-4 em indivíduos com PC generalizada (Anil *et al.*, 1991) e em indivíduos com diabetes e PC (Anil *et al.*, 1990) entretanto, no grupo SP não foi observado esse aumento.

Estudos em proteômica quantitativa, como o presente estudo, tem o objetivo de fornecer um perfil geral das proteínas presentes numa amostra biológica, de forma imparcial, sem a procura de proteínas específicas. A utilização de marcadores de iTRAQ possibilita uma maior precisão na quantificação, eliminando os vieses das diversas injeções de diferentes amostras biológicas, como na proteômica "label-free". As pesquisas científicas que utilizam essa metodologia se destinam a fornecer pistas para futuros estudos, mais aprofundados, em vez de fornecer respostas definitivas, pois existem técnicas com maior sensibilidade que são capazes de determinar variações de proteínas específicas, validando os achados dos estudos em proteômica.

Pelas informações encontradas na literatura, no limite de nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a avaliar o FCG de indivíduos com DM2, como fator de risco para a PC, através da técnica proteômica. Além disso, foram identificadas diversas proteínas que não haviam sido previamente relatadas no FCG.

Através da análise do perfil proteico dos diferentes grupos de estudo, podemos afirmar que grande parte das proteínas presentes no FCG são de origem da resposta imune/inflamatória ou produtos de degradação celular do hospedeiro. As proteínas S100A8 e S100A9 foram as proteínas identificadas com diferença mais expressiva na abundância entre os grupos de estudo e parecem ser biomarcadores potenciais para indicar a perda óssea, ou como indicador de risco para tal. Entretanto, não foi possível quantificar os níveis dessa proteína na forma do complexo chamado calprotectina. Se essas estavam atuando separadamente no sulco gengival, estudos futuros são necessários para elucidar esses achados. Outras proteínas diferencialmente expressas foram identificadas como possíveis biomarcadores, como a Annexina 1 que se mostrou relacionada à saúde periodontal, além de proteínas inibidoras de proteases como a Alfa 1 antitripsina e Alfa 2 macroglobulina que parecem estar relacionadas com a PC.

REFERÊNCIAS

- AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J**, v. 25, p. 229-35, 1975.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. 2015. Sec. 2. In Standards of Medical Care in Diabetes 2015. Diabetes Care 2015;38(Suppl. 1):S8–S16
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar 13 2003. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.
- ANIL, S. et al. Total hemolytic complement (CH50) and its fractions (C3 and C4) in the sera of diabetic patients with periodontitis. **J Periodontol**, v. 61, p. 27-9. Jan 1990.
- ANIL, S. et al. Immunology of chronic generalized **periodontitis**. 2. Estimation of total hemolytic complement (CH 50) and its fractions **C3** and **C4**. Indian J Dent Res, v. 2, p. 35-9. Jul-Dec 1991.
- ARA, T. et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. **J Periodontal Res**, v. 44, n. 1, p. 21-7, Feb 2009. ISSN 0022-3484.
- ARMITAGE, G. C. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 34, p. 109-19, 2004. ISSN 0906-6713 (Print) 0906-6713.
- BALIBAN, R. C. et al. Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 3, p. 203-12, Mar 2012. ISSN 0303-6979.
- BERNTZEN, H. B. et al. The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 20, n. 2, p. 74-82, 1991. ISSN 0300-9742 (Print) 0300-9742.
- BICKEL, M.; CIMASONI, G.; ANDERSEN, E. Flow and albumin content of early (pre-inflammatory) gingival crevicular fluid from human subjects. **Arch Oral Biol**, v. 30, n. 8, p. 599-602, 1985. ISSN 0003-9969 (Print) 0003-9969.
- BORGNACKE, W. S. et al. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. **J Periodontol**, v. 84, n. 4 Suppl, p. S135-52, Apr 2013. ISSN 0022-3492.
- BOSTANCI, N. et al. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). **J Proteome Res**, v. 9, n. 5, p. 2191-9, May 7 2010. ISSN 1535-3893.
- BOSTANCI, N. et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in experimental gingivitis. **J Proteome Res**, v. 12, n. 2, p. 657-78, Feb 1 2013. ISSN 1535-3893.
- CARNEIRO, L. G.; NOUH, H.; SALIH, E. Quantitative gingival crevicular fluid proteome in health and periodontal disease using stable isotope chemistries and mass spectrometry. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 8, p. 733-47, Aug 2014. ISSN 0303-6979.
- CARNEIRO, L. G. et al. Proteome data set of human gingival crevicular fluid from healthy periodontium sites by multidimensional protein separation and mass spectrometry. **J Periodontal Res**, v. 47, n. 2, p. 248-62, Apr 2012. ISSN 0022-3484.

CHARON, J.; TOTO, P. D.; GARGIULO, A. W. Activated macrophages in human periodontitis. **J Periodontol**, v. 52, n. 6, p. 328-35, Jun 1981. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

CHEN, L.; MAGLIANO, D. J.; ZIMMET, P. Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 4, p. 228-36, Apr 2012. ISSN 1759-5029.

CHEN, Y. S. et al. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 2, p. R39, 2009. ISSN 1478-6354.

CHOI, Y. J. et al. Identification of azurocidin as a potential periodontitis biomarker by a proteomic analysis of gingival crevicular fluid. **Proteome Sci**, v. 9, p. 42, 2011. ISSN 1477-5956.

COBB, C. M. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. **J Clin Periodontol**, v. 29, n. s2, p. 22-32, May 2002. ISSN 0303-6979.

CUIDA, M. et al. Calprotectin levels in oral fluids: the importance of collection site. **Eur J Oral Sci**, v. 103, n. 1, p. 8-10, Feb 1995. ISSN 0909-8836 (Print) 0909-8836.

DAMAZO, A. S. et al. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. **Am J Pathol**, v. 166, n. 6, p. 1607-17, Jun 2005. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440.

DAMERA, G. et al. Inhibition of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein inhibits ozone-induced airway neutrophilia and inflammation. **Exp Lung Res**, v. 36, n. 2, p. 75-84, Mar 2010. ISSN 0190-2148.

DANAEI, G. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 31-40, Jul 2 2011. ISSN 0140-6736.

DAU, T. et al. Autoprocessing of neutrophil elastase near its active site reduces the efficiency of natural and synthetic elastase inhibitors. **Nat Commun**, v. 6, p. 6722, 2015. ISSN 2041-1723.

DEA, M. K. et al. Albumin binding of acylated insulin (NN304) does not deter action to stimulate glucose uptake. **Diabetes**, v. 51, n. 3, p. 762-9, Mar 2002. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797.

DEFRONZO, R. A. et al. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, 2015.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-7, Apr 14 2006. ISSN 0036-8075.

DUNLOP, O. et al. Calprotectin in cerebrospinal fluid of the HIV infected: a diagnostic marker of opportunistic central nervous system infection? **Scand J Infect Dis**, v. 23, n. 6, p. 687-9, 1991. ISSN 0036-5548 (Print) 0036-5548.

EBERHARD, D. A.; VANDENBERG, S. R. Annexins I and II bind to lipid A: a possible role in the inhibition of endotoxins. **Biochem J**, v. 330 (Pt 1), p. 67-72, Feb 15 1998. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021.

ECKERT, R. E. et al. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein regulation of human neutrophil migration. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 42, n. 5, p. 586-94, May 2010. ISSN 1044-1549.

EMBERY, G.; WADDINGTON, R. Gingival crevicular fluid: biomarkers of periodontal tissue activity. **Adv Dent Res**, v. 8, n. 2, p. 329-36, Jul 1994. ISSN 0895-9374 (Print) 0895-9374.

FIGUEREDO, C. M. et al. Increased interleukin-1beta concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. **J Periodontol**, v. 70, n. 12, p. 1457-63, Dec 1999. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

FRANSSON, C. et al. Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. **J Clin Periodontol**, v. 26, n. 7, p. 453-60, Jul 1999. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

GIANNOPOULOU, C. et al. Synthesis of alpha 2-macroglobulin in human gingiva: a study of the concentration of macroglobulin and albumin in gingival fluid and serum. **Arch Oral Biol**, v. 35, n. 1, p. 13-6, 1990. ISSN 0003-9969 (Print) 0003-9969.

GOLDEN, B. E. et al. Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. **Arch Dis Child**, v. 74, n. 2, p. 136-9, Feb 1996. ISSN 0003-9888.

GORST, C. et al. Long-term Glycemic Variability and Risk of Adverse Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 38, n. 12, p. 2354-69, Dec 2015. ISSN 0149-5992.

GRANT, M. M. et al. Proteomic analysis of a noninvasive human model of acute inflammation and its resolution: the twenty-one day gingivitis model. **J Proteome Res**, v. 9, n. 9, p. 4732-44, Sep 3 2010. ISSN 1535-3893.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J Periodontology**, v. 79, n. 8 (Suppl), p. 1585-91, Aug 2008.

GRIFFITHS, G. S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. **Periodontol 2000**, v. 31, p. 32-42, 2003. ISSN 0906-6713 (Print) 0906-6713.

HABER, J. et al. Evidence for Cigarette Smoking as a Major Risk Factor for Periodontitis. **J Periodontology**, v. 64, n. 1, p. 16-23, Jan 1993.

HAJISHENGALLIS G, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. **Cell Host Microbe**. 2011; 10(5):497–506.

HOLT, J.; FAGERHOL, M. K.; DALE, I. Quantitation of a leukocyte protein (L1) in urine. **Acta Paediatr Scand**, v. 72, n. 4, p. 615-6, Jul 1983. ISSN 0001-656X (Print) 0001-656x.

HORI, Y. et al. Differential regulation of membrane-associated mucins in the human ocular surface epithelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 45, n. 1, p. 114-22, Jan 2004. ISSN 0146-0404 (Print) 0146-0404.

HU, S.; LOO, J. A.; WONG, D. T. Human body fluid proteome analysis. **Proteomics**, v. 6, n. 23, p. 6326-53, Dec 2006. ISSN 1615-9853 (Print) 1615-9853.

HUYNH, A. H. et al. Gingival crevicular fluid proteomes in health, gingivitis and chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, Nov 29 2014. ISSN 0022-3484.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE 2013.

JAVED, F.; AL-ASKAR, M.; AL-HEZAIMI, K. Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of periodontitis patients with and without type 2 diabetes: a literature review. **J Periodontol**, v. 83, n. 2, p. 156-61, Feb 2012. ISSN 0022-3492.

KARDESLER, L. et al. Gingival crevicular fluid IL-6, tPA, PAI-2, albumin levels following initial periodontal treatment in chronic periodontitis patients with or without type 2 diabetes. **Inflamm Res**, v. 60, n. 2, p. 143-51, Feb 2011. ISSN 1023-3830.

KAWAI, T. et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. **Am J Pathol**, v. 169, n. 3, p. 987-98, Sep 2006. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440.

KERSCHNER, J. E. Mucin gene expression in human middle ear epithelium. **Laryngoscope**, v. 117, n. 9, p. 1666-76, Sep 2007. ISSN 0023-852X (Print) 0023-852x.

KIDO, J. et al. Analysis of proteins in human gingival crevicular fluid by mass spectrometry. **J Periodontal Res**, v. 47, n. 4, p. 488-99, Aug 2012. ISSN 0022-3484.

KOJIMA, T. et al. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. **J Dent Res**, v. 79, n. 2, p. 740-7, Feb 2000. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345.

KUMAR, M. S. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. **J Periodontol**, v. 77, n. 11, p. 1803-8, Nov 2006. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

LAH, T. T. et al. Cysteine proteinases and inhibitors in inflammation: their role in periodontal disease. **J Periodontol**, v. 64, n. 5 Suppl, p. 485-91, May 1993. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

LAMSTER, I. B.; AHLO, J. K. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1098, p. 216-29, Mar 2007. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923.

LAVU, V.; VENKATESAN, V.; RAO, S. R. The epigenetic paradigm in periodontitis pathogenesis. **J Indian Soc Periodontol**, v. 19, n. 2, p. 142-9, Mar-Apr 2015. ISSN 0972-124X (Print) 0972-124x.

LINDHE, J. et al. Consensus Report: Chronic Periodontitis. **Annals of Periodontology**, v. 4, n. 1, p. 38-38, 1999/12/01 1999. ISSN 1553-0841.

LINDHE, J; KARRING, T; LANG, NP. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral. Guanabara Koogan, 4ª edição, 2005.

MAEKAWA T, et al. Porphyromonas gingivalis manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. **Cell Host Microbe**. 2014; 15(6):768–78.

MARIOTTI, A. Dental plaque-induced gingival diseases. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 7-19, Dec 1999. ISSN 1553-0841 (Print) 1553-0841.

MARTIN, B. C. et al. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. **The Lancet**, v. 340, n. 8825, p. 925-29, Oct 1992.

MATTHEWS, J. B. et al. Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis. **J Dent Res**, v. 86, n. 8, p. 718-22, Aug 2007. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345.

MAYANS, O. et al. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. **Nature**, v. 395, n. 6705, p. 863-9, Oct 29 1998. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

MCLAUGHLIN, W. S. et al. Human gingival crevicular fluid keratin at healthy, chronic gingivitis and chronic adult periodontitis sites. **J Clin Periodontol**, v. 23, n. 4, p. 331-5, Apr 1996. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

MIELE, C. et al. Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism. **J Biol Chem**, v. 278, n. 48, p. 47376-87, Nov 28 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

MOLLER, D. E., FLIER, J. S. Insuline Resistance - Mechanisms, Syndromes, and Implications. **N Engl J Med**, v. 325, p. 938-48, Sep 1991.

MOORE, W. E. C.; MOORE, L. V. H. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 5, n. 1, p. 66-77, Jun 1994. ISSN 0906-6713

MULLER, F. et al. Elevated serum calprotectin levels in HIV-infected patients: the calprotectin response during ZDV treatment is associated with clinical events. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 7, n. 9, p. 931-9, Sep 1994. ISSN 0894-9255 (Print) 0894-9255.

NAITOH, T.; KITAHARA, M.; TSURUZOE, N. Tumor necrosis factor-alpha is induced through phorbol ester--and glycated human albumin-dependent pathway in THP-1 cells. **Cell Signal**, v. 13, n. 5, p. 331-4, May 2001. ISSN 0898-6568 (Print) 0898-6568.

NAVARRO-SANCHEZ, A. B.; FARIA-ALMEIDA, R.; BASCONES-MARTINEZ, A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 34, n. 10, p. 835-43, Oct 2007. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

NGO, L. H. et al. Mass spectrometric analyses of peptides and proteins in human gingival crevicular fluid. **J Proteome Res**, v. 9, n. 4, p. 1683-93, Apr 5 2010. ISSN 1535-3893.

NIU, Y. W. et al. [Effects of advanced glycation end products and its receptor on oxidative stress in diabetic wounds]. **Zhonghua Shao Shang Za Zhi**, v. 28, n. 1, p. 32-5, Feb 2012. ISSN 1009-2587 (Print) 1009-2587.

NOWOTNY, K. et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194-222, 2015. ISSN 2218-273x.

ORTEGA, F. J. et al. Targeting the association of calgranulin B (S100A9) with insulin resistance and type 2 diabetes. **J Mol Med (Berl)**, v. 91, n. 4, p. 523-34, Apr 2013. ISSN 0946-2716.

PAGE, R. C. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 216-48, Jun 1997. ISSN 0906-6713 (Print) 0906-6713.

PAGE, R. C.; EKE, P. I. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. **J Periodontol**, v. 78, n. 7s, p. 1387-99, Jul 2007.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. **Periodontol** 2000, v. 60, n. 1, p. 15-39, Oct 2012. ISSN 0906-6713.

PICHON-RIVIERE, A. et al. Quality of life in type 2 diabetes mellitus patients requiring insulin treatment in Buenos Aires, Argentina: a cross-sectional study. **Int J Health Policy Manag**, v. 4, n. 7, p. 475-80, Jul 2015. ISSN 2322-5939.

PISANO, E. et al. Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESI-MS. **Eur J Oral Sci**, v. 113, n. 6, p. 462-8, Dec 2005. ISSN 0909-8836 (Print) 0909-8836.

PRESHAW, P. M. et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. **Diabetologia**, v. 55, n. 1, p. 21-31, Jan 2012.

QUE, M. L.; ANDERSEN, E.; MOMBELLI, A. Myeloid-related protein (MRP)8/14 (calprotectin) and its subunits MRP8 and MRP14 in plaque-induced early gingival inflammation. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 11, p. 978-84, Nov 2004. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

ROSETH, A. G.; SCHMIDT, P. N.; FAGERHOL, M. K. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 34, n. 1, p. 50-4, Jan 1999. ISSN 0036-5521 (Print) 0036-5521.

ROSS, P. L. et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. **Mol Cell Proteomics**, v. 3, n. 12, p. 1154-69, Dec 2004. ISSN 1535-9476 (Print) 1535-9476.

SAKAMOTO, M. et al. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, n. Pt 3, p. 841-9, May 2002. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026.

SANDER, J. et al. Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 44, n. 4, p. 357-62, Jun 1984. ISSN 0036-5513 (Print) 0036-5513.

SCHMIDT, C.; URLAUB, H. iTRAQ-labeling of in-gel digested proteins for relative quantification. **Methods Mol Biol**, v. 564, p. 207-26, 2009. ISSN 1064-3745 (Print) 1064-3745.

SHADFORTH, I. P. et al. i-Tracker: for quantitative proteomics using iTRAQ. **BMC Genomics**, v. 6, p. 145, 2005. ISSN 1471-2164.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 87, n. 1, p. 4-14, Jan 2010. ISSN 0168-8227.

SILVA-BOGHOSSIAN, C. M. et al. Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75898, 2013. ISSN 1932-6203.

SMITH, Q. T.; WANG, Y. D.; SIM, B. Inhibition of crevicular fluid neutrophil elastase by alpha 1-antitrypsin in periodontal health and disease. **Arch Oral Biol**, v. 39, n. 4, p. 301-6, Apr 1994. ISSN 0003-9969 (Print)

0003-9969.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v. 25, n. 2, p. 134-44, Feb 1998. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

STABHOLZ, A.; SOSKOLNE, W. A.; SHAPIRA, L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 53, p. 138-53, Jun 2010. ISSN 0906-6713.

STEIN, S. H.; BORKE, J. L.; CUMMINGS, L. A. Effects of chronic adult periodontitis and endotoxin (LPS) on gingival fibroblast plasma membrane Ca⁺⁺-pump. **Connect Tissue Res**, v. 40, n. 1, p. 59-66, 1999. ISSN 0300-8207 (Print) 0300-8207.

SUELTER, C. H.; DELUCA, M. How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic. **Anal Biochem**, v. 135, n. 1, p. 112-9, Nov 1983. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697.

TABA, M. et al. Diagnostic Biomarkers for Oral and Periodontal Diseases. **Dental clinics of North America**, v. 49, n. 3, p. 551-vi, 2005. ISSN 0011-8532.

TAN, K. C. et al. Serum advanced glycation end products (AGEs) are associated with insulin resistance. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 27, n. 5, p. 488-92, Jul 2011. ISSN 1520-7552.

TAYLOR, J. J.; PRESHAW, P. M.; LALLA, E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. **J Clin Periodontol**, v. 40 Suppl 14, p. S113-34, Apr 2013. ISSN 0303-6979.

TSAI, C.; HAYES, C.; TAYLOR, G. W. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 30, n. 3, p. 182-92, Jun 2002. ISSN 0301-5661 (Print) 0301-5661.

TSUCHIDA, S. et al. Application of quantitative proteomic analysis using tandem mass tags for discovery and identification of novel biomarkers in periodontal disease. **Proteomics**, v. 13, n. 15, p. 2339-50, Aug 2013. ISSN 1615-9853.

TSUCHIDA, S. et al. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. **Proteomics**, v. 12, n. 13, p. 2190-202, Jul 2012. ISSN 1615-9861 (Electronic) 1615-9853 (Linking).

VITKOV, L. et al. Extracellular neutrophil traps in periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 44, n. 5, p. 664-72, Oct 2009. ISSN 0022-3484.

VLASSARA, H.; URIBARRI, J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? **Curr Diab Rep**, v. 14, n. 1, p. 453, Jan 2014. ISSN 1534-4827.

WHITING, D. R. et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 94, n. 3, p. 311-21, Dec 2011. ISSN 0168-8227.

WIESE, S. et al. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. **Proteomics**, v. 7, n. 3, p. 340-50, Feb 2007. ISSN 1615-9853 (Print) 1615-9853.

YANG, Y.; HUTCHINSON, P.; MORAND, E. F. Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 42, n. 7, p. 1538-44, Jul 1999. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591.

ZIMMER, M. et al. Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 17, p. 8215-9, Sep 1 1992. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

ZIZZI, A. et al. Gingival advanced glycation end-products in diabetes mellitus-associated chronic periodontitis: an immunohistochemical study. **J Periodontal Res**, v. 48, n. 3, p. 293-301, Jun 2013. ISSN 0022-3484.

Anexo 1. Lista das 361 proteínas identificadas pela Espectrometria de Massas (ORBITRAP).

ID da proteína	Acesso	-10lgP	Cobertura (%)	#Peptídeos	#Único	Média da Massa	Descrição	Razão 114	Razão 115	Razão 116	Razão 117
1	sp P02768 ALBU_HUMAN	437.81	62	142	132	69367	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	1	0,809	0,772	1,199
9	sp P01857 IGHG1_HUMAN	343.64	68	45	10	36106	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	1	0,625	0,964	0,938
2	sp P01023 A2MG_HUMAN	339.87	37	57	52	163290	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3	1	0,816	0,985	1,471
3	sp P01024 CO3_HUMAN	333.88	35	59	57	187147	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	1	0,786	0,849	1,088
58	sp P01834 IGKC_HUMAN	333.44	74	22	21	11609	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1	1	1,517	1,373	1,425
6	sp P60709 ACTB_HUMAN	315.69	60	39	6	41737	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	1	0,429	0,589	0,564
7	sp P63261 ACTG_HUMAN	315.69	60	39	6	41793	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1	1	0,429	0,589	0,564
4	sp P02788 TRFL_HUMAN	311.04	36	29	24	78182	Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF PE=1 SV=6	1	0,942	1,058	1,242
14	sp P01861 IGHG4_HUMAN	310.66	61	34	8	35941	Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1	1	0,827	0,944	1,100
16	sp P01859 IGHG2_HUMAN	306.74	57	35	6	35901	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	1	0,846	1,108	1,391
5	sp P02787 TRFE_HUMAN	296.82	38	34	27	77064	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	1	0,825	0,956	1,147
39	sp P06702 S10A9_HUMAN	273.11	84	18	18	13242	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1	1	2,322	2,220	3,497
27	sp P01860 IGHG3_HUMAN	268.00	42	28	3	41287	Ig gamma-3 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=2	1	1,300	1,055	1,299
15	sp P68032 ACTC_HUMAN	266.62	44	31	2	42019	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1	0	0	0	0
17	sp P63267 ACTH_HUMAN	266.62	40	29	1	41877	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTG2 PE=1 SV=1	0	0	0	0
18	sp P62736 ACTA_HUMAN	266.62	40	29	1	42009	Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1	0	0	0	0
30	sp P68871 HBB_HUMAN	257.68	73	12	12	15998	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2	1	0,653	0,615	1,043

24	sp P01876 IGHA1_HUMAN	253.87	37	21	8	37655	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	1	0,617	0,898	1,082
32	sp Q6S8J3 POTEE_HUMAN	253.52	14	25	0	121363	POTE ankyrin domain family member E OS=Homo sapiens GN=POTEE PE=1 SV=3	0	0	0	0
12	sp P01009 A1AT_HUMAN	245.93	47	18	18	46737	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	1	0,982	0,928	1,508
13	sp P00738 HPT_HUMAN	245.59	34	18	17	45205	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	1	0,971	0,898	1,220
10	sp P06396 GELS_HUMAN	242.59	29	23	20	85697	Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1	1	0,757	0,927	0,977
11	sp P02647 APOA1_HUMAN	236.00	63	21	17	30778	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	1	0,758	0,938	0,983
20	sp P06733 ENOA_HUMAN	233.27	46	20	13	47169	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	1	0,609	0,781	0,788
74	sp P0CG05 LAC2_HUMAN	230.89	71	11	2	11294	Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1	1	0,914	1,054	1,340
59	sp P69905 HBA_HUMAN	230.67	62	11	11	15258	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2	1	0,672	0,599	1,212
33	sp P01877 IGHA2_HUMAN	227.21	30	17	4	36526	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3	0	0	0	0
38	sp A5A3E0 POTEF_HUMAN	221.74	13	22	2	121444	POTE ankyrin domain family member F OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=1 SV=2	0	0	0	0
48	sp B9A064 IGLL5_HUMAN	220.12	39	12	4	23063	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=2 SV=2	1	0,541	0,832	1,120
8	sp P05164 PERM_HUMAN	219.84	32	26	24	83869	Myeloperoxidase OS=Homo sapiens GN=MPO PE=1 SV=1	1	1,040	1,174	1,475
22	sp P02538 K2C6A_HUMAN	219.06	29	22	2	60045	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3	1	1,107	0,875	0,984
23	sp P48668 K2C6C_HUMAN	218.59	27	21	1	60025	Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KRT6C PE=1 SV=3	1	1,204	0,713	0,917
66	sp P07737 PROF1_HUMAN	218.07	50	9	7	15054	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	1	0,639	0,762	0,775
57	sp Q9BYX7 ACTBM_HUMAN	215.46	39	18	3	42016	Putative beta-actin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=POTEKP PE=5 SV=1	0	0	0	0
52	sp P02763 A1AG1_HUMAN	215.12	34	11	8	23512	Alpha-1-acid glycoprotein 1	1	1,035	1,004	1,214

							OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1				
43	sp P0CG38 POTEL_HUMAN	209.25	14	23	2	121282	POTE ankyrin domain family member I OS=Homo sapiens GN=POTEL PE=3 SV=1	0	0	0	0
37	sp P01040 CYTA_HUMAN	208.65	90	9	8	11006	Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=1 SV=1	1	0,801	0,869	0,853
96	sp A0M8Q6 LAC7_HUMAN	208.43	60	9	0	11303	Ig lambda-7 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGLC7 PE=1 SV=2	0	0	0	0
21	sp P29401 TKT_HUMAN	207.95	26	18	17	67878	Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=3	1	0,795	0,907	0,969
36	sp P01871 IGHM_HUMAN	202.21	24	11	3	49307	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3	1	0,841	0,457	0,571
42	sp P80188 NGAL_HUMAN	201.06	39	9	8	22588	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin OS=Homo sapiens GN=LCN2 PE=1 SV=2	1	0,777	0,856	0,773
26	sp P13796 PLSL_HUMAN	197.69	27	18	13	70289	Plastin-2 OS=Homo sapiens GN=LCP1 PE=1 SV=6	1	0,626	0,757	0,887
29	sp P14618 KPYM_HUMAN	190.95	34	23	19	57937	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	1	0,611	0,761	0,853
72	sp P04080 CYTB_HUMAN	190.39	88	10	9	11140	Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2	1	0,758	0,824	0,830
50	sp P62805 H4_HUMAN	190.36	57	12	12	11367	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	1	0,658	0,853	0,922
54	sp Q5QNW6 H2B2F_HUMAN	189.90	59	14	2	13920	Histone H2B type 2-F OS=Homo sapiens GN=HIST2H2BF PE=1 SV=3	1	0,864	1,021	1,018
35	sp P13647 K2C5_HUMAN	182.00	23	18	5	62378	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	1	1,510	1,082	1,229
67	sp P06899 H2B1J_HUMAN	181.57	53	13	1	13904	Histone H2B type 1-J OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BJ PE=1 SV=3	1	0,831	1,025	1,321
68	sp P23527 H2B1O_HUMAN	181.57	53	13	1	13906	Histone H2B type 1-O OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BO PE=1 SV=3	1	0,831	1,025	1,321
69	sp Q16778 H2B2E_HUMAN	181.57	53	13	1	13920	Histone H2B type 2-E OS=Homo sapiens GN=HIST2H2BE PE=1 SV=3	1	0,831	1,025	1,321
70	sp P33778 H2B1B_HUMAN	181.57	53	13	1	13950	Histone H2B type 1-B OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BB PE=1 SV=2	1	0,831	1,025	1,321
40	sp P04406 G3P_HUMAN	174.37	40	17	14	36053	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	1	0,583	0,711	0,639
28	sp P08107 HSP71_HUMAN	171.44	25	17	11	70052	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A	1	0,813	0,889	0,934

							PE=1 SV=5				
100	sp P01623 KV305_HUMAN	167.25	57	9	1	11746	Ig kappa chain V-III region WOL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
101	sp P01622 KV304_HUMAN	167.25	52	8	1	11788	Ig kappa chain V-III region Ti OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
102	sp P18135 KV312_HUMAN	167.25	44	8	1	14073	Ig kappa chain V-III region HAH OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	0	0	0	0
103	sp P18136 KV313_HUMAN	167.25	44	8	1	14089	Ig kappa chain V-III region HIC OS=Homo sapiens PE=1 SV=2	0	0	0	0
31	sp P02675 FIBB_HUMAN	166.08	26	12	10	55928	Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2	1	1,027	0,907	1,209
41	sp P02790 HEMO_HUMAN	164.84	20	10	9	51676	Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2	1	0,707	0,816	1,074
81	sp P24158 PRTN3_HUMAN	162.90	30	7	7	27807	Myeloblastin OS=Homo sapiens GN=PRTN3 PE=1 SV=3	1	0,677	0,833	0,870
77	sp P05109 S10A8_HUMAN	160.55	55	8	6	10835	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1	1	1,830	1,800	2,500
78	sp P09211 GSTP1_HUMAN	157.02	33	7	6	23356	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2	1	0,513	0,652	0,720
231	sp Q8NHM4 TRY6_HUMAN	156.84	16	4	4	26537	Putative trypsin-6 OS=Homo sapiens GN=PRSS3P2 PE=5 SV=2	0	0	0	0
270	sp P07477 TRY1_HUMAN	156.84	8	3	3	26558	Trypsin-1 OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=1 SV=1	0	0	0	0
271	sp P07478 TRY2_HUMAN	156.84	8	3	3	26488	Trypsin-2 OS=Homo sapiens GN=PRSS2 PE=1 SV=1	0	0	0	0
34	sp P30740 ILEU_HUMAN	156.59	24	9	8	42742	Leukocyte elastase inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPINB1 PE=1 SV=1	1	0,909	0,989	1,038
73	sp P52566 GDIR2_HUMAN	154.73	41	9	8	22988	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 OS=Homo sapiens GN=ARHGDIB PE=1 SV=3	1	0,702	0,792	0,800
49	sp P00450 CERU_HUMAN	152.78	10	8	8	122205	Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	1	0,755	0,874	0,948
51	sp P04220 MUCB_HUMAN	151.83	21	9	1	43057	Ig mu heavy chain disease protein OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1	1,253	1,116	1,075
93	sp P19652 A1AG2_HUMAN	146.88	26	6	3	23603	Alpha-1-acid glycoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=ORM2 PE=1 SV=2	1	0,549	0,818	0,750
46	sp P0C0L4 CO4A_HUMAN	145.26	7	13	11	192784	Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=2	1	0,843	0,977	1,107
47	sp P0C0L5 CO4B_HUMAN	145.26	7	13	11	192750	Complement C4-B OS=Homo sapiens	1	0,843	0,977	1,107

							GN=C4B PE=1 SV=2				
91	sp P06744 G6PI_HUMAN	145.15	12	7	7	63147	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=4	1	0,821	0,849	0,925
85	sp P04745 AMY1_HUMAN	144.80	12	5	5	57768	Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2	1	0,637	0,771	0,772
119	sp P00751 CFAB_HUMAN	142.58	6	4	4	85533	Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2	1	0,828	0,890	1,170
83	sp P11142 HSP7C_HUMAN	141.02	18	12	6	70898	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	1	0,770	0,874	0,945
80	sp P14780 MMP9_HUMAN	139.54	13	10	9	78458	Matrix metalloproteinase-9 OS=Homo sapiens GN=MMP9 PE=1 SV=3	1	0,821	1,009	1,047
124	sp P06310 KV206_HUMAN	138.37	20	5	1	14707	Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	1	0,934	1,321	1,138
86	sp P62987 RL40_HUMAN	138.33	41	6	5	14728	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Homo sapiens GN=UBA52 PE=1 SV=2	1	0,769	0,837	0,860
87	sp P62979 RS27A_HUMAN	138.33	33	6	5	17965	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=2	1	0,769	0,837	0,860
88	sp P0CG47 UBB_HUMAN	138.33	26	7	6	25762	Polyubiquitin-B OS=Homo sapiens GN=UBB PE=1 SV=1	1	0,769	0,837	0,860
94	sp P0CG48 UBC_HUMAN	138.33	9	7	6	77039	Polyubiquitin-C OS=Homo sapiens GN=UBC PE=1 SV=3	1	0,769	0,837	0,860
132	sp P01614 KV201_HUMAN	137.25	23	5	1	12676	Ig kappa chain V-II region Cum OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1	0,732	1,119	1,101
133	sp P06309 KV205_HUMAN	137.25	23	5	1	12664	Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	1	0,732	1,119	1,101
56	sp P08779 K1C16_HUMAN	135.58	15	10	0	51268	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4	0	0	0	0
71	sp P02533 K1C14_HUMAN	134.54	14	10	1	51562	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	1	1,006	0,993	0,951
208	sp P01777 HV316_HUMAN	128.12	20	4	1	12802	Ig heavy chain V-III region TEI OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
209	sp P01766 HV305_HUMAN	128.12	20	4	1	13227	Ig heavy chain V-III region BRO OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
145	sp P01610 KV118_HUMAN	124.57	45	4	2	11840	Ig kappa chain V-I region WEA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0

135	sp P31146 COR1A_HUMAN	124.25	15	8	8	51026	Coronin-1A OS=Homo sapiens GN=CORO1A PE=1 SV=4	1	0,676	0,762	0,812
90	sp P04217 A1BG_HUMAN	124.08	16	8	8	54254	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	1	0,852	0,928	1,050
117	sp P04075 ALDOA_HUMAN	123.08	15	6	6	39420	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2	1	0,645	0,868	0,889
115	sp O95678 K2C75_HUMAN	122.57	17	13	3	59560	Keratin, type II cytoskeletal 75 OS=Homo sapiens GN=KRT75 PE=1 SV=2	1	1,450	0,803	0,951
114	sp P13929 ENOB_HUMAN	122.43	15	7	1	46987	Beta-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO3 PE=1 SV=5	0	0	0	0
107	sp P06314 KV404_HUMAN	121.85	31	4	3	14966	Ig kappa chain V-IV region B17 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1	0,844	0,948	1,078
109	sp P02765 FETUA_HUMAN	118.82	17	7	5	39325	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	1	0,684	0,870	0,985
175	sp P01774 HV313_HUMAN	116.28	41	5	2	12953	Ig heavy chain V-III region POM OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
204	sp P01765 HV304_HUMAN	116.28	21	4	1	12356	Ig heavy chain V-III region TIL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
205	sp P01779 HV318_HUMAN	116.28	21	4	1	12431	Ig heavy chain V-III region TUR OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
206	sp P01776 HV315_HUMAN	116.28	21	4	1	13091	Ig heavy chain V-III region WAS OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
207	sp P01764 HV303_HUMAN	116.28	21	4	1	12582	Ig heavy chain V-III region VH26 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
106	sp P60174 TPIS_HUMAN	114.78	19	5	5	30791	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TP11 PE=1 SV=3	1	0,678	0,909	0,814
118	sp P01042 KNG1_HUMAN	113.01	9	6	6	71957	Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2	1	0,938	0,962	1,086
183	sp P01599 KV107_HUMAN	112.81	26	2	1	11814	Ig kappa chain V-I region Gal OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1	1,022	1,089	1,222
131	sp P01621 KV303_HUMAN	110.10	58	8	2	10729	Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1	0,774	0,769	1,042
155	sp P23528 COF1_HUMAN	107.11	21	3	3	18502	Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=3	1	0,672	0,832	1,006
97	sp P37837 TALDO_HUMAN	106.33	17	5	5	37540	Transaldolase OS=Homo sapiens GN=TALDO1 PE=1 SV=2	1	0,858	0,949	1,008
89	sp P08727 K1C19_HUMAN	105.89	20	8	3	44106	Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Homo sapiens GN=KRT19 PE=1	0	0	0	0

							SV=4				
110	sp P08246 ELNE_HUMAN	104.91	21	6	6	28518	Neutrophil elastase OS=Homo sapiens GN=ELANE PE=1 SV=1	1	0,926	0,985	1,269
111	sp P19012 K1C15_HUMAN	101.51	20	11	5	49212	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Homo sapiens GN=KRT15 PE=1 SV=3	1	0,975	0,721	0,896
104	sp P02671 FIBA_HUMAN	100.02	8	9	7	94973	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2	1	0,832	0,848	0,994
141	sp P62937 PPIA_HUMAN	99.06	26	5	3	18012	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2	1	0,621	0,784	0,776
143	sp P52209 6PGD_HUMAN	98.78	13	5	5	53140	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD PE=1 SV=3	1	0,602	0,845	0,787
105	sp Q06830 PRDX1_HUMAN	97.56	25	5	5	22110	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	1	0,703	0,902	0,968
99	sp P02774 VTDB_HUMAN	97.36	12	6	6	52964	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1	1	0,873	0,943	1,088
168	sp P25311 ZA2G_HUMAN	92.84	15	3	3	34259	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2	0	0	0	0
136	sp P61626 LYSC_HUMAN	92.58	18	4	4	16537	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1	1	0,702	0,843	0,849
116	sp P02751 FINC_HUMAN	92.15	3	6	5	262622	Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4	1	0,926	0,955	1,247
127	sp Q01469 FABP5_HUMAN	91.10	28	4	4	15164	Fatty acid-binding protein, epidermal OS=Homo sapiens GN=FABP5 PE=1 SV=3	1	0,706	0,858	0,749
139	sp P04433 KV309_HUMAN	88.55	37	6	3	12575	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1	0,657	0,859	0,895
156	sp P13797 PLST_HUMAN	87.11	4	4	0	70811	Plastin-3 OS=Homo sapiens GN=PLS3 PE=1 SV=4	0	0	0	0
179	sp P10599 THIO_HUMAN	86.03	21	2	2	11737	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3	1	0,598	0,744	0,708
203	sp P01596 KV104_HUMAN	85.22	34	3	3	11704	Ig kappa chain V-I region CAR OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
137	sp P05787 K2C8_HUMAN	81.55	17	11	3	53704	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Homo sapiens GN=KRT8 PE=1 SV=7	0	0	0	0
164	sp Q8WZ42 TITIN_HUMAN	79.16	2	73	64	381592 2	Titin OS=Homo sapiens GN=TTN PE=1 SV=4	1	1,133	1,047	1,898
180	sp P62158 CALM_HUMAN	78.95	11	2	1	16838	Calmodulin OS=Homo sapiens	1	0,891	1,011	0,978

							GN=CALM1 PE=1 SV=2				
202	sp P25815 S100P_HUMAN	78.18	34	3	3	10400	Protein S100-P OS=Homo sapiens GN=S100P PE=1 SV=2	1	0,821	1,075	0,991
174	sp P08582 TRFM_HUMAN	76.59	4	5	3	80215	Melanotransferrin OS=Homo sapiens GN=MFI2 PE=1 SV=2	1	0,988	1,023	1,126
130	sp Q14624 ITIH4_HUMAN	75.57	4	5	5	103357	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4	1	0,731	0,855	1,212
138	sp P27797 CALR_HUMAN	75.36	10	4	4	48142	Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	1	0,815	0,901	0,905
144	sp P04264 K2C1_HUMAN	74.74	9	7	4	66039	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	1	0,606	0,614	0,641
167	sp Q01518 CAP1_HUMAN	73.35	6	3	3	51902	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=CAP1 PE=1 SV=5	1	0,687	0,816	0,737
149	sp P04040 CATA_HUMAN	72.32	7	3	3	59756	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3	1	0,767	1,111	1,035
140	sp P04083 ANXA1_HUMAN	72.23	12	3	3	38714	Annexin A1 OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=1 SV=2	1	0,775	0,492	0,531
147	sp P26038 MOES_HUMAN	66.53	6	4	3	67820	Moesin OS=Homo sapiens GN=MSN PE=1 SV=3	1	0,667	0,839	0,804
158	sp Q2M2I5 K1C24_HUMAN	66.37	6	4	0	55087	Keratin, type I cytoskeletal 24 OS=Homo sapiens GN=KRT24 PE=1 SV=1	0	0	0	0
201	sp Q9H299 SH3L3_HUMAN	65.11	24	2	2	10438	SH3 domain-binding glutamic acid- rich-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=SH3BGRL3 PE=1 SV=1	0	0	0	0
213	sp P80511 S10AC_HUMAN	62.72	14	3	2	10575	Protein S100-A12 OS=Homo sapiens GN=S100A12 PE=1 SV=2	1	0,853	1,068	1,081
171	sp P27482 CALL3_HUMAN	62.36	19	3	2	16891	Calmodulin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=CALML3 PE=1 SV=2	1	0,671	0,900	0,772
243	sp P49913 CAMP_HUMAN	60.97	12	2	2	19301	Cathelicidin antimicrobial peptide OS=Homo sapiens GN=CAMP PE=1 SV=1	1	0,499	0,889	0,536
278	sp P09960 LKHA4_HUMAN	60.77	3	1	1	69285	Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens GN=LTA4H PE=1 SV=2	0	0	0	0
186	sp P20160 CAP7_HUMAN	57.66	8	2	2	26886	Azurocidin OS=Homo sapiens GN=AZU1 PE=1 SV=3	1	0,888	1,206	1,297
150	sp Q16695 H31T_HUMAN	56.46	21	4	4	15508	Histone H3.1t OS=Homo sapiens GN=HIST3H3 PE=1 SV=3	1	0,661	1,231	1,236
151	sp P68431 H31_HUMAN	56.46	21	4	4	15404	Histone H3.1 OS=Homo sapiens	1	0,661	1,231	1,236

							GN=HIST1H3A PE=1 SV=2				
152	sp Q71DI3 H32_HUMAN	56.46	21	4	4	15388	Histone H3.2 OS=Homo sapiens GN=HIST2H3A PE=1 SV=3	1	0,661	1,231	1,236
224	sp P05783 K1C18_HUMAN	56.26	3	2	0	48058	Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens GN=KRT18 PE=1 SV=2	0	0	0	0
188	sp P01019 ANGT_HUMAN	54.71	6	2	2	53154	Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1	1	1	0,000	0,000
323	sp P78527 PRKDC_HUMAN	54.06	2	9	3	469093	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PRKDC PE=1 SV=3	1	1,087	1,171	1,222
279	sp P19971 TYPH_HUMAN	53.11	3	1	1	49956	Thymidine phosphorylase OS=Homo sapiens GN=TYMP PE=1 SV=2	1	1	0,000	0,000
197	sp P04792 HSPB1_HUMAN	52.40	9	2	2	22783	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2	1	0,692	1,024	0,785
166	sp Q01546 K22O_HUMAN	52.11	12	8	3	65841	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral OS=Homo sapiens GN=KRT76 PE=1 SV=2	1	1,146	0,973	1,227
216	sp P01603 KV111_HUMAN	51.90	17	2	1	11900	Ig kappa chain V-I region Ka OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0	0	0	0
365	sp P46939 UTRO_HUMAN	51.57	3	10	4	394467	Utrophin OS=Homo sapiens GN=UTRN PE=1 SV=2	0	0	0	0
165	sp Q9UBC9 SPRR3_HUMAN	51.39	20	4	4	18154	Small proline-rich protein 3 OS=Homo sapiens GN=SPRR3 PE=1 SV=2	1	0,951	1,098	0,939
5578	sp Q9UKN7 MYO15_HUMAN	50.16	1	4	1	395294	Unconventional myosin-XV OS=Homo sapiens GN=MYO15A PE=1 SV=2	0	0	0	0
178	sp P08697 A2AP_HUMAN	48.07	6	4	3	54566	Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3	1	0,886	1,132	1,149
230	sp Q02224 CENPE_HUMAN	48.02	2	7	2	316414	Centromere-associated protein E OS=Homo sapiens GN=CENPE PE=1 SV=2	0	0	0	0
169	sp P08311 CATG_HUMAN	47.57	11	3	2	28837	Cathepsin G OS=Homo sapiens GN=CTSG PE=1 SV=2	1	0,908	1,180	1,139
172	sp Q3SY84 K2C71_HUMAN	46.98	6	5	2	57292	Keratin, type II cytoskeletal 71 OS=Homo sapiens GN=KRT71 PE=1 SV=3	0	0	0	0
568	sp A3KMH1 VWA8_HUMAN	45.58	1	4	0	214823	von Willebrand factor A domain- containing protein 8 OS=Homo sapiens GN=VWA8 PE=1 SV=2	0	0	0	0
340	sp A6NNM8 TTL13_HUMAN	45.05	2	3	1	93645	Tubulin polyglutamylase TTL13 OS=Homo sapiens GN=TTL13 PE=2 SV=2	0	0	0	0

506	sp P49792 RBP2_HUMAN	44.82	1	6	1	358201	E3 SUMO-protein ligase RanBP2 OS=Homo sapiens GN=RANBP2 PE=1 SV=2	0	0	0	0
6115	sp O75037 KIF21B_HUMAN	44.63	1	3	0	182661	Kinesin-like protein KIF21B OS=Homo sapiens GN=KIF21B PE=1 SV=2	0	0	0	0
7133	sp Q9NRC6 SPTN5_HUMAN	43.82	0	3	0	416753	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 5 OS=Homo sapiens GN=SPTBN5 PE=1 SV=2	0	0	0	0
930	sp Q5TZA2 CROCC_HUMAN	43.45	2	6	3	228521	Rootletin OS=Homo sapiens GN=CROCC PE=1 SV=1	0	0	0	0
504	sp Q03001 DYST_HUMAN	43.11	1	11	6	860679	Dystonin OS=Homo sapiens GN=DST PE=1 SV=4	0	0	0	0
285	sp Q13049 TRI32_HUMAN	42.96	2	2	0	71989	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM32 OS=Homo sapiens GN=TRIM32 PE=1 SV=2	0	0	0	0
3302	sp O75445 USH2A_HUMAN	42.89	0	5	1	575607	Usherin OS=Homo sapiens GN=USH2A PE=1 SV=3	0	0	0	0
534	sp Q7LBC6 KDM3B_HUMAN	40.27	2	4	2	191580	Lysine-specific demethylase 3B OS=Homo sapiens GN=KDM3B PE=1 SV=2	1	1,140	0,898	1,080
1018	sp Q9C099 LRCC1_HUMAN	40.08	1	3	0	119596	Leucine-rich repeat and coiled-coil domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=LRCC1 PE=1 SV=2	0	0	0	0
5031	sp Q7Z460 CLAP1_HUMAN	39.54	1	3	0	169450	CLIP-associating protein 1 OS=Homo sapiens GN=CLASP1 PE=1 SV=1	0	0	0	0
3539	sp Q9C093 SPEF2_HUMAN	39.36	1	3	1	209809	Sperm flagellar protein 2 OS=Homo sapiens GN=SPEF2 PE=1 SV=2	0	0	0	0
238	sp Q9UIF8 BAZ2B_HUMAN	39.20	1	4	2	240457	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B OS=Homo sapiens GN=BAZ2B PE=1 SV=3	1	0,997	0,889	0,975
6446	sp Q05BV3 EMAL5_HUMAN	39.05	1	3	1	219425	Echinoderm microtubule-associated protein-like 5 OS=Homo sapiens GN=EML5 PE=2 SV=3	0	0	0	0
812	sp O60763 USO1_HUMAN	38.57	2	3	0	107895	General vesicular transport factor p115 OS=Homo sapiens GN=USO1 PE=1 SV=2	0	0	0	0
2639	sp Q5TB80 CEP162_HUMAN	38.57	1	4	0	161942	Centrosomal protein of 162 kDa OS=Homo sapiens GN=CEP162 PE=1 SV=2	0	0	0	0
6248	sp P02549 SPTA1_HUMAN	38.46	1	3	1	280013	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1 OS=Homo sapiens GN=SPTA1 PE=1	0	0	0	0

							SV=5				
376	sp Q14566 MCM6_HUMAN	38.09	3	3	1	92889	DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens GN=MCM6 PE=1 SV=1	0	0	0	0
1759	sp Q8NDA8 MROH1_HUMAN	38.05	1	3	0	181248	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 1 OS=Homo sapiens GN=MROH1 PE=2 SV=3	0	0	0	0
192	sp Q86U86 PB1_HUMAN	37.85	3	5	4	192946	Protein polybromo-1 OS=Homo sapiens GN=PBRM1 PE=1 SV=1	0	0	0	0
235	sp P52907 CAZA1_HUMAN	37.79	13	2	2	32923	F-actin-capping protein subunit alpha- 1 OS=Homo sapiens GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	0	0	0	0
400	sp P35580 MYH10_HUMAN	37.77	2	5	2	228997	Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3	0	0	0	0
912	sp O14686 KMT2D_HUMAN	37.69	1	6	2	593399	Histone-lysine N-methyltransferase 2D OS=Homo sapiens GN=KMT2D PE=1 SV=2	1	1,239	0,825	1,134
680	sp P12882 MYH1_HUMAN	37.46	2	4	0	223143	Myosin-1 OS=Homo sapiens GN=MYH1 PE=1 SV=3	0	0	0	0
1240	sp P15924 DESP_HUMAN	37.31	1	4	1	331774	Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3	1	0,501	0,517	0,871
879	sp Q9Y473 ZN175_HUMAN	37.12	1	2	0	81610	Zinc finger protein 175 OS=Homo sapiens GN=ZNF175 PE=1 SV=1	0	0	0	0
430	sp Q86X52 CHSS1_HUMAN	36.99	3	4	1	91784	Chondroitin sulfate synthase 1 OS=Homo sapiens GN=CHSY1 PE=1 SV=3	0	0	0	0
852	sp Q9UPN4 CP131_HUMAN	36.80	1	2	1	122149	Centrosomal protein of 131 kDa OS=Homo sapiens GN=CEP131 PE=1 SV=3	0	0	0	0
5758	sp Q9BY66 KDM5D_HUMAN	36.66	1	2	0	174072	Lysine-specific demethylase 5D OS=Homo sapiens GN=KDM5D PE=1 SV=2	0	0	0	0
5975	sp P41229 KDM5C_HUMAN	36.66	1	2	0	175719	Lysine-specific demethylase 5C OS=Homo sapiens GN=KDM5C PE=1 SV=2	0	0	0	0
570	sp Q8N139 ABCA6_HUMAN	36.55	3	4	2	184285	ATP-binding cassette sub-family A member 6 OS=Homo sapiens GN=ABCA6 PE=1 SV=2	0	0	0	0
301	sp O15144 ARPC2_HUMAN	36.48	4	1	1	34333	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=ARPC2 PE=1 SV=1	0	0	0	0
239	sp P35579 MYH9_HUMAN	35.90	2	4	2	226530	Myosin-9 OS=Homo sapiens	1	0,871	0,922	0,896

							GN=MYH9 PE=1 SV=4				
257	sp Q9P0W2 HM20B_HUMAN	35.89	7	2	2	35813	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1-related OS=Homo sapiens GN=HMG20B PE=1 SV=1	1	1,229	1,231	1,209
915	sp Q6V1P9 PCD23_HUMAN	35.70	2	5	2	322234	Protocadherin-23 OS=Homo sapiens GN=DCHS2 PE=2 SV=1	0	0	0	0
2101	sp O60333 KIF1B_HUMAN	35.67	1	2	1	204475	Kinesin-like protein KIF1B OS=Homo sapiens GN=KIF1B PE=1 SV=5	0	0	0	0
490	sp Q09MP3 R51A2_HUMAN	35.65	2	4	2	133907	RAD51-associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=RAD51AP2 PE=1 SV=1	0	0	0	0
1215	sp Q8N283 ANR35_HUMAN	35.62	2	2	1	109966	Ankyrin repeat domain-containing protein 35 OS=Homo sapiens GN=ANKRD35 PE=2 SV=2	0	0	0	0
227	sp P23083 HV103_HUMAN	35.57	18	2	2	13009	Ig heavy chain V-I region V35 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1	1,067	1,131	1,135
306	sp P01743 HV102_HUMAN	35.57	8	1	1	12946	Ig heavy chain V-I region HG3 OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	1	1,067	1,131	1,135
307	sp P01742 HV101_HUMAN	35.57	8	1	1	12472	Ig heavy chain V-I region EU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1	1,067	1,131	1,135
308	sp A6NJS3 IV1U1_HUMAN	35.57	8	1	1	13370	Putative V-set and immunoglobulin domain-containing-like protein IGHV1OR21-1 OS=Homo sapiens GN=IGHV1OR21-1 PE=5 SV=1	1	1,067	1,131	1,135
309	sp P01761 HV106_HUMAN	35.57	7	1	1	13732	Ig heavy chain V-I region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1	1,067	1,131	1,135
310	sp P06326 HV107_HUMAN	35.57	7	1	1	13579	Ig heavy chain V-I region Mot OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1	1,067	1,131	1,135
4861	sp Q709C8 VP13C_HUMAN	35.33	1	4	1	422393	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C OS=Homo sapiens GN=VPS13C PE=1 SV=1	0	0	0	0
346	sp Q01484 ANK2_HUMAN	35.13	2	7	6	433719	Ankyrin-2 OS=Homo sapiens GN=ANK2 PE=1 SV=4	0	0	0	0
298	sp Q5CZC0 FSIP2_HUMAN	35.00	2	13	9	780624	Fibrous sheath-interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=FSIP2 PE=2 SV=4	1	0,602	0,840	0,491
314	sp P04004 VTNC_HUMAN	34.99	3	1	1	54306	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1	1	0,531	0,649	0,865
222	sp Q8WXI7 MUC16_HUMAN	33.99	1	13	8	235813 3	Mucin-16 OS=Homo sapiens GN=MUC16 PE=1 SV=2	1	0,505	0,629	0,796

245	sp Q01955 CO4A3_HUMAN	33.90	4	6	5	161812	Collagen alpha-3(IV) chain OS=Homo sapiens GN=COL4A3 PE=1 SV=3	1	0,617	0,980	0,852
5358	sp Q86UW6 N4BP2_HUMAN	33.78	2	3	1	198800	NEDD4-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=N4BP2 PE=1 SV=2	0	0	0	0
292	sp P05067 A4_HUMAN	33.72	2	3	1	86943	Amyloid beta A4 protein OS=Homo sapiens GN=APP PE=1 SV=3	0	0	0	0
293	sp Q5IS80 A4_PANTR	33.72	2	3	1	86971	Amyloid beta A4 protein OS=Pan troglodytes GN=APP PE=2 SV=1	0	0	0	0
1482	sp Q9Y4D7 PLXD1_HUMAN	33.45	1	3	1	212005	Plexin-D1 OS=Homo sapiens GN=PLXND1 PE=1 SV=3	0	0	0	0
771	sp P0C221 CC175_HUMAN	33.44	4	3	1	93626	Coiled-coil domain-containing protein 175 OS=Homo sapiens GN=CCDC175 PE=2 SV=2	0	0	0	0
236	sp P53621 COPA_HUMAN	33.41	3	4	4	138345	Coatomer subunit alpha OS=Homo sapiens GN=COPA PE=1 SV=2	1	1,077	1,136	1,012
707	sp O43264 ZW10_HUMAN	33.41	2	2	1	88830	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog OS=Homo sapiens GN=ZW10 PE=1 SV=3	1	0,610	0,868	0,943
242	sp Q8TCU4 ALMS1_HUMAN	33.37	2	5	5	460969	Alstrom syndrome protein 1 OS=Homo sapiens GN=ALMS1 PE=1 SV=3	0	0	0	0
436	sp Q9H788 SH2A4_HUMAN	33.31	3	2	0	52727	SH2 domain-containing protein 4A OS=Homo sapiens GN=SH2D4A PE=1 SV=1	0	0	0	0
327	sp P02749 APOH_HUMAN	33.14	3	1	1	38298	Beta-2-glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=APOH PE=1 SV=3	1	0,801	0,957	1,025
249	sp Q02539 H11_HUMAN	33.12	8	2	2	21842	Histone H1.1 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1A PE=1 SV=3	1	0,691	0,925	0,758
264	sp P16403 H12_HUMAN	33.12	7	2	1	21365	Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2	1	0,691	0,925	0,758
324	sp P22492 H1T_HUMAN	33.12	4	1	1	22019	Histone H1t OS=Homo sapiens GN=HIST1H1T PE=2 SV=4	1	0,691	0,925	0,758
325	sp P10412 H14_HUMAN	33.12	4	1	1	21865	Histone H1.4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1E PE=1 SV=2	1	0,691	0,925	0,758
326	sp P16402 H13_HUMAN	33.12	4	1	1	22350	Histone H1.3 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1D PE=1 SV=2	1	0,691	0,925	0,758
4203	sp Q7Z478 DHX29_HUMAN	33.07	1	3	0	155235	ATP-dependent RNA helicase DHX29 OS=Homo sapiens GN=DHX29 PE=1 SV=2	0	0	0	0
3946	sp Q8IUG5 MY18B_HUMAN	32.95	3	6	2	285183	Unconventional myosin-XVIIIb OS=Homo sapiens GN=MYO18B PE=1 SV=1	0	0	0	0

1484	sp P36956 SRBP1_HUMAN	32.89	4	4	2	121675	Sterol regulatory element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=SREBF1 PE=1 SV=2	0	0	0	0
498	sp Q9HAV4 XPO5_HUMAN	32.59	3	3	2	136311	Exportin-5 OS=Homo sapiens GN=XPO5 PE=1 SV=1	0	0	0	0
260	sp Q01668 CAC1D_HUMAN	32.54	3	6	4	245139	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1D OS=Homo sapiens GN=CACNA1D PE=1 SV=2	1	0,846	0,788	1,031
758	sp Q5THR3 EFCB6_HUMAN	32.38	5	5	3	172929	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 6 OS=Homo sapiens GN=EFCAB6 PE=1 SV=1	0	0	0	0
1236	sp P50748 KNTC1_HUMAN	32.38	1	3	0	250746	Kinetochore-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=KNTC1 PE=1 SV=1	0	0	0	0
474	sp P08729 K2C7_HUMAN	32.10	4	3	0	51386	Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Homo sapiens GN=KRT7 PE=1 SV=5	0	0	0	0
416	sp Q9NXL9 MCM9_HUMAN	31.79	3	3	2	127313	DNA helicase MCM9 OS=Homo sapiens GN=MCM9 PE=1 SV=4	0	0	0	0
622	sp O15371 EIF3D_HUMAN	31.73	2	2	0	63973	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Homo sapiens GN=EIF3D PE=1 SV=1	0	0	0	0
633	sp P51800 CLCKA_HUMAN	31.31	5	3	2	75285	Chloride channel protein CIC-Ka OS=Homo sapiens GN=CLCNKA PE=1 SV=1	0	0	0	0
596	sp Q9BY49 PECR_HUMAN	31.24	5	2	1	32544	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Homo sapiens GN=PECR PE=1 SV=2	1	0,610	0,764	0,877
2647	sp Q8NEZ4 KMT2C_HUMAN	31.13	0	4	1	541376	Histone-lysine N-methyltransferase 2C OS=Homo sapiens GN=KMT2C PE=1 SV=3	0	0	0	0
1313	sp Q13233 M3K1_HUMAN	30.95	2	2	1	164469	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 OS=Homo sapiens GN=MAP3K1 PE=1 SV=4	0	0	0	0
2288	sp O15439 MRP4_HUMAN	30.81	1	3	1	149526	Multidrug resistance-associated protein 4 OS=Homo sapiens GN=ABCC4 PE=1 SV=3	0	0	0	0
191	sp Q7Z591 AKNA_HUMAN	30.75	2	4	4	155139	AT-hook-containing transcription factor OS=Homo sapiens GN=AKNA PE=1 SV=2	1	1,033	1,295	1,031
1337	sp Q92932 PTPR2_HUMAN	30.70	1	2	0	111271	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2 OS=Homo sapiens GN=PTPRN2 PE=1 SV=2	0	0	0	0

4294	sp Q9UIW2 PLXA1_HUMAN	30.68	1	3	1	211066	Plexin-A1 OS=Homo sapiens GN=PLXNA1 PE=1 SV=3	0	0	0	0
321	sp O14654 IRS4_HUMAN	30.62	3	3	3	133767	Insulin receptor substrate 4 OS=Homo sapiens GN=IRS4 PE=1 SV=1	1	0,984	0,923	0,956
3449	sp Q93100 KPBB_HUMAN	30.59	1	2	0	124884	Phosphorylase b kinase regulatory subunit beta OS=Homo sapiens GN=PHKB PE=1 SV=3	0	0	0	0
391	sp Q6YBV0 S36A4_HUMAN	30.58	6	3	2	56157	Proton-coupled amino acid transporter 4 OS=Homo sapiens GN=SLC36A4 PE=1 SV=1	0	0	0	0
779	sp Q6ZWB6 KCTD8_HUMAN	30.17	3	2	1	52440	BTB/POZ domain-containing protein KCTD8 OS=Homo sapiens GN=KCTD8 PE=2 SV=1	0	0	0	0
1392	sp Q3V6T2 GRDN_HUMAN	30.16	3	6	2	216040	Girdin OS=Homo sapiens GN=CCDC88A PE=1 SV=2	0	0	0	0
332	sp P12814 ACTN1_HUMAN	30.10	4	3	3	103058	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 PE=1 SV=2	1	0,665	0,723	0,921
816	sp P51654 GPC3_HUMAN	30.07	4	2	1	65563	Glypican-3 OS=Homo sapiens GN=GPC3 PE=1 SV=1	0	0	0	0
670	sp O75145 LIPA3_HUMAN	30.00	2	3	1	133496	Liprin-alpha-3 OS=Homo sapiens GN=PPFIA3 PE=1 SV=3	0	0	0	0
1600	sp Q2LD37 K1109_HUMAN	29.86	0	3	2	555490	Uncharacterized protein KIAA1109 OS=Homo sapiens GN=KIAA1109 PE=1 SV=2	0	0	0	0
374	sp A6NC98 CC88B_HUMAN	29.81	1	1	1	164808	Coiled-coil domain-containing protein 88B OS=Homo sapiens GN=CCDC88B PE=1 SV=1	1	0,794	1,049	1,163
291	sp Q09666 AHNK_HUMAN	29.42	1	7	5	629114	Neuroblast differentiation-associated protein AHNK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2	0	0	0	0
1730	sp Q58EX7 PKHG4_HUMAN	29.31	3	4	1	130803	Puratrophin-1 OS=Homo sapiens GN=PLEKHG4 PE=1 SV=1	0	0	0	0
412	sp Q8WWI1 LMO7_HUMAN	29.25	2	4	3	192694	LIM domain only protein 7 OS=Homo sapiens GN=LMO7 PE=1 SV=3	1	0,994	1,151	1,066
397	sp Q86V81 THOC4_HUMAN	29.22	9	3	1	26888	THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=ALYREF PE=1 SV=3	1	0,643	0,730	0,929
401	sp Q9UPA5 BSN_HUMAN	29.12	1	5	4	416475	Protein bassoon OS=Homo sapiens GN=BSN PE=2 SV=4	1	0,935	1,031	1,361
1021	sp Q5M9N0 CD158_HUMAN	29.11	1	2	1	127140	Coiled-coil domain-containing protein 158 OS=Homo sapiens GN=CCDC158 PE=1 SV=2	0	0	0	0
379	sp Q5T7N2 LITD1_HUMAN	28.99	1	1	1	98849	LINE-1 type transposase domain-	1	1,219	1,301	1,101

							containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=L1TD1 PE=1 SV=1				
661	sp Q8IY85 EFC13_HUMAN	28.96	3	2	2	110129	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 13 OS=Homo sapiens GN=EFCAB13 PE=1 SV=2	0	0	0	0
783	sp Q69YJ1 PKHMP_HUMAN	28.88	3	2	1	58973	Putative pleckstrin homology domain-containing family M member 1P OS=Homo sapiens GN=PLEKHM1P PE=5 SV=1	0	0	0	0
961	sp Q9Y4G2 PKHM1_HUMAN	28.88	1	2	1	117443	Pleckstrin homology domain-containing family M member 1 OS=Homo sapiens GN=PLEKHM1 PE=1 SV=3	0	0	0	0
1191	sp Q5IS58 TGIF1_PANTR	28.85	2	2	0	43082	Homeobox protein TGIF1 OS=Pan troglodytes GN=TGIF1 PE=2 SV=1	0	0	0	0
1192	sp Q15583 TGIF1_HUMAN	28.85	2	2	0	43013	Homeobox protein TGIF1 OS=Homo sapiens GN=TGIF1 PE=1 SV=3	0	0	0	0
921	sp Q92797 SYMPK_HUMAN	28.85	4	4	2	141148	Symplekin OS=Homo sapiens GN=SYMPK PE=1 SV=2	0	0	0	0
378	sp Q5KSL6 DGKK_HUMAN	28.80	1	1	1	141829	Diacylglycerol kinase kappa OS=Homo sapiens GN=DGKK PE=1 SV=1	1	0,833	0,906	0,935
234	sp Q8IWI9 MGAP_HUMAN	28.77	7	18	14	331836	MAX gene-associated protein OS=Homo sapiens GN=MGA PE=1 SV=3	0	0	0	0
4301	sp P35749 MYH11_HUMAN	28.76	1	4	0	227337	Myosin-11 OS=Homo sapiens GN=MYH11 PE=1 SV=3	0	0	0	0
358	sp Q5T4J0 GCNT6_HUMAN	28.51	4	2	1	44527	Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 6 OS=Homo sapiens GN=GCNT6 PE=3 SV=2	1	0,834	0,776	1,222
532	sp Q9Y6V0 PCLO_HUMAN	28.49	1	6	3	553285	Protein piccolo OS=Homo sapiens GN=PCLO PE=1 SV=4	1	1,238	0,766	1,370
1301	sp Q7Z417 NUFP2_HUMAN	28.48	4	2	1	76121	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=NUFIP2 PE=1 SV=1	0	0	0	0
2928	sp Q07890 SOS2_HUMAN	28.42	2	5	0	152978	Son of sevenless homolog 2 OS=Homo sapiens GN=SOS2 PE=1 SV=2	0	0	0	0
641	sp O75161 NPHP4_HUMAN	28.15	2	4	1	157598	Nephrocystin-4 OS=Homo sapiens GN=NPHP4 PE=1 SV=2	0	0	0	0

1359	sp Q9NX02 NALP2_HUMAN	28.13	1	2	1	120515	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=NLRP2 PE=1 SV=1	0	0	0	0
5043	sp O15417 TNC18_HUMAN	28.10	1	5	2	314520	Trinucleotide repeat-containing gene 18 protein OS=Homo sapiens GN=TNRC18 PE=1 SV=3	0	0	0	0
585	sp Q5VT06 CE350_HUMAN	27.96	2	8	5	350931	Centrosome-associated protein 350 OS=Homo sapiens GN=CEP350 PE=1 SV=1	0	0	0	0
2149	sp Q8N103 TAGAP_HUMAN	27.95	1	2	0	80703	T-cell activation Rho GTPase-activating protein OS=Homo sapiens GN=TAGAP PE=2 SV=1	0	0	0	0
7143	sp Q9UFH2 DYH17_HUMAN	27.95	0	3	0	511792	Dynein heavy chain 17, axonemal OS=Homo sapiens GN=DNAH17 PE=1 SV=2	0	0	0	0
722	sp O14983 AT2A1_HUMAN	27.93	4	6	4	110252	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 OS=Homo sapiens GN=ATP2A1 PE=1 SV=1	0	0	0	0
982	sp Q93084 AT2A3_HUMAN	27.93	7	6	4	113977	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 OS=Homo sapiens GN=ATP2A3 PE=1 SV=2	0	0	0	0
1120	sp P16615 AT2A2_HUMAN	27.93	2	4	2	114757	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Homo sapiens GN=ATP2A2 PE=1 SV=1	0	0	0	0
723	sp Q12955 ANK3_HUMAN	27.85	2	8	6	480416	Ankyrin-3 OS=Homo sapiens GN=ANK3 PE=1 SV=3	0	0	0	0
1789	sp P24043 LAMA2_HUMAN	27.82	2	5	3	343906	Laminin subunit alpha-2 OS=Homo sapiens GN=LAMA2 PE=1 SV=4	0	0	0	0
1039	sp Q96PB7 NOE3_HUMAN	27.82	8	3	3	54930	Noelin-3 OS=Homo sapiens GN=OLFM3 PE=2 SV=1	0	0	0	0
1212	sp Q92626 PXDN_HUMAN	27.73	1	2	1	165274	Peroxidasin homolog OS=Homo sapiens GN=PXDN PE=1 SV=2	0	0	0	0
2853	sp O60281 ZN292_HUMAN	27.69	0	2	0	304815	Zinc finger protein 292 OS=Homo sapiens GN=ZNF292 PE=1 SV=3	0	0	0	0
1506	sp Q9C0B7 TNG6_HUMAN	27.69	1	2	0	120747	Transport and Golgi organization protein 6 homolog OS=Homo sapiens GN=TANGO6 PE=1 SV=2	0	0	0	0
483	sp Q9ULE4 F184B_HUMAN	27.64	4	3	2	121044	Protein FAM184B OS=Homo sapiens GN=FAM184B PE=2 SV=3	0	0	0	0
679	sp Q8IWY9 CDAN1_HUMAN	27.45	2	2	2	134119	Codanin-1 OS=Homo sapiens GN=CDAN1 PE=1 SV=4	0	0	0	0
1107	sp Q9Y2V7 COG6_HUMAN	27.40	2	2	1	73279	Conserved oligomeric Golgi complex	0	0	0	0

							subunit 6 OS=Homo sapiens GN=COG6 PE=1 SV=2				
530	sp Q8N944 AMER3_HUMAN	27.32	4	3	3	90445	APC membrane recruitment protein 3 OS=Homo sapiens GN=AMER3 PE=1 SV=2	0	0	0	0
477	sp P54108 CRIS3_HUMAN	27.26	3	1	1	27630	Cysteine-rich secretory protein 3 OS=Homo sapiens GN=CRISP3 PE=1 SV=1	1	0,969	1,057	1,144
966	sp Q16787 LAMA3_HUMAN	27.20	1	5	2	366650	Laminin subunit alpha-3 OS=Homo sapiens GN=LAMA3 PE=1 SV=2	0	0	0	0
627	sp A4UGR9 XIRP2_HUMAN	27.06	3	8	6	382302	Xin actin-binding repeat-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=XIRP2 PE=1 SV=2	0	0	0	0
7147	sp Q96T58 MINT_HUMAN	27.00	0	2	0	402251	Msx2-interacting protein OS=Homo sapiens GN=SPEN PE=1 SV=1	0	0	0	0
317	sp Q9Y623 MYH4_HUMAN	26.82	3	5	2	223069	Myosin-4 OS=Homo sapiens GN=MYH4 PE=1 SV=2	0	0	0	0
453	sp Q6JQN1 ACD10_HUMAN	26.81	2	2	1	118834	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10 OS=Homo sapiens GN=ACAD10 PE=2 SV=1	1	1,271	0,922	1,195
328	sp Q5VST9 OBSCN_HUMAN	26.76	2	12	9	868496	Obscurin OS=Homo sapiens GN=OBSCN PE=1 SV=3	0	0	0	0
254	sp P51160 PDE6C_HUMAN	26.74	5	4	4	99147	Cone cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha' OS=Homo sapiens GN=PDE6C PE=1 SV=2	0	0	0	0
703	sp Q9C0A0 CNTP4_HUMAN	26.29	2	2	2	145274	Contactin-associated protein-like 4 OS=Homo sapiens GN=CNTP4 PE=1 SV=3	0	0	0	0
563	sp P78509 RELN_HUMAN	26.29	2	4	3	388389	Reelin OS=Homo sapiens GN=RELN PE=1 SV=3	0	0	0	0
388	sp Q9HC10 OTOF_HUMAN	26.17	1	2	2	226751	Otoferlin OS=Homo sapiens GN=OTOF PE=1 SV=3	0	0	0	0
505	sp P27708 PYR1_HUMAN	26.17	3	4	3	242981	CAD protein OS=Homo sapiens GN=CAD PE=1 SV=3	0	0	0	0
540	sp Q309B1 TR16L_HUMAN	26.10	4	1	1	40306	Tripartite motif-containing protein 16- like protein OS=Homo sapiens GN=TRIM16L PE=2 SV=3	1	0,000	0,000	0,000
541	sp O95361 TRI16_HUMAN	26.10	2	1	1	63955	Tripartite motif-containing protein 16 OS=Homo sapiens GN=TRIM16 PE=1 SV=3	1	0,000	0,000	0,000
544	sp O60812 HNRC1_HUMAN	26.07	3	2	1	32142	Heterogeneous nuclear	1	1,061	0,939	1,267

	N						ribonucleoprotein C-like 1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPCL1 PE=1 SV=1				
545	sp B2RXH8 HNRC2_HUMAN	26.07	3	2	1	32072	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 2 OS=Homo sapiens GN=HNRNPCL2 PE=2 SV=1	1	1,061	0,939	1,267
1077	sp Q8IZL8 PELP1_HUMAN	25.90	4	3	2	119700	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 OS=Homo sapiens GN=PELP1 PE=1 SV=2	0	0	0	0
806	sp P04114 APOB_HUMAN	25.74	2	9	5	515611	Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2	0	0	0	0
547	sp Q86UQ4 ABCAD_HUMAN	25.74	1	5	4	576166	ATP-binding cassette sub-family A member 13 OS=Homo sapiens GN=ABCA13 PE=2 SV=3	0	0	0	0
553	sp Q6UWP2 DHR11_HUMAN	25.58	5	1	1	28308	Dehydrogenase/reductase SDR family member 11 OS=Homo sapiens GN=DHRS11 PE=1 SV=1	1	0,640	0,802	0,901
554	sp P08670 VIME_HUMAN	25.55	2	1	1	53652	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4	1	1,165	1,102	0,930
838	sp O95760 IL33_HUMAN	25.31	5	2	1	30759	Interleukin-33 OS=Homo sapiens GN=IL33 PE=1 SV=1	0	0	0	0
567	sp Q9ULK4 MED23_HUMAN	25.29	1	1	1	156473	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23 OS=Homo sapiens GN=MED23 PE=1 SV=2	0	0	0	0
196	sp Q8IVL1 NAV2_HUMAN	25.18	5	11	8	268165	Neuron navigator 2 OS=Homo sapiens GN=NAV2 PE=1 SV=3	1	0,731	0,746	1,089
5172	sp Q2M2H8 MGAL_HUMAN	25.04	2	4	1	277989	Probable maltase-glucoamylase-like protein LOC93432 OS=Homo sapiens PE=2 SV=3	0	0	0	0
383	sp Q14204 DYHC1_HUMAN	24.76	1	7	5	641901	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5	0	0	0	0
516	sp Q8TF72 SHRM3_HUMAN	24.54	1	3	2	216856	Protein Shroom3 OS=Homo sapiens GN=SHROOM3 PE=1 SV=2	1	0,099	1,053	0,926
681	sp Q6ZN44 UNC5A_HUMAN	24.54	2	1	1	92931	Netrin receptor UNC5A OS=Homo sapiens GN=UNC5A PE=1 SV=3	0	0	0	0
709	sp P27816 MAP4_HUMAN	24.21	1	1	1	121005	Microtubule-associated protein 4 OS=Homo sapiens GN=MAP4 PE=1 SV=3	1	0,613	0,835	0,811
423	sp Q9UDT6 CLIP2_HUMAN	24.05	2	3	1	115837	CAP-Gly domain-containing linker protein 2 OS=Homo sapiens GN=CLIP2 PE=1 SV=1	1	0,840	1,019	1,138
828	sp Q8NG06 TRI58_HUMAN	24.05	1	1	1	54766	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM58	1	0,840	1,019	1,138

							OS=Homo sapiens GN=TRIM58 PE=2 SV=2				
731	sp P01814 HV201_HUMAN	23.95	6	1	1	14276	Ig heavy chain V-II region OU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1	0,980	1,110	1,263
590	sp Q9UMN6 KMT2B_HUMAN	23.56	2	6	4	293513	Histone-lysine N-methyltransferase 2B OS=Homo sapiens GN=KMT2B PE=1 SV=1	0	0	0	0
386	sp O15061 SYNEM_HUMAN	23.55	4	4	4	172767	Synemin OS=Homo sapiens GN=SYNM PE=1 SV=2	0	0	0	0
427	sp Q8TCY9 URGCP_HUMAN	23.55	4	3	1	104987	Up-regulator of cell proliferation OS=Homo sapiens GN=URGCP PE=1 SV=2	0	0	0	0
750	sp Q9UHV5 RPGFL_HUMAN	23.54	1	1	1	73265	Rap guanine nucleotide exchange factor-like 1 OS=Homo sapiens GN=RAPGEFL1 PE=1 SV=2	1	1,644	1,290	1,379
1442	sp O75179 ANR17_HUMAN	23.37	1	5	1	274256	Ankyrin repeat domain-containing protein 17 OS=Homo sapiens GN=ANKRD17 PE=1 SV=3	0	0	0	0
3984	sp Q9NYQ8 FAT2_HUMAN	23.35	1	7	3	479321	Protocadherin Fat 2 OS=Homo sapiens GN=FAT2 PE=1 SV=2	0	0	0	0
778	sp Q13948 CASP_HUMAN	23.31	1	1	1	77455	Protein CASP OS=Homo sapiens GN=CUX1 PE=1 SV=2	1	1,062	1,071	1,292
322	sp Q9UQ35 SRRM2_HUMAN	23.22	2	4	4	299616	Serine/arginine repetitive matrix protein 2 OS=Homo sapiens GN=SRRM2 PE=1 SV=2	1	0,722	0,645	1,075
199	sp P21817 RYR1_HUMAN	23.13	3	12	9	565184	Ryanodine receptor 1 OS=Homo sapiens GN=RYR1 PE=1 SV=3	1	0,997	1,112	1,302
615	sp Q8NEU8 DP13B_HUMAN	23.06	5	2	2	74493	DCC-interacting protein 13-beta OS=Homo sapiens GN=APPL2 PE=1 SV=3	1	1,043	1,054	0,978
840	sp B7U540 KCJ18_HUMAN	23.00	3	1	1	48738	Inward rectifier potassium channel 18 OS=Homo sapiens GN=KCNJ18 PE=1 SV=2	0	0	0	0
841	sp Q14500 KCJ12_HUMAN	23.00	3	1	1	49001	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 12 OS=Homo sapiens GN=KCNJ12 PE=1 SV=2	0	0	0	0
1629	sp P48634 PRC2A_HUMAN	22.77	1	4	2	228861	Protein PRRC2A OS=Homo sapiens GN=PRRC2A PE=1 SV=3	0	0	0	0
835	sp P08185 CBG_HUMAN	22.66	7	2	2	45141	Corticosteroid-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA6 PE=1 SV=1	1	0,751	0,934	0,910
1109	sp Q7Z589 EMSY_HUMAN	22.57	1	2	2	141467	Protein EMSY OS=Homo sapiens	1	0,831	0,987	1,049

							GN=EMSY PE=1 SV=2				
1030	sp P12268 IMDH2_HUMAN	22.28	3	1	1	55805	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 OS=Homo sapiens GN=IMPDH2 PE=1 SV=2	1	0,628	0,622	0,765
1771	sp Q5VT52 RPRD2_HUMAN	22.27	2	6	2	156019	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=RPRD2 PE=1 SV=1	0	0	0	0
1094	sp Q9Y5K6 CD2AP_HUMAN	22.07	1	1	1	71451	CD2-associated protein OS=Homo sapiens GN=CD2AP PE=1 SV=1	1	0,537	0,878	0,733
708	sp B2RTY4 MYO9A_HUMAN	21.93	2	3	2	292704	Unconventional myosin-IXa OS=Homo sapiens GN=MYO9A PE=1 SV=2	1	1,098	1,101	1,186
864	sp P04920 B3A2_HUMAN	21.92	3	2	2	137009	Anion exchange protein 2 OS=Homo sapiens GN=SLC4A2 PE=1 SV=4	1	0,879	1,084	0,939
1135	sp Q9Y6C2 EMIL1_HUMAN	21.91	1	1	1	106667	EMILIN-1 OS=Homo sapiens GN=EMILIN1 PE=1 SV=2	1	0,807	0,869	0,834
1065	sp Q9H3Y6 SRMS_HUMAN	21.90	2	1	1	54507	Tyrosine-protein kinase Srms OS=Homo sapiens GN=SRMS PE=1 SV=1	1	0,631	0,779	0,902
527	sp P19823 ITIH2_HUMAN	21.71	4	3	2	106463	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2	0	0	0	0
1086	sp Q9H267 VP33B_HUMAN	21.61	2	1	1	70585	Vacuolar protein sorting-associated protein 33B OS=Homo sapiens GN=VPS33B PE=1 SV=2	0	0	0	0
1196	sp Q86T03 TM55B_HUMAN	21.61	2	1	1	29470	Type 1 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 4-phosphatase OS=Homo sapiens GN=TMEM55B PE=1 SV=1	1	1,238	1,191	1,479
747	sp Q9P0L2 MARK1_HUMAN	21.52	4	2	2	89003	Serine/threonine-protein kinase MARK1 OS=Homo sapiens GN=MARK1 PE=1 SV=2	0	0	0	0
455	sp Q9P219 DAPLE_HUMAN	21.40	2	4	3	228228	Protein Daple OS=Homo sapiens GN=CCDC88C PE=1 SV=3	1	1,278	1,083	1,131
489	sp P21333 FLNA_HUMAN	21.21	3	6	4	280737	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4	1	1,155	1,189	1,172
1222	sp Q92888 ARHG1_HUMAN	20.58	1	1	1	102435	Rho guanine nucleotide exchange factor 1 OS=Homo sapiens GN=ARHGEF1 PE=1 SV=2	1	1	1	0,000
420	sp Q6KC79 NIPBL_HUMAN	20.52	1	4	3	316051	Nipped-B-like protein OS=Homo sapiens GN=NIPBL PE=1 SV=2	1	0,841	0,976	1,255

467	sp Q4G0P3 HYDIN_HUMAN	20.49	1	6	4	575900	Hydrocephalus-inducing protein homolog OS=Homo sapiens GN=HYDIN PE=1 SV=3	1	1,277	0,945	1,046
1247	sp Q9UI47 CTNA3_HUMAN	20.42	2	1	1	99809	Catenin alpha-3 OS=Homo sapiens GN=CTNNA3 PE=1 SV=2	0	0	0	0
1253	sp P29966 MARCS_HUMAN	20.38	5	1	1	31555	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate OS=Homo sapiens GN=MARCKS PE=1 SV=4	1	0,305	0,582	0,330
1273	sp Q16625 OCLN_HUMAN	20.29	2	1	1	59144	Occludin OS=Homo sapiens GN=OCLN PE=1 SV=1	1	1,235	1,018	1,198
1268	sp Q5GH77 XKR3_HUMAN	20.24	3	1	1	53448	XK-related protein 3 OS=Homo sapiens GN=XKR3 PE=2 SV=1	1	0,890	1,012	1,002
1146	sp O43432 EIF4G3_HUMAN	20.18	2	3	1	176651	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 OS=Homo sapiens GN=EIF4G3 PE=1 SV=2	0	0	0	0
1277	sp Q6ZRQ5 MMS22_HUMAN	20.16	1	1	1	142320	Protein MMS22-like OS=Homo sapiens GN=MMS22L PE=1 SV=3	0	0	0	0
5513	sp Q9UKZ4 TEN1_HUMAN	20.09	1	3	1	305010	Teneurin-1 OS=Homo sapiens GN=TENM1 PE=1 SV=2	0	0	0	0

ID da proteína: número de identificação da proteína.

Acesso: O número de acesso da proteína como na base de dados FASTA.

-10lgP: Pontuação de confiança da proteína.

Cobertura: Porcentagem da sequência da proteína coberta pelos peptídeos de suporte.

#Peptídeos: Número de peptídeos de suporte de alta confiança.

#Único: Número de peptídeos de suporte de alta confiança que são unicamente mapeados ao grupo de proteínas.

Massa média (Da): Massa da proteína calculada pela massa média.

Descrição: **Informações da proteínas como na base de dados FASTA.**

Razão 114: **Grupo SS/SS.**

Razão 115: **Grupo SP/SS.**

Razão 116: **Grupo DS/DP.**

Razão 117: **Grupo DP/SS.**

Anexo 2. Ficha do exame clínico periodontal

PROJETO DE PESQUISA EM PERIODONTIA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA - FICHA CLÍNICA PERIODONTAL

NOME: _____ ID: _____ DATA: _____
 N PACIENTE.: _____ GRUPO: _____ IDADE: _____ VISITA: _____

VESTIBULAR														
	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
Cálculo														
IPV														
ISG														
PBS														
NCI														
ISS														
SUP														
PALATINA														
Cálculo														
IPV														
ISG														
PBS														
NCI														
ISS														
SUP														
VESTIBULAR														
	37	36	35	34	33	32	31	41	42	43	44	45	46	47
Cálculo														
IPV														
ISG														
PBS														
NCI														
ISS														
SUP														
LINGUAL														
Cálculo														
IPV														
ISG														
PBS														
NCI														
ISS														
SUP														

Anexo 3. Termo de Consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa do HUCFF.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROJETO DE PESQUISA EM PERIODONTIA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO

Prezado Senhor e Senhora,

A pesquisa da qual você está sendo convidado a participar tem o objetivo de melhorar o tratamento das Doenças Periodontais associadas ao Diabetes (doenças que afetam a gengiva e o osso que suportam os dentes na boca). As doenças periodontais são infecções causadas pelo acúmulo de bactérias específicas presentes na placa dental bacteriana. Essa doença aparece como uma inflamação da gengiva, com sangramento gengival, presença de tártaro e placa dental (massa branca aderida ao dente) e mobilidade (“amolecimento”) do dente. A diabetes contribui para a evolução dessa doença e o deixa mais propenso a ter Periodontite.

Se você é mulher grávida, amamentando ou tiver alergia as tetraciclinas não poderá participar desse estudo. Para participar desse estudo você deve estar indo constantemente ao seu médico, seguindo as recomendações que ele faz e não pode ter tomado antibiótico nos últimos 6 meses, nem estar tomando anti-inflamatório regularmente. A pesquisa envolve um exame clínico oral (exame da gengiva, medida da bolsa gengival e sangramento da gengiva). Além disso, será coletado com um pequeno papel estéril, um líquido de sua gengiva, para podermos analisá-lo. Os indivíduos que forem selecionados e estiverem de acordo com a pesquisa, serão divididos em três grupos. Os três grupos receberão o tratamento tradicional para a gengiva que é a raspagem e alisamento dos dentes. O primeiro grupo receberá o tratamento associado a um antibiótico em baixa dosagem (Doxiciclina 20mg, de 12/12 horas, durante 6 meses). O segundo grupo receberá a raspagem com um placebo (medicamento sem efeito, durante 6 meses) e terceiro grupo será de pacientes sem diabetes que receberá a raspagem, sem uso de nenhuma medicação.

Apenas um pesquisador fora do estudo saberá quem está em cada grupo. O pesquisador irá sortear em qual grupo você será participante. Todos os grupos receberão o

mesmo tratamento, sendo a única diferença o uso, ou não do medicamento. Todos os exames serão feitos com material estéril e equipamento odontológico adequados na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFRJ.

É importante dizer que estudos mostraram que esse medicamento pode melhorar o controle de sua diabetes, melhora o tratamento da Periodontite, e estamos investigando como ele atua na pessoa com diabetes. O medicamento contém uma dose mínima dessa substância, de forma que não tem nenhuma atividade antibiótica. Como os demais medicamentos, a doxiciclina em baixa dosagem pode causar pequenas náuseas e/ou fotossensibilidade. Esse medicamento é vendido no Brasil em dosagem superior (100mg), como antibiótico, na dosagem utilizada na pesquisa (20mg) é comercializado nos EUA e países da Europa há mais de 10 anos.

O exame da gengiva e a coleta do fluido que sai de sua gengiva podem causar pequeno desconforto. O tratamento da gengiva, como todo tratamento odontológico, oferece riscos, como no uso de anestésicos locais e procedimentos cirúrgicos pouco invasivos. Acreditamos baseados nos conhecimentos específicos da área que os benefícios superam os riscos nessa pesquisa. Caso você venha a passar mal ou sentir qualquer efeito ruim do medicamento durante a pesquisa, você será retirado do estudo, tendo ainda o direito de acesso ao tratamento, sem perder nenhum benefício já conseguido.

Garantimos esclarecimentos antes e durante a pesquisa sobre qualquer dúvida sobre os procedimentos a serem realizados, os riscos que serão expostos e quaisquer outras informações que julguem necessárias. Garantimos também o direito de ressarcimento de despesas (especialmente com transporte e alimentação) decorrentes da participação na pesquisa. Você tem o direito a tratamento médico na Instituição, bem como solicitar indenização por meios legais, em caso de danos pessoais decorrentes da pesquisa.

Algumas pessoas podem ficar mais sensíveis à luz solar, não se deve, portanto, tomar sol durante o tratamento com esse medicamento sem conhecer a reação. O uso em idosos (acima de 65 anos) requer acompanhamento médico.

O uso da doxiciclina pode causar reações adversas como: gastrintestinais: anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, glossite, disfagia, enterocolite e lesões inflamatórias na região genital (com monília); Casos raros de esofagite e ulcerações esofágicas foram relatados bem como anormalidades da função hepática; Cutâneas: lesões eritematosas e maculopapulosas, dermatite esfoliativa e reações de fotossensibilidade; Toxicidade renal: elevação do nitrogênio uréico tem sido relatada. Reações de hipersensibilidade: urticária, edema angioneurótico, anafilaxia, púrpura anafilactóide, pericardite, doenças do soro e

exacerbação do lúpus eritematoso sistêmico; e/ou Hematológica: anemias hemolítica, trombocitopenia, neutropenia e eosinofilia.

O objetivo desse estudo é saber como os pacientes com diabetes reagem ao tratamento de raspagem e a esse medicamento. O líquido coletado de sua gengiva servirá para entender melhor como acontece o processo de doença e de tratamento. Os resultados de seus exames serão confidenciais e você poderá requisitá-los quando quiser. Você poderá desistir de participar desse estudo, a qualquer momento, sem prejuízo a continuidade do seu tratamento na Instituição.

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas por mim.

Eu discuti com o Dr. Marcelo Cavalcante Marinho, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Nome do Pesquisador: Marcelo Cavalcante Marinho

Orientador Responsável: Carmelo Sansone

Endereço Faculdade de Odontologia-UFRJ: Av. Brigadeiro Trompowsky, s/n CEP: 21941-590; Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro.

Fone: (21) 2562-2035

Cel. Marcelo: (21) 99346-7235

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ – R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n.º 255 – Cidade Universitária /

Ilha do Fundão – Sala 01D-46/ 1º andar ou pelo telefone 39382480, de segunda a sexta-feira,
das 8 às 15 horas, ou através do e-mail: cep@hucff.ufrj.br

Nome do Paciente

Data: ____/____/____

Assinatura do Paciente

Data: ____/____/____

Assinatura do Pesquisador Responsável